Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Mario Visquert Fas

Dirigida por:

Dra. Isabel Escriche Roberto

Valencia, Noviembre de 2015

Dª Isabel Escriche Roberto, Catedrática del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia e Investigadora del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la misma Universidad

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada "**Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de las mieles**" que presenta D. Mario Visquert Fas para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizada en Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universidad Politécnica de Valencia bajo su dirección y que reúne las condiciones para ser defendida.

Valencia, 16 de Noviembre de 2015

Fdo. Isabel Escriche Roberto

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Isabel Escriche por toda su dedicación y trabajo durante todos estos años.

A la Universitat Politècnica de València por el apoyo económico a través de los proyectos: PDI-05-04-5639-01 y 200809603.

A la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Comunidad Valenciana por el apoyo económico a través de los proyectos: T4728001, T6151000 y T6151000. Y a la Consellería de Empresa, Educación y Ciencia de la Comunidad Valenciana por el apoyo económico a través del proyecto: CV2007-244.

A todas las personas que han formado parte del "Laboratorio de la Miel", en especial a Marisol y a Melinda.

A mis compañeras Carolina, Milagro y Virginia por todo su apoyo y ayuda.

Por último a toda mi familia, en especial a mi mujer Alicia y a mis hijas María y Clara, por todo el cariño y el apoyo que me han dado.

Resumen

La miel de abejas, considerada el edulcorante natural por antonomasia, es ampliamente consumida por su sabor y sus excelentes propiedades. Los requisitos legales y comerciales han llevado a definir sus objetivos de la calidad: no puede contener sustancias ni microorganismos nocivos, no está permitida la incorporación de sustancias ajenas a ella o la eliminación de alguno de sus componentes y además, la miel debe mantener hasta el consumo, sus características naturales intrínsecas mínimamente alteradas. La pérdida de su frescura natural está influenciada por la manipulación y los condicionantes ambientales a los que las mieles están expuestas desde que son recolectadas del panal, hasta que llegan al consumidor.

En este sentido el objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido evaluar la influencia que, en la variación de la calidad de las mieles, tiene el tiempo y la temperatura de exposición, tanto para condiciones correspondientes a su procesado industrial (licuación y pasterización) como previas a él (almacenamiento).

El HMF, la actividad diastásica y el color varían de forma significativa al ser sometidas las mieles a diferentes condiciones tiempo/temperatura. Por el contrario, la humedad, la acidez y la conductividad eléctrica no experimentan variaciones significativas. El HMF y la actividad diastásica evolucionan con la pérdida de calidad de las mieles (de forma diferente según tipo de miel), aumentando y disminuyendo, respectivamente y de forma más importante en la etapa de almacenamiento, en comparación con la licuación o la pasterización. Sin embargo, el HMF se puede considerar mejor parámetro indicador del deterioro ya que su valor en todas las mieles recién recolectadas es cero; al contrario de lo que sucede para la actividad diastásica cuyos valores iniciales difieren considerablemente en función del origen botánico del que proceden los néctares o las secreciones de las plantas que visitan las abejas. En cuanto al color, el cambio producido está muy influenciado por la coloración propia de cada miel; las variaciones en mieles claras son mucho mayores que en mieles oscuras.

En la etapa de almacenamiento, los tiempos de residencia prolongados (a temperaturas entre 25 y 40ºC) pueden afectar considerablemente a los parámetros de calidad de la miel (HMF, actividad diastásica y color), incluso en mayor medida que en las condiciones de licuación y pasteurización.

Con respecto a la licuación y la pasterización, las condiciones de trabajo recomendables serían: 45ºC durante un periodo no superior a las 72 horas (en función del tipo de miel) y 75ºC durante 4 minutos, respectivamente. De esta manera, se consiguen los objetivos propios de cada etapa (sin alterar en gran medida la calidad en las mieles): con la licuación, hacer la miel más manejable disminuyendo la viscosidad (a valores similares a los conseguidos a 50 y 55ºC), y con la pasteurización, reducir la carga microbiana y los núcleos de cristalización. Además, en estas condiciones, si ambos tratamientos se llevan a cabo bajo condiciones controladas, no se originan alteraciones de los componentes de la fracción aromática intrínsecos de las mieles. Este hecho es especialmente relevante para mieles de un alto valor comercial, como pueden ser ciertas mieles monoflorales y de mielada.

La capacidad predictiva de un modelo que sea útil para conocer el comportamiento del HMF, en función del tiempo y la temperatura, mejora cuando se consideran individualmente las condiciones de almacenamiento, licuación y pasterización (en comparación con la consideración conjunta de todos los datos). La modelización del HMF en cada etapa y de forma individual para cada miel parece ser la solución en la obtención de un modelo útil y suficientemente preciso. No obstante, para ser concluyentes en esta afirmación sería necesario disponer de un mayor número de medidas en todas las condiciones y para aquellas mieles de interés.

En definitiva, las etapas de licuación y pasterización, que tienen lugar en el proceso industrial de envasado de la miel, no tienen por qué entrañar un riesgo en la pérdida de calidad de la miel; siempre y cuando las empresas las controlen adecuadamente. Sin embargo, es la etapa previa al proceso industrial la más problemática en relación a la pérdida de calidad de la miel, no solo por la dificultad de controlar las condiciones ambientales a las que pueden estar expuestas las mieles durante este periodo (especialmente durante los meses estivales en los que las temperaturas pueden llegar a ser elevadas durante tiempos prolongados); sino también por el desconocimiento en sí de este problema. Todo esto debería hacer reflexionar al sector apícola sobre la importancia del control antes del procesado industrial, incluyendo la manipulación por parte de los apicultores.

Resum

La mel de abelles, considerada el edulcorant natural per antonomàsia, es àmpliament consumit pel seu sabor i les seus excel·lents propietats. Els requisits legals i comercials han fet definir els seus objectius de qualitat: no pot contindre substàncies ni microorganismes nocius, no està permesa l'incorporació de substancies alienes a ella o l'eliminació d'algun dels seus components i a més a més, la mel deu mantindre fins al consum, les seues característiques naturals intrínseques mínimament alterades. La perduda de la seua frescor natural està influenciada por la manipulació i els condicionants ambientals als quals les mels estan exposats des que son recol·lectades al rusc, fins que arriben al consumidor.

En aquest sentit l'objectiu general de la present tesis doctoral ha sigut avaluar l'influencia que, en la variació de la qualitat de les mels, te el temps i la temperatura d'exposició, tant per a condicions corresponents al seu processat industrial (liquació i pasteurització) com prèvies a ell (emmagatzematge).

El HMF, l'activitat diastásica i el color varien de forma significativa al ser sotmeses les mels a diferents condicions temps/temperatura. Per el contrari, la humitat, l'acidesa i la conductivitat elèctrica no experimenten variacions significatives. El HMF i l'activitat diastàsica evolucionen amb la pèrdua de qualitat de les mels (de forma diferent segons el tipus de mel), augmentant i disminuint, respectivament i de forma més important en l'etapa d'emmagatzematge, en comparació amb la liquació o la pasteurització. No obstant això, el HMF es pot considerar millor paràmetre indicador del deterior ja que el seu valor en totes les mels recent recol·lectades es cero; al contrari del que passa amb l'activitat diastàsica, on els valors inicials varien considerablement en funció de l'origen botànic del que procedeixen els nèctars o las secrecions de les plantes que visiten les abelles. En quant al color, el canvi produït està molt influenciat per la coloració pròpia de cada mel, las variacions en mels clares son molt més grans que en mels obscures.

En l'etapa d'emmagatzematge, els temps de residencia prolongats (a temperatures entre 25 y 40ºC) poden afectar considerablement als paràmetres de qualitat de la mel (HMF, activitat diastàsica y color), inclús en major mesura que en condicions de liquació i pasteurització.

Respecto a la liquació i la pasteurització, les condicions de treball recomanables serien: 45ºC durant un període no superior a les 72 hores (en funció del tipus de mel) y 75ºC durant 4 minuts, respectivament. De esta manera, s'aconsegueixen els objectius propis de cada etapa, provocant la menor pèrdua de

qualitat en les mels; amb la liquació, fer la mel més manejable disminuint la viscositat (a valors similars als aconseguits a 50 y 55ºC), i amb la pasteurització, reduir la carga microbiana i els nuclis de cristal·lització. A més a més, en aquestes condicions, si els dos tractaments es duen a càrrec baix condicions controlades, no s'originen alteracions dels components de la fracció aromàtica intrínseques de les mels. Aquest fet que es especialment rellevant per a mels d'un alt valor comercial, com poden ser certes mels monoflorals i de melada.

La capacitat predictiva d'un model que siga útil per conèixer el comportament del HMF, en funció del tems i la temperatura, millora quan es consideren individualment les condiciones d'emmagatzematge, liquació i pasteurització (en comparació amb la consideració conjunta de totes les dades). La modelització del HMF en cada etapa y de forma individual per a cada mel pareix ser la solució en la obtenció d'un model útil y suficientment precís. No obstant, per a poder ser concloents en aquesta afirmació seria necessari disposar d'un major nombre de mesures en totes les condicions i per aquelles mels d'interès.

En definitiva, les etapes de liquació i pasteurització, que tenen lloc en el procés industrial d'envasat de la mel, no tenen per què suposar un risc en la pèrdua de qualitat de la mel; sempre i quan les empreses les controlen adequadament. No obstant això, es l'etapa prèvia al proses industrial la mes problemàtica en relació a la pèrdua de qualitat de la mel, no sols per la dificultat de controlar les condicions ambientals a las que poden estar exposades les mels durant aquest període (especialment durant els mesos estivals en els que les temperatures poden arribar a ser elevades durant temps prolongats); sinó també pel desconeixement en sí d'aquest problema. Tot açó deuria fer reflexionar al sector apícola entorn a l'importància del control abans del processat industrial, incloent la manipulació per part dels apicultors

Abstract

Honey is the quintessential natural sweetener; it is widely consumed due to its flavour and excellent properties. Legal and commercial requirements have defined its quality targets: it can't contain toxic substances, external substances can't be added to it, and it has to maintain its natural characteristics with minimum changes until consumption. Lose of natural freshness is due to the handling and ambient conditions that honey is exposed to from harvesting until it reaches the consumer.

The general objective of this PhD work was to evaluate the influence that time and temperature have on the changes in honey quality. Conditions during industrial processing (liquefaction and pasteurization) and previous storage were studied.

HMF, diastase activity and colour change significantly when honey is submitted to different time/temperature conditions. On the contrary, water content, acidity and electric conductivity have no significantly changes when honey is submitted to these conditions. HMF and diastase activity change with the loss of honey quality (differently for each honey), increasing and decreasing respectively. These changes are greater during storage than in liquefaction and pasteurization process. HMF can be considered to be the best parameter for the evaluation of the losses in quality as the initial value of this parameter in recently collected honey is zero. On the contrary, diastase activity has different initial values depending of the type of honey due to the differences in the botanic origin of nectars or honeydews. Colour changes depend on the initial colour of the honey, in clear honey the changes are greater than in dark honey.

A long storage time (at temperatures between 25 and 40ºC) can affect honey quality parameters considerably (HMF, diastase activity and colour); much more than liquefaction and pasteurization.

The conditions recommended for liquefaction and pasteurization are: 45ºC for a period of time no longer than 72 hours (depending on the type of honey), and 75ºC for 4 minutes, respectively. Using these conditions the objectives of each stage are satisfied, with minor losses of quality. Liquefaction makes honey more manageable by decreasing the viscosity (to values similar to those obtained at 50 and 55ºC), and pasteurization reduces the bioburden and crystallization nuclei. In addition, under these conditions, if both treatments are carried out in controlled conditions no significant change in the volatile fraction of honey is observed. This

is very important in honey with a high commercial value, such as monofloral and honeydew varieties.

The predictive capacity of a good model to predict HMF behaviour, according to time and temperature, increases when storage, liquefaction and pasteurization conditions are considered individually (compared to considering all the values together). Modelling HMF at each stage and for each individual honey seems to be the best solution to obtain a useful, accurate model. However, more measurements are needed in all conditions and for all the types of honey under consideration, to be conclusive.

In summary, the liquefaction and pasteurization stages during the process of industrial packaging of honey don't have to be a risk factor in the loss of honey quality, if these stages are controlled adequately. However, it is the stage previous to industrial processing which is the most problematic in terms of the loss of honey quality. Not only due to the difficulty in controlling the environmental conditions during this period (especially in summer when honey can be exposed to high temperatures for long periods of time) but also due to the lack of knowledge about this problem. All of these factors should be taken into account by the whole beekeeping sector in order to control the stages previous to industrial processing, including beekeeper practices.

Índice

I. Introducción 3
1. Un poco de historia 3
2. Datos económicos 5
3. Recolección y procesado de la miel 9
3.1. Trabajo apícola 9
3.2. Tareas industriales 12
3.2.1. Licuación 13
3.2.2. Pasteurización 13
3.2.3. Envasado 14
3.2.4. Almacenamiento y conservación 14
4. La miel y otros productos de la colmena 15
4.1. ¿Qué es la miel? 15
4.2. Tipos de miel 16
4.3. Propiedades beneficiosas de la miel 17
4.4. Otros productos de la colmena 18
4.4.1. La jalea real 18
4.4.2. El polen 18
4.4.3. El propóleo 20
4.4.4. La cera 21
5. Composición química de la miel 22
5.1. Agua 22
5.2. Azúcares 22
5.3. Ácidos 23
5.4. Proteínas 23
5.5. Minerales 23

5.6. Otros componentes de la miel 23
6. La calidad de la miel 24
6.1. Aspectos comerciales 25
6.1.1. El color de la miel 25
6.1.2. La cristalización 25
6.2. Aspectos sanitarios 27
6.2.1. Microbiológicos 27
6.2.2. Residuos químicos 27
6.3. La frescura de la miel 28
6.3.1. Actividad diastásica 29
6.3.2. Contenido en hidroximetilfurfural 29

II. Objetivos y plan de trabajo 33
1. Objetivo general 33
2. Objetivos específicos 33
3. Plan de trabajo 33

III. Materiales y métodos 37
1. Materia prima 37
2. Análisis Melisopalinológico 37
3. Determinación de parámetros físico-químicos. 38
3.1. Determinación del pH, la acidez libre, lactónica y total 38
3.2. Determinación de humedad 40
3.3. Determinación de la conductividad 40
3.4. Determinación de hidroximetilfurfural 41
3.5. Determinación de la actividad diastásica 42
3.6. Medida de color 45
4. Análisis de los compuestos volátiles 46
4.1. Extracción 46

4.2. Separación 47
4.3. Identificación 48
5. Análisis microbiológicos 49
5.1. Enterobacterias 50
5.2. Escherichia coli 50
5.3. Salmonella-Shigella 51
5.4. Microorganismos aerobios mesófilos 51
5.5. Mohos y levaduras 51
6. Análisis de la viscosidad de la miel 51
7. Análisis estadístico 52

IV. Selección de parámetros y condiciones experimentales para evaluar la calidad de las mieles en función del tiempo/temperatura de exposición 55

1. Introducción 55
2. Materiales y métodos 56
2.1. Materia Prima 56
2.2. Diseño experimental 57
2.3. Determinaciones analíticas 58
2.4. Análisis estadístico 58
3. Resultados y discusión 59
3.1. Evolución de parámetros de calidad con el tiempo y la temperatura de tratamiento 59
3.1.1. Evolución del Hidroximetilfurfural 59
3.1.2. Evolución de la acidez 62
3.1.3. Evolución de la conductividad 64
3.1.4. Evolución de la humedad 65
3.2. Evaluación del efecto de las condiciones tiempo/temperatura sobre los parámetros de calidad analizados 66
4. Conclusiones 73

V. Evolución del HMF, actividad diastásica y color en las etapas de almacenamiento, licuación y pasteurización de las mieles 77

1. Introducción 77

2. Materiales y métodos 78

2.1. Materia Prima 78

2.2. Diseño experimental 78

2.2.1. Almacenamiento 78

2.2.2. Licuación 79

2.2.3. Pasteurización 79

2.3. Determinaciones analíticas 80

3. Resultados y discusión 80

3.1. Etapa de Almacenamiento 80

3.1.1. Caracterización fisicoquímica y color de las mieles antes de iniciar el estudio de almacenamiento 80

3.1.2. Evolución del HMF con las condiciones de almacenamiento 83

3.1.3. Evolución de la actividad diastásica con las condiciones de almacenamiento 84

3.1.4. Evolución del color con las condiciones de almacenamiento 86

3.2. Etapa de Licuación 93

3.2.1. Caracterización fisicoquímica y color de las mieles antes de iniciar el estudio de licuación 93

3.2.2. Evolución del HMF con las condiciones de licuación 96

3.2.3. Evolución de la actividad diastásica con las condiciones de licuación 98

3.2.4. Evolución del color con las condiciones de licuación 100

3.2.5. Efecto de la licuación en la viscosidad de las mieles 105

3.3. Etapa de Pasteurización 109

3.3.1. Caracterización fisicoquímica y color de las mieles antes de iniciar el estudio de pasteurización 109

3.3.2. Evolución del HMF con las condiciones de pasteurización 111

3.3.3. Evolución de la actividad diastásica con el tratamiento de pasteurización 113

3.3.4. Evolución del color con el tratamiento de pasteurización 115

3.3.5. Estudio microbiológico, variación de la carga microbiana con la pasteurización. 119

4. Conclusiones 120

VI. Análisis de la fracción volátil de diferentes tipos de miel. Influencia de los tratamientos de licuación y pasteurización 125

1. Introducción 125

2. Materiales y métodos 125

2.1. Materia Prima 125

2.2. Determinaciones analíticas 126

2.3. Análisis estadístico 126

3. Resultados y discusión 126

3.1. Caracterización palinológica y físico-química de las mieles. 126

3.2. Composición de la fracción volátil de las cuatro tipos de miel 129

3.2.1. Compuestos volátiles en miel de mielada. 129

3.2.2. Compuestos volátiles en miel de azahar 131

3.2.3. Compuestos volátiles en miel de romero 132

3.2.4. Compuestos volátiles en miel de milflores 133

3.3. Cambios en el perfil volátil inducidos por los tratamientos térmicos 133

4. Conclusiones 144

VII. Obtención de un modelo predictivo para el hidroximetilfurfural (HMF) en miel 147

1. Introducción 147

2. Materiales y métodos 147

3. Resultados y discusión 148
4. Conclusiones 162

VIII. Conclusiones 165
1. Conclusiones del objetivo general 1. 165
2. Conclusiones del objetivo general 2. 165
3. Conclusiones del objetivo general 3. 167
Conclusión general de la tesis 168

IX. Bibliografía 171

X. Anexos 181
1. Anexo I 181
2. Anexo II 184
3. Anexo III 187

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción

1. Un poco de historia

La miel es el producto azucarado, elaborado por la abeja (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores y otras exudaciones de las plantas, tras la maduración de este en el interior de la colmena. Es el edulcorante más antiguo que se conoce y, dada la innata apetencia de los seres humanos por el sabor dulce fue muy a preciada y ampliamente utilizada antes de la introducción del azúcar en la alimentación.

Se trata de un producto natural, cuya presencia en nuestro planeta parece remontarse hasta hace 100 millones de años, cuando ciertas avispas comenzaron a diferenciarse para aprovechar una nueva y creciente fuente de alimentos: el néctar y el polen de las plantas angiospermas (Benedetti y Pieralli, 1990). Éstas adaptaron su aparato bucal para chupar el néctar de las flores, su cuerpo se cubrió de pelos plomosos para recoger los granos de polen, y las patas posteriores se hicieron progresivamente más anchas para poder llevar cada vez más polen al nido. Toda esta serie de cambios convirtieron a esas avispas en la especie que conocemos hoy como abeja de miel o melífera. Esta abeja se desarrolló inicialmente en zonas de clima tropical y poco a poco fue colonizando otras partes del planeta.

La recolección de la miel, es una de las actividades más antiguas de las que se tiene noticia, con testimonios que datan del Paleolítico y las grandes culturas: egipcia, china, persa, etc. En todas se pueden encontrar datos y recetas sobre la práctica de la apicultura y el uso de los productos de la colmena (figura I.1).

Se piensa que hace 150.000 años los enjambres de abejas existían en todas las penínsulas del sur de Europa. Posteriormente, unos 8.000 años a. C., pudieron aparecer los primeros indicios de la apicultura dentro de las culturas urbanas y agrícolas desarrolladas en el área mediterránea. Los primeros apicultores se limitarían a recoger los enjambres que colgaban de las matas o de las ramas de los árboles y a colocarlos dentro de las colmenas, para poder recoger posteriormente sus productos (Benedetti y Pieralli, 1990).

Figura I.1. Pintura egipcia que pone de manifiesto la utilización de técnicas apícolas para la recolección de miel.

En la Comunidad Valenciana también se han encontrado pruebas de las actividades apícolas llevadas a cabo por nuestros antepasados. Las pinturas rupestres encontradas en la Cueva de la Araña, en Bicorp (Valencia) datan de 7.000 años a. C. (figura I.2), y en ellas se demuestra que el hombre aprovechaba ya de forma inteligente la actividad de las abejas en estas tierras (Mateu Andrés et al., 1996).

Figura I.2. Pintura rupestre encontrada en la cueva de la Araña (Bicorp, Valencia).

El tipo de apicultura que se realizaba desde los inicios se denomina “apicultura tradicional” o “apicultura fijista”. Los panales construidos por las abejas, según el diseño que le dicta su instinto natural, quedaban fijados unos a otros, por puentes de cera, y también a las paredes de la colmena de manera que, para poder extraer la miel, el apicultor se veía obligado a romperlos o cortarlos.

La práctica de este tipo de apicultura se mantuvo durante mucho tiempo, concretamente hasta mediados del siglo XIX (1851), cuando Langstroth descubrió el espacio que las abejas respetaban para poder pasar entre dos panales vecinos (el paso de abeja), y diseñó, con gran éxito, un nuevo modelo de colmena que contaba con marcos móviles (Figura I.3). Langstroth fijó este espacio en 9.5 milímetros. Las abejas respetaban esta distancia y, en general, construían los panales bien encajados a los marcos. De esta manera se podían sacar fácilmente los panales de miel y de cría sin romperlos, se podían voltear para observarlos, incluso se abría la posibilidad de intercambiarlos entre diversas colmenas. En definitiva, se abrían las puertas a la apicultura movilista con sus dos posibilidades: la sedentaria, en la que la ubicación de la colmena no varía, y la trashumante, en la que se va cambiando la situación del apiario siguiendo las floraciones, con el fin de obtener el máximo rendimiento. La apicultura movilista, sedentaria o trashumante, es la que se practica en la actualidad en todos los países desarrollados (Calatayud, 2002).

Figura I.3. Colmenas modelo Langstroth.

2. Datos económicos

En lo que a producción mundial de miel se refiere, los datos publicados en 2014 muestran un incremento más o menos constante desde el año 2002 al 2012 (FAO, 2014). En el año 2002 la producción mundial fue de 1.283.709 Tm, llegando el año 2012 hasta las 1.592.700 Tm (figura I.4).

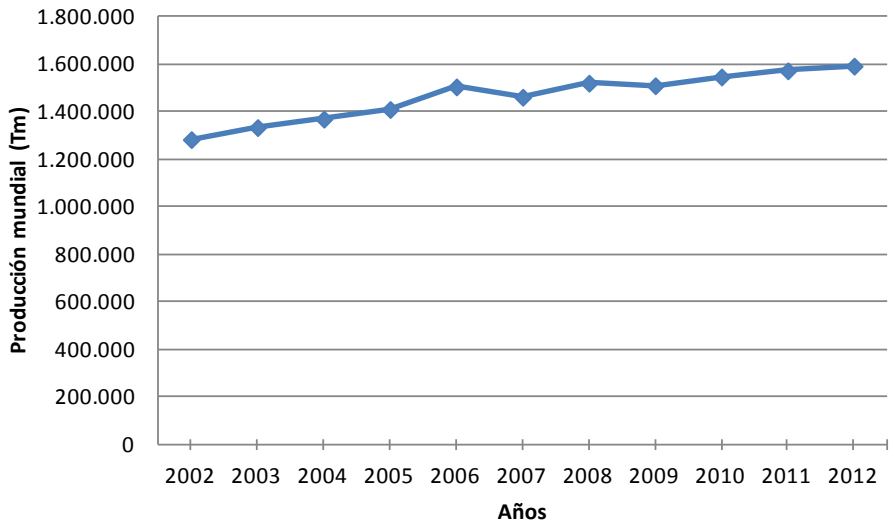


Figura I.4. Evolución de la producción mundial de miel.

En cuanto a los datos de producción por paises, los últimos datos estadísticos de los que se dispone información datan del año 2012 (figura I.5), y en ellos se puede apreciar que China es el mayor productor mundial de miel con más del 27% de la producción total, siguiéndole a bastante distancia Turquía, Argentina, Ucrania y los E.E.U.U. A nivel mundial, España es el decimosegundo país del mundo con mayor producción, siendo el país con mayor producción dentro de la Unión Europea.

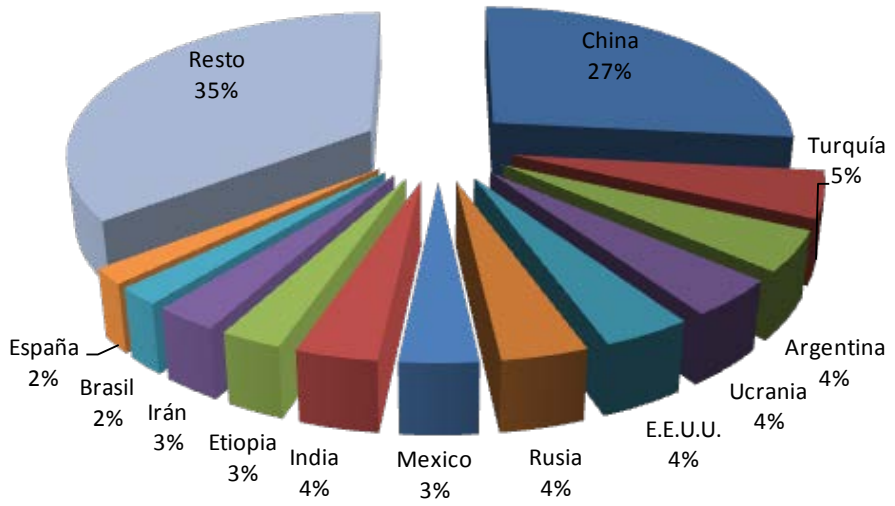


Figura I.5. Reparto de la producción mundial de miel durante el año 2012.

En el marco de la Unión Europea, la producción de miel durante el año 2012 ascendió a 206.516 Tm, situándose en conjunto la UE como segundo productor mundial por detrás de China. Dentro de la UE, España, Rumanía, Hungría y Alemania son los mayores productores (figura I.6).

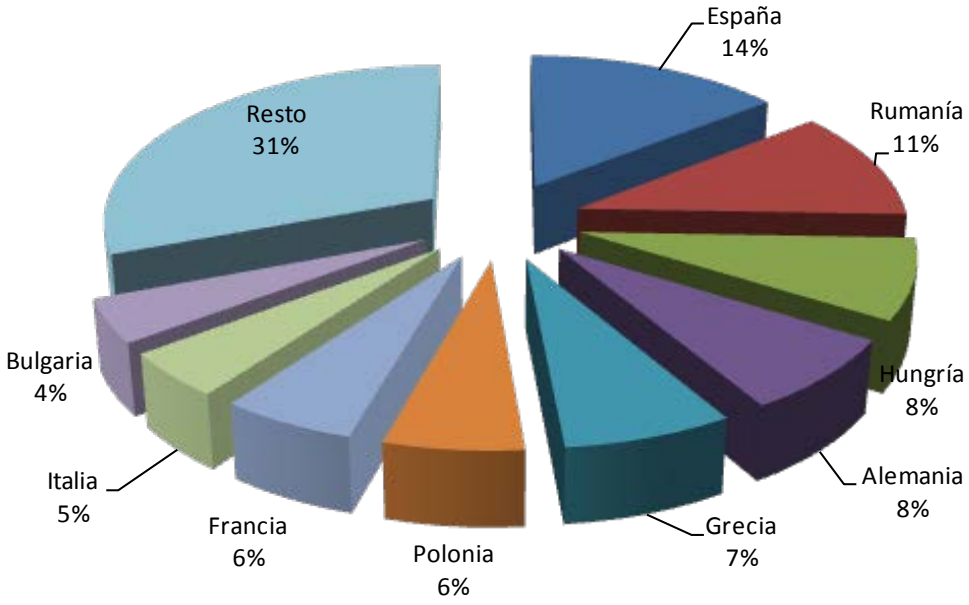


Figura I.6. Reparto de la producción de miel en la Unión Europea durante el año 2012.

A nivel nacional los datos estadísticos publicados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2014) muestran que la producción española de miel en el periodo comprendido entre 2002 y 2012 fluctuó entre las 27.230 Tm producidas en el año 2005 y las 35.722 Tm producidas en el año 2002, situándose generalmente la producción entre las 30.000 y las 35.000 Tm anuales (figura I.7).

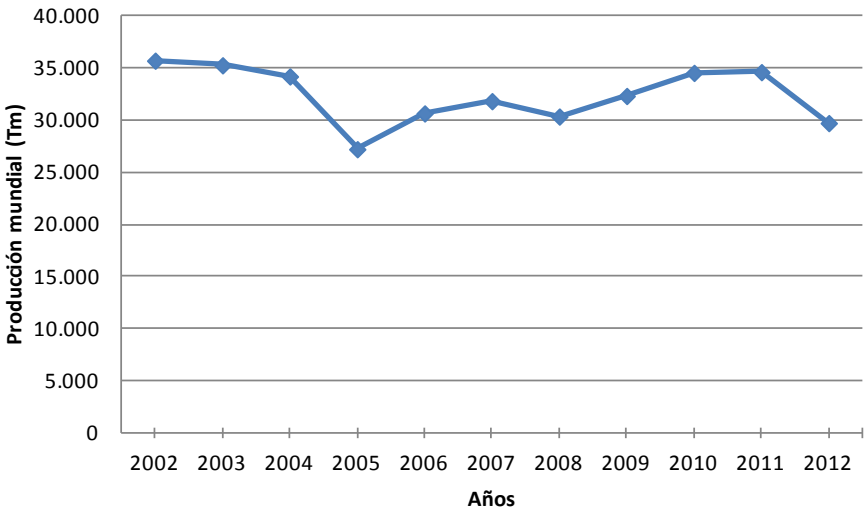


Figura I.7. Evolución de la producción de miel en España desde el año 2002 al año 2012.

Con relación al número de colmenas, según los datos de los que se dispone en el anuario estadístico español del año 2014 (INE, 2014), en 2009 el número de colmenas censadas en España fue de 637.437, siendo la Comunidad Valenciana la que poseía un mayor número, con 129.505, representando más del 20% del total (figura I.8).

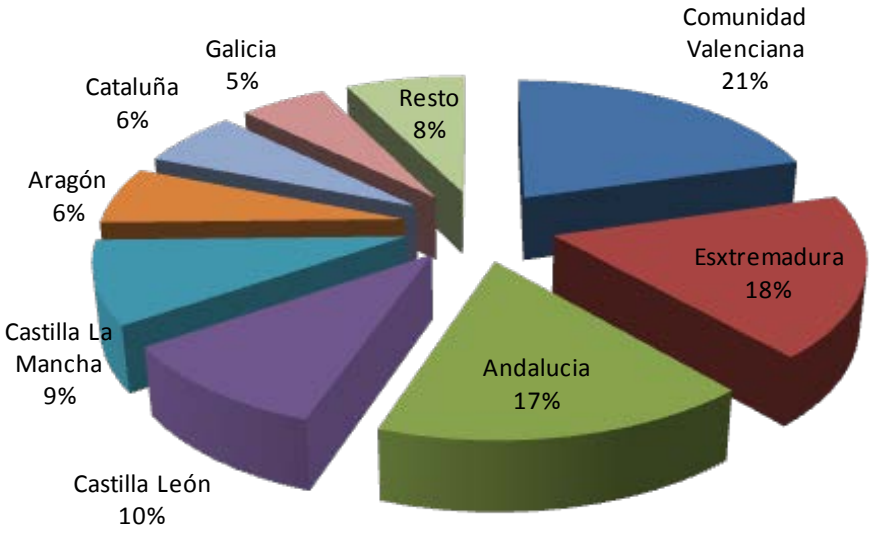


Figura I.8. Porcentaje de reparto de las colmenas ubicadas en España en el año 2009.

El elevado tamaño medio de las explotaciones apícolas de la Comunidad Valenciana, superior a las cien colmenas por apicultor, indica la clara componente profesional o semiprofesional del sector apícola valenciano. Este hecho, unido a unas condiciones pluviométricas escasas e irregulares, propias de un clima mediterráneo, motiva el aprovechamiento de diferentes floraciones a lo largo del año. De esta manera, se amortiza la inversión y los elevados costes que las explotaciones de tamaño grande conllevan.

Las condiciones de explotación características de la Comunidad Valenciana dan lugar a la obtención de distintos tipos de mieles monoflorales, entre los que cabe destacar especialmente las de azahar y romero, y otras como tomillo, espliego y girasol. Tal es la importancia de las mieles de azahar y romero en la Comunidad Valenciana, que existe una marca de calidad para ambos tipos mieles de (Comunidad Valenciana, DOGV núm. 4167, 2002).

3. Recolección y procesado de la miel

Una miel de calidad es el resultado del trabajo de las abejas para producirla, y de la intervención del hombre para extraerla de la colmena y ponerla a disposición del consumidor. Por este motivo, para obtener un buen producto es de vital importancia prestar mucha atención y tener un buen control de todas aquellas tareas llevadas a cabo por el hombre desde que la miel es recolectada hasta que llega al consumidor.

3.1. Trabajo apícola

El apicultor no sólo debe ser poseedor del arte de conducir las abejas para obtener de ellas la máxima eficacia productiva, sino que además debe ser capaz de conservar íntegras las características del producto para ofrecerlo tal y como lo ha obtenido de las abejas. De esta manera, el objetivo final que debe perseguir el apicultor, es el de obtener un producto rentable que responda a las exigencias del mercado, pero a su vez, intentando que durante su manipulación mantenga sus características intrínsecas mínimamente alteradas (Bueno et al., 2005).

La operación de recolección de la miel sólo se debe realizar cuando ésta llega a su punto óptimo. El néctar es un líquido brillante, poco viscoso, con un porcentaje de humedad que varía entre el 70 y el 90%, y con un aroma que poco recuerda al de la miel. Sin embargo, sufre un proceso de pérdida de humedad gracias al secado realizado por las abejas al batir sus alas, y de transformación de los azúcares por los enzimas aportados en sus glándulas. Una vez el néctar se ha transformado en miel, las abejas cierran las celdas del panal dejándola en su

interior. Es entonces cuando el apicultor debe extraer el producto de los panales (Benedetti y Pieralli, 1990).

Condiciones del lugar de extracción

La miel es un producto alimenticio, y como tal, requiere durante su manipulación de una higiene cuidadosa. Además, por su naturaleza puede absorber del ambiente tanto la humedad como los olores y retener polvo u otro material ligero con el que llegue a estar en contacto.

Es por ello, que el lugar destinado a la extracción de la miel debe estar destinado solo para esta operación, debe estar iluminado y aireado, con una humedad relativa alrededor del 60% y a una temperatura cercana a los 30ºC. Además, el local debe estar dotado del equipamiento necesario para la desoperculación, extracción, decantación y envasado.

Desoperculado

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. Antes de proceder a ello es necesario calcular el grado de humedad de la miel, procurando que sea inferior al 18%. La temperatura no debe superar los 38ºC si se quiere que la miel conserve sus características organolépticas (Piana et al., 1988).

Figura I.9. Proceso de extracción de miel de un panal.

Extracción de la miel de los panales

La extracción de la miel de los panales se puede realizar por métodos diferentes, con resultados distintos en cuanto a su calidad. Los procedimientos de extracción se pueden reducir a los tres siguientes:

Extracción por decantación o escurrimiento: la miel que se obtiene por este método procede de la decantación de los paneles desoperculados y sin larvas. Este procedimiento se aplica inmediatamente después de haber sacado los paneles, cuando la miel aún está caliente y escurre con facilidad. Se ponen los paneles encima de un tamiz fino y se frotan contra él a mano. La miel fluye y se recoge en recipientes colocados debajo del tamiz. Empleando los paneles mejores y más blancos, se obtiene un producto que recibe el nombre de "miel virgen".

Extracción por prensado: se obtiene por el prensado de los paneles, sin larvas, sin calentamiento o calentamiento moderado. Con el prensado, los panales de cera son destruidos, no pudiéndose utilizar de nuevo en las colmenas. Este método de extracción es poco utilizado, tan sólo se emplea en mieles con una alta viscosidad, que dificulta su extracción por centrifugación.

Extracción por centrifugación: con este método, la miel se obtiene por la centrifugación de los paneles desoperculados, sin larvas. Es prácticamente el único método que se utiliza en la actualidad. En las colmenas de cuadros se efectúa la extracción por este método. Se comienza desoperculando las celdas que contienen la miel; después se ponen los paneles en las centrífugas y se verifica la extracción. La fuerza centrifuga hace que la miel salga de las celdas, atraviese una tela metálica y vaya a un recipiente donde se recoge por gravedad. Realizando la extracción de la miel mediante este método, se obtiene un rendimiento mayor al de cualquier otro.

Las mieles que se obtienen fríamente por decantación o centrifugación, son más valoradas que las que se obtienen por prensado y aplicación de calor.

Figura I.10. Equipamiento industrial utilizado para la extracción del miel de los panales.

Decantación

La decantación se realiza con la finalidad de eliminar las burbujas de aire ocluidas en la miel y de separar de la miel las diferentes impurezas y restos (cera, abejas, etc.) que puedan quedar después de la extracción. Por diferencia de densidad, estos restos quedan en la parte superior y se pueden eliminar fácilmente. El tiempo de decantación puede oscilar desde los pocos días hasta 1 mes, aproximadamente.

3.2. Tareas industriales

Una vez que el apicultor ha extraído la miel de los panales, tiene lugar el procesado de la miel, el cual implica una serie de operaciones realizadas en la industria o cooperativa. Éstas tienen como finalidad convertir la miel en un producto óptimo para el mercado, manteniendo en la medida de lo posible sus características originales.

Generalmente la miel llega a las industrias de procesado en bidones, los cuales son analizados y almacenados, para posteriormente poder conformar los lotes de producción. Una vez seleccionados los bidones que van a formar un lote de producción, las fases industriales serán las siguientes:

3.2.1. Licuación

La licuación es una operación que se lleva a cabo para facilitar el manejo de la miel, poder transvasarla, fraccionarla, mezclarla y posteriormente envasarla.

El licuado se realiza mediante calentamiento, elevando la temperatura de la miel hasta los 40-55 ºC, por un tiempo que generalmente varía entre 2 y 4 días.

El proceso de licuado comprende dos fases diferenciadas: la fluidificación y la fusión propiamente dicha. Tras la primera, la miel cristalizada en una masa sólida y compacta, se convierte en un líquido denso, suficientemente fluido como para ser vertido, bombeado o trasvasado. Sin embargo puede tener en suspensión cantidades más o menos grandes de cristales sólidos, no licuados. En la segunda fase, toda la miel del lote es recogida en un recipiente provisto de un agitador lento y sometido a un moderado calentamiento, lo que facilita que se homogenice toda la miel y se fundan los cristales.

3.2.2. Pasteurización

La pasterización es un proceso, que se realiza después de la licuación, sometiendo la miel a un choque térmico, mediante el cual se destruye la mayor parte de las estructuras cristalinas iniciales que favorecen la total o parcial cristalización de la miel, permitiendo que ésta permanezca líquida durante más tiempo.

El principal objetivo de la pasteurización es retrasar, durante la comercialización, los fenómenos de la cristalización y la posterior fermentación, de manera que la presencia del producto de cara al consumidor sea la mejor posible a lo largo del tiempo. Además, también se reduce la carga de microorganismos, especialmente los mohos y las levaduras, por efecto de la temperatura.

La pasterización puede modificar, en mayor o menor medida, las características originales de la miel. Si no se hace de forma adecuada, puede disminuir la riqueza aromática y producir la pérdida de sabores, incluso llegar a producir una parcial caramelización de los azúcares. Así mismo, se puede producir el oscurecimiento de tonalidad de la miel, aumentar el contenido en hidroximetilfurfural y se la destrucción de enzimas. Sin embargo, si el proceso de pasterización está bien hecho y la materia prima es buena, se pueden obtener mieles líquidas que conserven gran parte de las características intrínsecas de la miel, sin un importante aumento del HMF y disminución de enzimas.

3.2.3. Envasado

El envasado es la última operación a la que se somete la miel antes de ser presentada al consumidor. La miel para consumo doméstico se suele envasar en recipientes de vidrio, plástico no poroso o cartón parafinado. Además del material que se emplee, hay que tener en cuenta que la miel debe estar aislada del aire, el recipiente debe ser higiénico y debe tener un cerrado hermético.

Figura I.11. Etapa de envasado de miel.

Los envases para venta al público no suelen exceder del kg, aunque en las industrias de miel manejan recipientes para uso industrial de tamaño muy superior, como pueden ser los cubos de 25 kg, los propios bidones (500 kg) o los recipientes IBC plásticos de 1250 kg de capacidad. Estos tamaños de gran cubicaje sólo son utilizados para comercio a granel para hostelería o industria pastelera.

3.2.4. Almacenamiento y conservación

El almacenamiento y conservación de la miel no se puede considerar estrictamente como parte de su procesado. Sin embargo, hay que tener muy en cuenta las condiciones de almacenamiento una vez envasada para que la miel mantenga el mayor tiempo posible sus características originales.

Los dos factores a considerar en el almacenamiento son la humedad relativa y la temperatura. Es aconsejable mantener la miel en ambiente fresco ya que los procesos enzimáticos se reducen al mínimo y se retrasa la cristalización.

4. La miel y otros productos de la colmena

4.1. ¿Qué es la miel?

La miel es una solución de agua y azúcar, que las abejas recogen de los nectarios, transportan a la colmena en una zona especial de su aparato digestivo llamado "estómago social", y finalmente transforman gracias a sus aportaciones de enzimas y a un proceso de maduración en la colmena (Figura I.12) (Calatayud, 2002)

Figura I.12. Abejas trabajando en el panal.

Como se ha comentado anteriormente la transformación del néctar en miel es un proceso de concentración en el que se reduce el contenido de agua desde un 70-90% hasta un porcentaje que varía entre el 15% y el 18% aproximadamente. Se trata de un proceso físico, además de un proceso químico en el que se reduce la sacarosa, transformándose en fructosa y glucosa, mediante la enzima invertasa contenida en la saliva de las abejas (Bueno et al., 2005). La proverbial laboriosidad de las abejas es fundamental en este proceso. Como muestra cabe destacar que para recoger el suficiente néctar para producir un kilogramo de miel (Figura I.13) son necesarios una media de 50.000 vuelos. Esto implica haber visitado millones de flores y cargar en su "estómago social" un volumen de néctar en cada viaje que puede llegar a representar el 90% de su peso.

Figura I.13. Miel, resultado de un laborioso proceso.

La miel no es una mezcla de componentes que se almacenan de forma inerte, sino un conjunto de nutrientes sometidos a unas interacciones y a unas condiciones ambientales que la modelarán como un alimento de calidad.

La miel, pues, es un producto biológico muy complejo que varía notablemente en su composición como consecuencia de la flora de origen, de la zona, de las condiciones climáticas etc. (Piana et al., 1988).

4.2. Tipos de miel

Estrictamente hablando, deberíamos hablar de mieles y no de miel, ya que hay una amplia variabilidad en las características de este producto, directamente relacionadas con factores diversos como son las características climáticas y edáficas del terreno (Juan-Borrás et al., 2014), la manipulación por parte del apicultor, la flora de cada zona de producción, el tipo de manipulación industrial a la que es sometida, entre otros.

Figura I.14. Diferentes tipos de miel.

Según el origen botánico de las plantas que liban las abejas, las mieles se pueden clasificar en:

- Mieles monoflorales: son aquellas en cuya composición domina el néctar de una determinada especie vegetal. Por ejemplo, la miel de azahar o la miel de romero se obtienen por libación, principalmente, de las flores de los géneros Citrus y Rosmarinus, respectivamente.
- Mieles multiflorales o "milflores": estas mieles resultan de la libación de plantas muy diversas, sin que ninguna de ellas predomine sobre las otras en un porcentaje suficiente.
- Mieles de mielada: son las producidas por la transformación que hacen las abejas de sustancias azucaradas segregadas por las plantas o por los seres vivos que habitan en ellas; por ejemplo: mieles de encina, roble, carrasca.

4.3. Propiedades beneficiosas de la miel

La miel se ha utilizado a lo largo de la historia, en muchas civilizaciones y culturas antiguas, con fines alimentarios y medicinales. Las numerosas propiedades biológicas encontradas en la miel, la convierten en un producto complementario de la alimentación humana. La aportación energética, con azúcares de asimilación directa, la hacen muy indicada en la práctica de deportes o de ejercicio físico, porque mejora la resistencia física y favorece la recuperación. Así mismo se han descrito también efectos beneficiosos sobre el sistema circulatorio, el hígado, los intestinos (laxante), los riñones y las vías urinarias (diurética) (Oroian y Escriche, 2015).

Diversos investigadores han comprobado el poder antibacteriano de la miel, debido fundamentalmente a su alta concentración de azúcares, la presencia de peróxido de hidrógeno y a diversas sustancias (ácidos orgánicos, flavonoides, etc.) conocidas como "*inhibinas*".

La miel se utiliza como cicatrizante para la curación de llagas y heridas. De hecho, en la actualidad existen hospitales como el de Limoges, en Francia, en el que se utiliza la miel para la curación incluso de heridas quirúrgicas y quemaduras de forma sistemática y protocolizada.

La miel también puede actuar como expectorante y calmamente de la tos, ayudando a combatir infecciones, promoviendo la regeneración de las mucosas y mejorando el estado anímico general (Calatayud, 2002). Estas propiedades se deben fundamentalmente a la presencia de componentes volátiles (especialmente terpenos), azúcares y su poder antiséptico.

Actualmente, entre sus propiedades más destacadas cabe destacar su poder como fuente de antioxidantes naturales, una de las principales razones por las que su consumo es recomendado (Escriche et al., 2014; Oroian y Escriche, 2015).

4.4. Otros productos de la colmena

Además de la miel, de la colmena se obtienen otros productos como la jalea real, el polen, el propóleo, la cera, todos ellos muy apreciados en la actualidad por sus características nutricionales, farmacológicas y cosméticas

4.4.1. La jalea real

La jalea real es una sustancia fluida, con apariencia similar a la leche condensada, de color blanquecino y sabor ácido. Se trata de una secreción producida por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras jóvenes cuando tienen entre los 5 y 14 días de edad.

Durante los dos primeros días de vida, las larvas de toda la colmena se alimentan exclusivamente de esta sustancia. A partir del tercer día las larvas obreras son alimentadas con una papilla de miel, polen y agua, mientras que las reinas reciben jalea real durante toda su existencia. Como consecuencia de esta diferencia en la alimentación, las abejas reinas tienen un tamaño mucho mayor que las obreras, viven alrededor de 4 años y son fértiles, mientras que las obreras no superan nunca los 140 días de vida y no son fértiles.

Figura I.15. Jalea Real.

4.4.2. El polen

Las abejas recolectan el polen de la parte masculina de las flores, lo mezclan con un poco de néctar y lo transportan a la colmena en su tercer par de patas, especialmente adaptado para ello.

El polen es el alimento principal de la colmena, básico en el desarrollo de las larvas de abeja gracias a su riqueza en proteínas (20%-30%). También es rico en aminoácidos, minerales, vitaminas, enzimas, reguladores del crecimiento, ácidos grasos, ácidos orgánicos y flavonoides.

Figura I.16. Polen

El polen es considerado uno de los componentes alimenticios de más rápido efecto sobre el organismo humano. Sus propiedades revigorizantes se deben a su intensa acción estimulante, que algunos consumidores regulares no dudan en definir como extraordinaria. Es recomendado especialmente para casos de: anemia, ya que aumenta el número de glóbulos rojos; mujeres embarazadas y lactantes; personas débiles convalecientes y para personas que realizan grandes esfuerzos físicos y mentales.

En resumen, el polen desintoxica, reequilibra, estimula y tonifica. Se recomienda que sea ingerido en estado natural o mezclado con miel, agua, jugos de fruta o té.

4.4.3. El propóleo

El propóleo es uno de los productos más sorprendentes de la colmena. Es una sustancia compuesta por ciertas resinas vegetales, que son recogidas por las abejas de las yemas de los árboles y tratadas con ciertas secreciones propias, resultando un balsámico resinoso que contiene principalmente cera y aceites esenciales.

Figura I.17. Paneles con propóleos.

La palabra propóleo se deriva del griego *pro*- "para" o " en defensa de"- y *polis*- "ciudad", o sea, "defensa de la ciudad" (o la colmena). Así, es utilizado en la colmena con fines múltiples, como pueden ser cerrar las grietas en el interior de la colmena, construir obstáculos para impedir la entrada de los enemigos, embalsamar los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena y que las abejas no pudieron sacar debido al volumen. El propóleo tiene como propiedad fundamental su efecto bactericida y al recubrir de éste los cadáveres (embalsamarlos) evitan que estos se descompongan dentro de la colmena.

El propóleo tiene un aspecto y olor resinoso, un color que puede variar ampliamente, dependiendo de la planta de origen, desde el amarillo rojizo hasta el negro y un sabor amargo ligeramente picante. Su composición varía con las diferentes regiones geográficas en relación con el clima y sobre todo con las

fuentes vegetales. Las aplicaciones de los propóleos son diversas. Se emplean en la fabricación de cosméticos, productos de parafarmacia, medicamentos, etc.

4.4.4. La cera

La cera es una sustancia segregada por las glándulas ceríferas, situadas en posición ventral, de las abejas domésticas durante el segundo periodo de su fase adulta. Es un producto de color blanco, tacto aceitoso y cuyo olor recuerda al de la miel. Las abejas la usan para construir los alvéolos hexagonales de sus panales, estructurándolos de forma rígida y eficiente para conservar la miel y el polen. Su composición es bastante compleja, ya que contiene un conjunto de sustancias heterogéneas pertenecientes al grupo de las grasas.

Figura I.18. Bloque de cera limpia.

La cera es segregada en forma líquida por las abejas, solidificándose a la temperatura interior de la colonia en forma de escamas, siendo su temperatura de fusión de 64-65ºC.

La mayor parte de esta sustancia se aprovecha en la producción de cera estampada para construir nuevas colmenas; también se usa en la fabricación de velas, cosméticos y moldes de cirugía dental, como ingrediente o soporte en productos específicos para la industria cosmética, la farmacéutica, en medicina, en fabricación de pinturas, productos de limpieza, etc.

5. Composición química de la miel

Desde el punto de vista composicional, la miel es básicamente una solución acuosa concentrada de azúcar invertido, que contiene además, una mezcla muy compleja de otros hidratos de carbono, ácidos orgánicos, proteínas, minerales, y otros componentes minoritarios.

5.1. Agua

La miel es un alimento de humedad intermedia. Su contenido en agua puede oscilar entre un 13 y un 25% dependiendo de las condiciones climáticas, estación del año, humedad original del néctar y grado de maduración alcanzado en la colmena, aunque es recomendable que no supere el 18%.

El contenido en agua de la miel es, sin duda, una de sus características más importantes, ya que influye de manera decisiva en parámetros como el peso específico, la viscosidad, el sabor, la palatabilidad o la solubilidad. Por ello, la cantidad de agua en la miel, condiciona de manera decisiva su conservación, ya que es en la fase acuosa de la misma donde se llevan a cabo la mayoría de las reacciones de transformación y alteración.

La disponibilidad del agua en la miel puede variar como consecuencia de los fenómenos de cristalización. Cuando la miel cristaliza se origina una separación de fases, provocando un aumento de la actividad de agua en la capa superior. Cuando el contenido en agua supera el 18%, pueden aparecer los primeros problemas de fermentación, si bien ésta dependerá también de otros factores como la carga microbiana inicial, el tiempo y la temperatura de almacenamiento.

Por todo ello la ley establece que las mieles comerciales no deben tener un porcentaje mayor del 20%, porcentaje que puede llegar al 23% en mieles de brezo Calluna y mieles para uso industrial (España, BOE núm. 186, 2003).

5.2. Azúcares

Los azúcares constituyen los componentes mayoritarios de la miel, representando el 95-99% de la materia seca y entre el 80 y 82% del total. A ellos se les atribuye las principales características sensoriales y fisicoquímicas de la miel: sabor, viscosidad, granulación, higroscopicidad, poder rotatorio, etc. La proporción de los azúcares de la miel es muy distinta a la del néctar, en el que la sacarosa es el azúcar mayoritario. Es durante la maduración y almacenamiento del néctar cuando, como consecuencia de diversos procesos enzimáticos tiene lugar transformación del néctar en miel.

Los monosacáridos, fructosa y glucosa, son los azúcares más importantes de la miel, constituyendo el 85-95% de los azúcares totales. En general la fructosa (33-42%) es más abundante que la glucosa (27-36%). El contenido de sacarosa es generalmente inferior al 3%, mientras que el de maltosa puede alcanzar el 7%. También puede haber presentes otros polisacáridos, pero en magnitudes menores.

5.3. Ácidos

La miel es un producto ácido, debido a la presencia tanto de ácidos orgánicos como ácidos inorgánicos, oscilando su pH entre valores de 3.2 y 4.5. Los ácidos intervienen en las propiedades organolépticas de la miel ya que ayudan a otorgarle aroma, si bien no llegan a ser apreciados al estar enmascarados por los azúcares.

El ácido más importante es, con mucho, el ácido glucónico, que se forma a partir de la glucosa por acción enzimática. El origen de los demás ácidos es todavía incierto, aunque parece que algunos proceden del néctar o del mielato, mientras que otros se forman mediante procesos enzimáticos y fermentativos.

5.4. Proteínas

La miel tiene un contenido en proteínas muy bajo. Su presencia está ligada, al menos en parte, a los granos de polen que se encuentran en ella. El mayor porcentaje se da en las mieles de prensado, actualmente poco comunes, ya que son las más ricas en sustancias nitrogenadas. El contenido en nitrógeno de las mieles centrifugadas es aproximadamente del 0.04%, que corresponde al 0.26% de proteína.

5.5. Minerales

El contenido en minerales en la miel es minoritario, oscila entre 0.1-0.2%, y varía notablemente con relación al origen botánico, a las condiciones edáfico-climáticas y a las técnicas de extracción. En general, las mieles de mielada tienen una mayor cantidad de minerales que las mieles florales.

El elemento dominante es el potasio seguido de cloro, azufre, sodio, calcio, fósforo, magnesio, manganeso, silicio, hierro y cobre (Piana et al., 1988).

5.6. Otros componentes de la miel

Como todas las sustancias naturales, la miel contiene una gran variedad de componentes orgánicos. De gran importancia son los componentes volátiles, representados sobre todo por alcoholes, aldehídos, cetonas y éteres. Algunos de

estos componentes son muy lábiles y dependiendo a las condiciones ambientales a las que son sometidos pueden desaparecer, principalmente a consecuencia de un excesivo recalentamiento o de una inadecuada conservación. Las mieles mantenidas durante algunos años a temperatura ambiente pierden el aroma natural y se vuelven muy semejantes entre sí por la presencia de productos de degradación, desagradables al paladar.

Las vitaminas están presentes en cantidades mínimas y parece que provienen esencialmente del polen. Las de mayor representación son la vitamina A, la vitamina E y la vitamina K. También han sido descubiertos pequeñas cantidades de vitamina C, B1 (tiamina), P.P (ácido nicotínico) y vitamina B2 (riboflavina).

La miel contiene enzimas, tanto de origen vegetal como animal; las más importantes son la diastasa o amilasa (hidroliza el almidón en glucosa) y la invertasa o sacarasa (hidroliza la sacarosa en glucosa); ambas son inestables al calor (sobre todo la invertasa) y se deterioran con el tiempo. Existen también glucosidasas (que transforman la glucosa en ácido glucónico), catalasas y fosfatasas.

Otros componentes minoritarios de la miel son los pigmentos. Su presencia está directamente relacionada con el origen botánico de la miel, contribuyendo decisivamente en sus características sensoriales y por lo tanto en su valor comercial.

6. La calidad de la miel

La miel de abejas está considerada un producto natural por excelencia, sin embargo en los últimos años está sufriendo los efectos de la industrialización y de la producción agrícola. Los estándares internacionales definidos para la miel de abejas en la reunión del comité del Codex Alimentarius de la FAO-OMS, en 2001 (Codex Standard, 2001), están siendo de gran relevancia en el mercado internacional y por lo tanto están constituyendo la base de los intercambios mundiales de este producto. Los elementos "objetivos" de la calidad de la miel de abejas son extremadamente simples y válidos para todos los países que la comercializan:

1. Higiene: la miel de abejas no debe contener sustancias ni microorganismos nocivos.

2. Frescura: la miel debe mantener sus características naturales intrínsecas; su pérdida se debe fundamentalmente a los procesos de industrialización con tratamientos térmicos excesivos y al largo tiempo de almacenaje.

3. Genuinidad: la miel de abejas no debe adulterarse.

6.1. Aspectos comerciales

6.1.1. El color de la miel

La tonalidad exterior de la miel es uno de los parámetros físico-químicos más característicos, de vital importancia a la hora de su adquisición por parte del consumidor. Existe gran variabilidad de intensidades, desde mieles prácticamente incoloras hasta mieles con tonalidades negras, tal y como se puede apreciar en la figura I.19.

Figura I.19. Mieles de diferentes colores

El color de la miel depende de muchos factores como pueden ser el origen floral y la composición físico-química, las características climatológicas y ambientales, la presencia de compuestos pigmentarios, el estado de maduración, las presencia de impurezas, etc.

A pesar de la importancia que tiene este parámetro a la hora de comercializar la miel, la legislación española no señala ningún método oficial para su caracterización. En las industrias utilizan un comparador colorimétrico Pfund, basado en una escala de colores estandarizada, y sirve de guía para hacer las mezclas de los diferentes lotes de miel.

6.1.2. La cristalización

La cristalización de la miel es un fenómeno natural de gran importancia para el sector de envasado de miel, ya que puede ser motivo de rechazo por parte del consumidor. En el momento de su extracción todas las mieles son fluidas, sin embargo, con el paso del tiempo tienden a solidificarse. El fenómeno de cristalización sucede cuando la glucosa precipita en forma de cristal.

La cristalización espontánea es un fenómeno indeseado. Sin embargo, la cristalización controlada se utiliza comercialmente para obtener la denominada "miel crema", apreciada por muchos consumidores por su untabilidad, fineza y suave consistencia.

Figura I.20. Miel cristalizada.

La tendencia de la miel a cristalizar depende fundamentalmente del contenido de glucosa, del nivel de humedad y de la temperatura. No todas las mieles cristalizan con igual rapidez, algunas lo hacen a los pocos días de su recolección (girasol) y otras, incluso al cabo de años (anís). Adicionalmente, la cristalización puede ser estimulada por cualquier partícula pequeña de polvo, polen, pedacitos de cera o propóleo, burbujas de aire, que están presentes en la miel.

El proceso de cristalización puede ser retrasado, con un apropiado almacenamiento, manteniendo la miel a una temperatura de almacenaje controlada. Temperaturas por debajo de 10ºC previenen la cristalización, temperaturas entre 10 y 21ºC generalmente la promueven, temperaturas entre 21 y 27ºC disminuyen el riesgo de cristalización pero degradan la miel y temperaturas superiores a los 27ºC evitan la cristalización pero aceleran su degradación.

El tratamiento de pasterización (aprox. 75ºC, durante varios minutos) tiene entre sus objetivos retrasar la cristalización de las mieles al reducir la presencia de cristales, que actuarán posteriormente como núcleos de cristalización.

6.2. Aspectos sanitarios

6.2.1. Microbiológicos

La miel es un alimento muy estable desde el punto de vista microbiológico. Sin embargo, por tratarse de un producto de origen animal presenta una flora microbiana propia, que es capaz de alterarlo adaptándose a las condiciones poco favorables propias de este: pH ácido, humedad y actividad de agua bajas, viscosidad elevada, concentración en azúcares, presión osmótica altas, etc.

El escaso desarrollo microbiano en la miel también es debido a la presencia de componentes antimicrobianos, derivados de su actividad enzimática, como es el caso del peróxido de hidrógeno (producido por las catalasas) y de elementos termo resistentes con actividad antimicrobiana.

La principal fuente de microorganismos de la miel es la flora bacteriana fúngica propia de las abejas y las contaminaciones producidas por manipulaciones poco higiénicas llevadas a cabo por el hombre durante el proceso de extracción y procesado posterior, además del viento y de otros insectos.

El desarrollo de mohos y levaduras en la miel favorece su fermentación, lo que repercute en el rechazo por parte del consumidor y en importantes pérdidas económicas para el sector. De hecho, la fermentación es la principal causa de alteración durante el almacenamiento. La fermentación de la miel es consecuencia de la actuación de distintos tipos de levaduras, fundamentalmente osmófilas del género *Sacharomyces*, junto con otros factores como el tiempo y la temperatura de almacenamiento, pero especialmente de la humedad. En general una humedad superior al 18% implica un riesgo claro de posible fermentación de la miel.

En cuanto a contaminación cruzada se refiere, puede presentar una flora microbiana compuesta por microrganismos del género *Bacillus*, generalmente esporulados, aunque en mieles frescas se pueden encontrar formas vegetativas que se comportan como gérmenes inertes, no alterantes y no toxigénicos.

En casos puntuales se han detectado microorganismos peligrosos para la salud humana como el *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, *Bacillus cereus*, o incluso *Clostridium botulinum* tipo G. Las esporas de clostridium no causarían enfermedad al hombre salvo en circunstancias particulares, especialmente en niños menores de 1 año. Por este motivo es obligatorio indicar en la etiqueta que no es aconsejable el consumo de mil en niños menores de esta edad.

6.2.2. Residuos químicos

En los últimos años los productos de la colmena, en ocasiones, han estado en el punto de mira de las alertas alimentarias por su repercusión en la salud pública. La miel, cera, polen, propóleos, etc. pueden contener sustancias químicas contaminantes que constituyen uno de los principales caballos de batalla para sector. El origen de estos residuos son los tratamiento veterinarios y agrícolas.

1. Los tratamientos veterinarios (con acaricidas, sulfamidas, antibióticos, etc., necesarios para tratar las enfermedades y parásitos de las abejas). De hecho, uno de los problemas más importantes para la apicultura mundial es el ocasionado por la Loque americana (AFB) (producida por el bacilo Paenibacillus larvae) y la Loque europea (EFB) (producida por la bacteria no esporulante Melissococcus) ya que ocasionan la muerte de las larvas y pupas de las abejas melíferas (Hammel et al., 2008). Para su tratamiento se utilizan compuestos de la familia de las sulfamidas y de las tetraciclinas (Juan-Borrás et al., 2015).

2. Los tratamientos agrícolas con plaguicidas (fundamentalmente los neonicotinoides con los que las abejas se ponen en contacto cuando recolectan néctar en cultivos próximos a la colmena). Un informe de la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, ha confirmado esta realidad; destacando el impacto de los plaguicidas (tanto los que se aplican directamente como los que difunden por todas las partes de las plantas llegando a las flores, polen y néctar) sobre la salud de las abejas, y la población al consumir los productos de la colmena (European Food Safety Authority, 2013).

6.3. La frescura de la miel

La ley obliga a que la miel llegue al consumidor lo más fresca posible y con sus características intrínsecas mínimamente alteradas. Por ello, es necesario medir la frescura de la miel. De esta manera, se evitará la aparición en el mercado de partidas viejas o procedentes de países cálidos y con escasos controles de calidad.

Desde la recogida en los panales, hasta su envasado, la miel puede estar expuesta a una serie de condiciones que provocan, en mayor o menor medida, el deterioro de sus cualidades intrínsecas. Durante la conservación posterior al envasado se van perdiendo estas cualidades, de manera que con el paso del tiempo la frescura que tenía en su origen va desapareciendo paulatinamente.

El "grado de frescura" de la miel refleja el posible deterioro de las características que tenía en el momento de su recolección. Según la Normativa española, éste viene fijado por dos factores: la actividad diastásica y el contenido en hidroximetilfurfural (España, BOE núm. 186, 2003).

6.3.1. Actividad diastásica

La función más importante de las enzimas es la conversión del néctar en miel, al hidrolizar la sacarosa presente en el mismo, obteniendo glucosa y fructosa. Entre estos enzimas, los más importantes son la invertasa o sacarasa y la diastasa.

A consecuencia del envejecimiento de la miel y del calor, estas dos enzimas se degradan con facilidad, siendo mayor en mieles con alto contenido acuoso. La diastasa pierde la mitad de su contenido en 17 meses cuando la miel ha estado a temperatura ambiente, mientras que la degradación de la invertasa en las mismas condiciones es aún mayor. A pesar de este hecho, determinados estudios (Serra-Bonvehí, et al., 2000; Tosi et al., 2007) han seleccionado la diastasa como mejor índice enzimático del grado de envejecimiento de la miel, al ser ésta el doble de estable. Además, la actividad de la invertasa depende más del manejo llevado a cabo por parte de los apicultores que del tratamiento dado a la miel.

En la Norma de Calidad para la miel, se señala un mínimo de 8º en la escala Gothe para la actividad diastásica, excepto para aquellas mieles con bajo contenido enzimático, que pueden tener un valor mínimo de 3º en la misma escala, siempre que el valor de hidroximetilfurfural no sea superior a 15 mg/kg.

6.3.2. Contenido en hidroximetilfurfural

El hidroximetilfurfural es un aldehído cíclico que se forma a temperatura ambiente por deshidratación de la fructosa en medio ácido (Figura I.21). Este proceso, que se produce de forma natural en la miel debido a que el pH medio es ácido (alrededor de 3.9), se ve acelerado si la miel ha sido calentada o almacenada a altas temperaturas de manera que, la concentración de HMF está en relación directa con el grado de calor al que ha sido sometida la miel y con su grado de envejecimiento (Fallico et al., 2004).

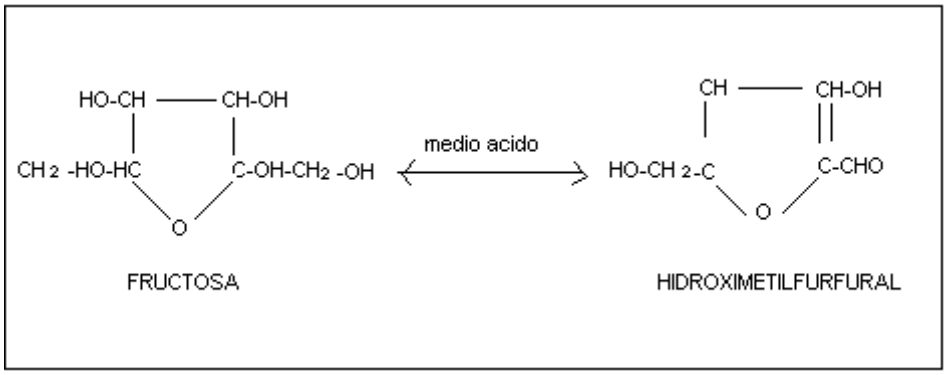


Figura I.21. Formación del hidroximetilfurfural a partir de la fructosa.

Normalmente, el contenido en hidroximetilfurfural en la miel recién cosechada suele ser nulo, ya que esta miel ha sido depositada en los panales por las abejas y proviene de un néctar recientemente segregado por las plantas. Sin embargo, durante el procesado, la miel es sometida a una serie de calentamientos con el objetivo de fluidificarla, retrasar su cristalización y evitar posibles fermentaciones, que provocan que el contenido de HMF aumente.

Es muy importante la relación existente entre la temperatura de calentamiento y el tiempo durante el cual se aplica éste, en relación con el aumento del hidroximetilfurfural, de ahí la importancia del control de las diferentes etapas desde que la miel es recolectada hasta que llega a los expositores de venta. Una vez la miel es envasada, el aumento de HMF va a depender de las condiciones de almacenamiento.

Según la Norma (España, BOE núm. 186, 2003), se prohíbe vender mieles con un contenido en HMF superior a 40 mg/kg, por esta razón los envasadores no suelen comercializar mieles con valores de HMF superiores a 15 mg/kg. No existe un periodo de caducidad para la miel, aunque la mayoría de productores indican en los envases una fecha de consumo preferente de 18 meses a partir de la fecha de expedición. Dentro de este periodo el envasador es responsable de que la miel mantenga todas las características sin salirse de los límites que marca la Norma.

Por último, cabe señalar, que el hidroximetilfurfural es una sustancia que en los niveles legalmente permitidos en la miel no supone ningún riesgo para la salud humana, si bien a concentraciones mayores puede incluso llegar a ser tóxico (De Lorenzo y Guadalix, 2002).

En definitiva, desde el punto de vista de la frescura de la miel, su manipulación conlleva una serie de inconvenientes, ya que como se ha comentado anteriormente tanto el paso del tiempo como la temperatura son factores que afectan decisivamente en el deterioro de las propiedades beneficiosas de la miel. El HMF es el parámetro que generalmente se utiliza para evaluar la pérdida de calidad de la miel, pero no existe una regla definida que permita conocer como aumenta este parámetro al someter las mieles a unas condiciones determinadas. De esta manera, para preservar al máximo sus características intrínsecas, sería interesante poder predecir su grado de frescura en función de las condiciones de tiempo y temperatura a las que se someta desde su recolección hasta su envasado.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II. Objetivos y plan de trabajo

1. Objetivo general

Evaluar la influencia que, en la variación de la calidad de las mieles tiene el tiempo y la temperatura de exposición, tanto para condiciones correspondientes a su procesado industrial como previas a él.

2. Objetivos específicos

1. Seleccionar los parámetros y las condiciones experimentales que permitan evaluar la calidad de las mieles en función de las condiciones de tiempo y temperatura de exposición.

2. Evaluar el comportamiento de los parámetros de calidad seleccionados, en mieles sometidas a las condiciones correspondientes tanto a las etapas del proceso industrial (licuación y pasteurización) como a las de almacenamiento previo al mismo.

3. Seleccionar el parámetro idóneo a partir del cual se pueda obtener un modelo de predicción de la calidad de las mieles, conociendo las condiciones de tiempo/temperatura a las que una miel puede estar expuesta.

3. Plan de trabajo

1. Revisión bibliográfica y de la legislación vigente.

2. Puesta a punto de métodos analíticos:
   - Melisopalinológico o polínico.
   - Parámetros fisicoquímicos: hidroximetilfurfural (HMF), acidez, humedad, conductividad y actividad diastasa.
   - Color.
   - Análisis microbiológicos.
   - Viscosidad de la miel.
   - Análisis de la fracción volátil de las mieles.

3. Selección de los diferentes tipos de miel a evaluar.

4. Diseño y aplicación a escala de laboratorio de tratamientos tiempo/temperatura que simulen las condiciones industriales.

5. Análisis de los diferentes parámetros de calidad en las mieles sometidas a los tratamientos tiempo/temperatura propuestos.

6. Selección del parámetro/s de calidad que permitan predecir la calidad de las mieles a partir de modelos cinéticos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. Materiales y métodos

1. Materia prima

Para la realización de este trabajo se utilizaron mieles de diferentes orígenes botánicos, adquiridas todas ella en empresas apícolas de la Comunidad Valenciana, o bien directamente de apicultores conocidos, con el fin de garantizar su frescura y procedencia. En la Tabla III.1 se detallan las variedades empleadas en los diferentes estudios realizados junto con el nombre científico de la especie botánica del polen predominante.

Tabla III.1. Variedades de mieles utilizadas.

Variedad de miel	Especie botánica del polen predominante
Limón	*Citrus limon*
Azahar	*Citrus sp*.
Romero	*Rosmarinus officinalis*
Eucalipto	*Eucaliptus sp*
Milflores	-
Mielada	*HDE (esporas de hongos, hifas y algas) y otros*

Cuando las muestras llegaban al laboratorio, eran sometidas a una rigurosa inspección visual para eliminar partículas sólidas como restos de panal, abejas, pequeños residuos, etc. Posteriormente eran conservadas a una temperatura constante de 20ºC hasta que eran utilizadas para la experimentación, la cual se llevaba a cabo lo antes posible para evitar el envejecimiento de las mieles.

2. Análisis Melisopalinológico

El análisis polínico se llevó a cabo en todas las mieles sometidas a estudio, con la finalidad de diferenciarlas y clasificarlas atendiendo a su origen botánico. Para ello se determinó el porcentaje mayoritario de los pólenes presentes en las muestras siguiendo el método descrito por la "International Commission for Bee Botany" (Von Der Ohe et al., 2004).

Se pesaban 10 g miel en un vaso de precipitados de 50 mL y se añadían 20 mL de agua acidulada (H_2SO_4, al 5%), después se ponía en agitación a 40ºC.

Posteriormente se trasvasaba a un tubo de centrifuga graduado y se centrifugaba a 3500 rpm durante 10min (JP Selecta Centronix BL-II, España), se deshechaba el sobrenadante y se completaba hasta 10 mL con agua destilada. Seguidamente se agitaba en el vortex y se centrifugaba a 3500 rpm durante 5 min.

Se eliminaba un poco de agua y se cogía el polen con ayuda de un capilar, depositando el sedimento en un portaobjetos y poniendo a secar en estufa a 50ºC, aproximadamente durante 30 min. Finalmente se añadía una gotita de glicerina para sellar y se ponía un cubreobjetos. Por último se realizaba el recuento con la ayuda de un microscópio (Zeis Axio Imager, Alemania).

Al realizar el recuento se hacía una primera visión a través del microscopio para definir el tipo de polen predominante, esto se hacía mediante comparación con las estructuras de los pólenes.

Tras esta primera visión, y una vez seleccionado o seleccionados el/los polen/es predominante/es, se observaron en el microscopio 12 campos visuales diferentes, dentro de cada uno se contaron los pólenes de cada tipo y se calculaba el porcentaje final de cada uno de ellos.

En este trabajo, las mieles eran consideradas de limón si presentaban un porcentaje de polen de la especie *Citrus limon* superior a un 10%; de azahar si presentaban un porcentaje de polen de *Citrus sp.* superior a un 10%; de romero si el porcentaje de polen de la especie *Rosmarinus officinalis* era superior a un 15%; de eucalipto si el porcentaje de polen de *Eucalipto sp.* era superior al 65%; de mielada si contenían elementos de mielada (esporas de hongos e hifas, etc.), junto con una conductividad eléctrica superior a 0.8mS/cm. En todos los casos, además se tenía en cuenta las propiedades organolépticas de las mieles. Se clasificaban como milflores, si no contenían suficiente cantidad de polen de una determinada especie botánica para poder ser clasificadas como monoflorales (Comunidad Valenciana, DOGV núm. 4167, 2002; Von Der Ohe et al., 2004).

3. Determinación de parámetros físico-químicos.

3.1. Determinación del pH, la acidez libre, lactónica y total

La miel contiene ácidos orgánicos libres y lactonas. Estas últimas originan los ácidos correspondientes cuando la miel se alcaliniza, constituyendo una reserva potencial de acidez.

La acidez libre se determinó según el método oficial publicado en el BOE (España, BOE núm. 145, 1986), por valoración potenciométrica con álcali hasta pH 8.50, y la acidez lactónica mediante valoración por retroceso tras la adición de un

exceso conocido de base, de acuerdo al método oficial publicado en el mismo BOE.

Para la determinación se pesaban 10 g de miel en un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvían en 75 mL de agua destilada con la ayuda de un agitador magnético. Posteriormente se tomaba el pH del medio con un pH-metro-conductímetro (Mettler Toledo Seven Multi^{tm}, Suiza), siendo esta la medida del pH de la miel. A continuación se adicionaba una disolución de hidróxido de sodio 0.05N, a una velocidad de 5 mL/ minuto. La adición se detenía cuando el valor del pH era de 8.5. Acto seguido, se vertían, con la máxima celeridad, 10 mL de la misma disolución y se valoraba por retroceso con una disolución de ácido clorhídrico 0.05N hasta llegar a un pH de 8.3.

Para una buena reproducibilidad del método era necesario valorar con la mayor rapidez posible, con agitación constante y sin disminuir la velocidad de incorporación del álcali en las proximidades a 8.50, ya que el valor del pH desciende rápidamente debido a la hidrólisis de las lactonas.

Cálculos

- Acidez libre (meq/kg) = $[(V_b - V_o)\ N_b\ 1.000] / P$
- Acidez lactónica (meq/kg) = $[(10N_b - V_aN_a)\ 1.000] / P$
- Acidez total = Acidez libre + Acidez lactónica.

Donde:

- V_b = Volumen, en mL, de base consumida para alcanzar pH 8.50.
- V_o = Volumen, en mL de base consumidos por 75 mL de agua destilada para alcanzar pH 8.50.
- V_a = Volumen, en mL, de ácido gastado en la valoración por retroceso para alcanzar pH 8.30.
- N_b = Normalidad de la base.
- N_a = Normalidad del ácido.
- P = Peso, en g, de la muestra.

3.2. Determinación de humedad

La determinación de la humedad se realizó mediante la medida del índice de refracción de la miel y extrapolando este valor a la tabla de Chataway de acuerdo al método oficial (España, BOE núm. 145, 1986).

Se tomaba una muestra de miel, lo más licuada posible (sin haberla calentado para ello) y sin diluirla previamente se vertía una gota de la muestra sobre un refractómetro tipo Abbe (ATAGO 3T, Japón) con baño termostatizado. Se medía el índice de refracción, teniendo la precaución de realizar la medida a una temperatura de 20ºC ± 1ºC. El valor del índice de refracción se extrapolaba a la Tabla de Chataway, en la cual, con el valor del índice de refracción, se leía directamente el valor correspondiente a la humedad.

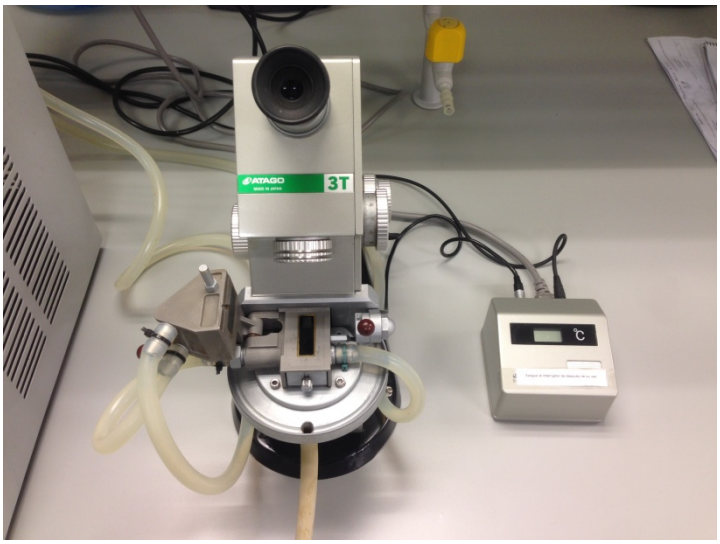


Figura III.1. Refractómetro tipo Abbe con baño termostatado, de la marca Atago utilizado en este estudio.

Si la medida del índice de refracción no se efectuaba a 20ºC exactamente, se realizaba la siguiente corrección según la temperatura:

- Temperaturas superiores a 20ºC: añadir 0,00023 por ºC.
- Temperaturas inferiores a 20ºC: restar 0,00023 por ºC.

3.3. Determinación de la conductividad

La conductividad eléctrica se determinó según el procedimiento descrito en el método oficial (España, BOE núm. 145, 1986). Se pesaba una cantidad de miel equivalente al 20% de materia seca. La miel se disolvía en agua bidestilada y se aforaba a 25mL. Posteriormente se medía la conductividad de la solución con la

ayuda del pH-metro-conductímetro (Mettler Toledo Seven Multi^{tm}, Suiza), expresando la conductividad en µS/cm.

Esta medida se define a 20 ºC, por lo tanto es necesario corregir el valor en el caso de que la temperatura sea distinta, aplicando la ecuación III.1.

$$Kt(\mu S/cm) = \frac{K_{20}}{1+\alpha(t-20)} \qquad \text{(III.1)}$$

Siendo:

α=0.0261 (coeficiente de temperatura a 20ºC)

t=temperatura de la disolución de miel

Figura III.2. pH-metro-conductímetro Seven Multi ^{tm} (Mettler Toledo, Suiza) utilizado en este estudio.

3.4. Determinación de hidroximetilfurfural

La determinación de hidroximetilfurfural se realizó mediante defecación de la muestra y posterior medida de la absorbancia a 284 y 336 nm de acuerdo al procedimiento descrito en el método oficial (España, BOE núm. 145, 1986).

En primer lugar se pesaba, con precisión de 1 mg, 5 g de miel en un vaso de precipitados. A continuación, la miel se disolvía con 25 mL de agua destilada y se transfería a un matraz aforado de 50 mL. Acto seguido se añadía con la ayuda de una micropìpeta 0.50 mL de solución Carrez I, y tras estos, 0.50 mL de solución Carrez II. Después se mezclaba todo bien y se añadía agua hasta el enrase. Para evitar la formación espuma se añadían una gotas de etanol. Posteriormente se

filtraba, desechando los primeros 10 mL de filtrado. Del filtrado, se pipeteaban 5 mL en tres tubos de ensayo, y a uno de los tubos se le añadían 5 mL de solución de sulfito ácido de sodio (referencia) y a los otros dos tubos de ensayo se les añadían 5 mL de agua (muestra).

Finalmente se mezclaba todo bien y se determinaba la absorbancia de la solución muestra frente a la referencia, a 284 nm y 336 nm con la ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Helios alpha UV-VIS, Germany). Si la absorbancia a 284 nm era superior a 0.6 se diluía la solución de la muestra con agua y la solución referencia con sulfito ácido de sodio 0.1M en la misma proporción. Una vez hecha la dilución se leía nuevamente la absorbancia.

Reactivos

- Solución Carrez I: disolver 15 g de ferrocianuro potásico trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 – 3H_2O$) y diluir a 100 mL con agua destilada.
- Solución Carrez II: disolver 30 g de acetato de cinz dihidratado [$Zn(AcO)_2 2H_2O$] y disolver a 100 mL con agua destilada.

Cálculos

El contenido en hidroximetilfurfural expresado en mg por kg de miel viene dado por la ecuación III.2.

$$HMF(mg/kg) = \frac{(A_1 - A_2) * f * 5 * D}{P} \qquad \text{(III.2)}$$

Donde:

- A_1 = Absorbancia medida a 284 nm.
- A_2 = Absorbancia medida a 336 nm.
- P = Peso, en g, de la muestra.
- f = 149.7 para expresarlo en mg/kg.
- *D = F*actor de dilución: volumen final /10 mL

3.5. Determinación de la actividad diastásica

La medida de la actividad diastásica se determinó según el procedimiento descrito en los métodos oficiales (España, BOE núm. 145, 1986), el cual se basa en la velocidad de hidrólisis del almidón, de una solución al 1 %, por las diastasas contenidas en una solución amortiguada de miel. El punto final de dicha reacción se determinó tomando muestras de la mezcla a diferentes intervalos de tiempo midiendo la absorbancia a 660 nm.

El procedimiento para la determinación de la actividad se llevó a cabo en las siguientes etapas:

a) *Normalización de la solución de almidón*: se calentaba la solución de almidón hasta 40 ºC, se vertían 5 mL de la misma en 10 mL de agua destilada a 40 ºC y se mezclaba bien. Con una pipeta se vertía 1 mL de esta mezcla en 10 mL de solución de iodo 0.0007 N diluida en 35 mL de agua destilada y se mezclaba bien. Posteriormente se leía la absorbancia a 660 nm contra testigo de agua. La absorbancia debía ser de 0.760 ± 0.020. En caso necesario, se ajustaba el volumen de agua añadido hasta obtener la absorbancia exacta.

b) *Preparación de la solución de miel*: se pesaban 10 g de miel en un vaso de precipitados para disolverlos en 20 mL de agua destilada, añadiendo posteriormente 5 mL de solución tampón de acetato. Una vez disuelta perfectamente y tamponada la muestra, se añadían 3 mL de cloruro de sodio 0.5 M y se trasvasaba a un matraz de 50 mL donde se enrasaba.

c) *Determinación*: mediante una pipeta, se colocaban 10 mL de solución de miel en dos tubos de una capacidad aproximada de 60 mL cada uno y se colocaban al baño maría a 40 ºC junto con el matraz que contenía la solución de almidón. Aparte se preparaban varios recipientes, de capacidad adecuada, con 10 mL de solución de iodo 0.0007 N cada uno y el volumen de agua obtenido en la normalización de la solución de almidón. Transcurridos quince minutos, se vertían 5 mL de agua en un tubo con la solución de miel (blanco) y 5 mL de solución de almidón en el otro tubo con la solución de miel (problema). Se mezclaba bien y se ponía en marcha un cronómetro. Después se tomaba 1 mL de la solución blanco y se vertía en uno de los recipientes que contenía la solución de iodo, éste era el blanco de lectura.

A intervalos de cinco minutos, se vertía 1 mL de la solución problema en los recipientes preparados anteriormente, se mezclaba bien y se determinaba inmediatamente la absorbancia a 660 nm frente al blanco de lectura con la ayuda de un espectrofotómetro de doble haz Helios alpha UV-VIS (Thermo, Germany) (Figura III.3). Posteriormente se tomaban porciones de 1 mL a intervalos conocidos de tiempo hasta lograr una absorbancia menor de 0.235.

Figura III.3. Espectrofotómetro Thermo Helios alpha UV-VIS utilizado en este trabajo.

Reactivos

- Solución patrón de iodo: disolver 8.80 g de iodo calidad para análisis en 30-40 mL de agua destilada que contenga 22 g de ioduro de potasio, calidad para análisis; diluir hasta 1 L en matraz volumétrico.

- Solución de iodo, 0.02 N: disolver 20 g de ioduro de potasio, calidad para análisis, en 30-40 mL de agua destilada. Trasvasar la solución a un matraz de 500 mL, agregar 143 mL de la solución patrón de iodo. Mezclar y enrasar con agua destilada. Esta solución dura como máximo un día.

- Solución de iodo, 0.0007 N: disolver 20 g de ioduro de potasio (KI) en 30-40 mL de agua destilada, añadir 5 mL de solución patrón de iodo y diluir hasta 500 mL en matraz volumétrico.

Esta solución sólo es estable durante cuarenta y ocho horas.

- Tampón de acetato pH 5.3 (1.59 M): disolver 87 g de acetato de sodio trihidratado (NaOAc.3H2O) en 400 mL de agua destilada, añadir unos 10.5 mL de ácido acético glacial (HOAc) en un poco de agua y completar hasta 500 mL de volumen. Ajustar el pH a 5.3 con acetato de sodio o ácido acético, según convenga, utilizando pH-metro.

- Solución de cloruro de sodio 0.5 M: disolver 14.5 g de cloruro de sodio (ClNa) en agua destilada hervida y diluir hasta 500 mL.

- Solución de almidón: debe utilizarse un almidón soluble cuyo índice de azul se halle comprendido entre 0.50 y 0.55. Pesar una cantidad de almidón soluble equivalente a 2 g de almidón anhidro (comprobar previamente la humedad por

desecación a 130 ºC); mezclar con 90 mL de agua, ponerlo a hervir rápidamente, agitando continuamente la solución. Hervir suavemente durante tres min, tapar y enfriar. Trasvasar a un matraz volumétrico de 100 mL, poner el matraz en el baño María a 40 ºC hasta que el líquido alcance dicha temperatura y completar hasta volumen a 40 ºC.

Cálculos

Para obtener el índice de actividad diastásica se representa gráficamente la absorbancia en función del tiempo (min). Se ajusta la recta y se determina el tiempo (t) en que la mezcla alcanza la absorbancia de 0.235. A partir de este valor se calcula el índice de diastasas (ID) (ecuación III.3):

$$ID = \frac{300}{t} \qquad \text{(III.3)}$$

3.6. Medida de color

El color de las mieles se midió a partir del espectro de reflexión, con la ayuda de un espectrocolorímetro (Minolta Cm-3600d, Japón). Se obtuvieron las coordenadas de color CIE-L*a*b* utilizando como referencia un observador 2º y un iluminante D65.

Debido a la naturaleza translúcida de las mieles, se utilizó la teoría de Kubelka-Munk, mediante la cual se determinaban los valores de reflectancia de un espesor infinito de miel. Las mieles eran introducidas en cubetas de 2 cm de paso de luz, realizándose todas las medidas con un fondo blanco y negro. (Gilabert, 1992; Hutchings, 1999).

Cálculos

Según la teoría de Kubelka-Munk, los valores de reflectancia de un espesor infinito se obtienen tal y como se expresan en la ecuación III.4.

$$R_{infinito} = a - b \qquad \text{(III.4)}$$

Donde:

$$a = \tfrac{1}{2}\left[\left(R + \left(R_0 - R + R_g\right) / R_0 * R_g\right)\right]$$

$$b = \left(a^2 - 1\right)^{1/2}$$

Siendo:

R = Reflectancia de la muestra sobre fondo blanco

R_0 = Reflectancia de la muestra sobre fondo negro

R_g = Reflectancia del fondo blanco

A partir de los valores de L* (luminosidad), a* y b*, se calcularon las coordenadas psicométricas tono (h*) (ecuación III.5) y croma (C*) (ecuación III.6), así como la diferencia de color (ΔE) (ecuación III.7).

$$h^* = arctg\frac{b^*}{a^*} \qquad \text{(III.5)}$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \qquad \text{(III.6)}$$

$$\Delta E = \sqrt{\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} + \Delta L^{*2}} \qquad \text{(III.7)}$$

Por otra parte también se calculó el valor del coeficiente de absorción/dispersión (K/S) a partir de los resultados obtenidos (ecuación III.8). Este parámetro permite evaluar la translucidez/opacidad de las muestras, asociando los valores bajos a materiales opacos, y los valores altos a materiales más transparentes.

$$K/S = \frac{(1 - R_{\inf\ inito})^2}{2R_{\inf\ inito}} \qquad \text{(III.8)}$$

4. Análisis de los compuestos volátiles

La determinación de los compuestos volátiles se realizó en 3 etapas: extracción, separación y la posterior identificación de compuestos volátiles.

4.1. Extracción

La extracción de la fracción volátil de las muestras de miel, se llevó a cabo mediante el método de "purga y trampa" (Overton y Manura, 1994; Kadar et al. 2011). Para ello, se pesaban 30g de miel en el tubo de vidrio con cuello esmerilado y se añadían 200µL de patrón interno (camphor, 0.02 mg/mL). Se eligió este compuesto como patrón interno, por su miscibilidad con el agua y por lo tanto con la miel, y por no estar presente en las muestras analizadas. Para conseguir la total homogeneización de la miel con el patrón interno se introducía el tubo en un baño de ultrasonidos durante 5 min.

En la figura III.4 se muestra un esquema del montaje utilizado. Para la extracción de la fracción volátil de la miel, se sumergía el tubo con la miel en un baño termostatado (Grant, Gd 100, Inglaterra) a 45ºC hasta la altura de la muestra. El gas de arrastre utilizado era el nitrógeno, que circulaba a través de la muestra con un caudal constante de 100mL/min, caudal que se verificaba con un caudalímetro (Agilent ADM 1000, USA).

El burbujeo del gas sobre la muestra facilitaba la liberación de los compuestos volátiles. En el extremo del montaje se colocó el tubo en el que se atrapaba la fracción volátil liberada (relleno con 150 mg del material de adsorción, Tenax^{TA} 20-35 mesh). Transcurridos 45 min se procedía a la desorción de los compuestos retenidos en la matriz de Tenax, utilizando para ello un desorbedor térmico Turbomatrix TD (Perkin Elmer, USA). La desorción se realizaba a 220ºC durante 10 min. Los compuestos volátiles retenidos en la trampa fría a -30ºC se transferían directamente a la cabeza de la columna por calentamiento durante 1 minuto de la trampa fría hasta los 250ºC.

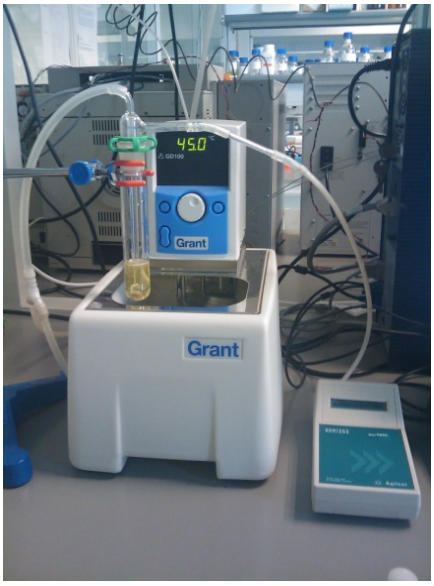


Figura III.4. Esquema del montaje del sistema "purga y trampa" de extracción de compuestos volátiles.

4.2. Separación

La separación de los compuestos volátiles se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (ThermoQuest Trace GC 2000, USA), equipado con una columna capilar BP-20 (SGE, Australia) (60m x 0.32mm; 1 µm), figura III.5.

Los compuestos eran arrastrados por el gas portador (Helio, 1mL min^{-1}), a la vez que se realizaba una rampa de temperatura con las siguientes etapas: 2 minutos a 40ºC; de 40ºC a 190ºC a una velocidad de 4ºC/min; 11 minutos a 190ºC; de 190ºC a 220ºC a 8ºC/min; 8 minutos a 220ºC. Una vez separados los distintos compuestos, éstos pasaban al espectrómetro de masas (ThermoQuest Trace MS, USA) para su detección y cuantificación.

El método cromatográfico se definió después de realizar numerosas pruebas para determinar las condiciones ideales para la separación de los picos, especialmente de aquellos de mayor interés.

La fragmentación de los compuestos en el MS, se realizaba por impacto electrónico positivo a 70eV; y el modo de registro fue de 33 a 433 unidades de masa a una velocidad de registro de 2,5 exploraciones/s.

Figura III.5. Desorbedor térmico acoplado a un cromatógrafo de gases con un detector de masas.

4.3. Identificación

Los componentes volátiles se identificaron por tres procedimientos:

A. Comparando los espectros de masas obtenidos en los compuestos de interés con los pertenecientes a la base de datos de la librería NIST, utilizando para ello el software Xcalibur™.

B. Calculando los Índices de retención relativa (ecuación III.9) y comparándolos con tablas bibliográficas (Kondjoyan y Berdagué, 1996). Estos índices se obtienen a partir de los tiempos de retención de un conjunto de alcanos específicos C_8-C_{20} (Fluka Buchs, Suiza), que se analizan en las mismas condiciones cromatografías que las muestras.

$$RI = 100\frac{R(i) - R(z)}{R(z+1) - R(z)} + 100z \qquad \text{(III.9)}$$

Siendo:

RI= Índice de Kovats (índice de retención).

RI(i): índice relativo de retención de la sustancia i.

$R_{(i)}$: tiempo de retención del compuesto i, con tiempo de retención entre el alcano z y el alcano z+1.

z: número de átomos de carbono en el alcano z.

$R_{(z)}$: tiempo de retención del alcano z.

$R_{(z+1)}$: tiempo de retención del alcano z+1.

C. Comparando los tiempos de retención de los picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras, con los de las sustancias patrones comerciales (Sigma-Aldrich, USA); (Acros Organics, Bélgica); (Fluka Buchs, Suiza); (Merck KGaA, Alemania).

5. Análisis microbiológicos

La legislación vigente (España, BOE núm. 186, 2003) no contiene información relacionada con los requerimientos microbiológicos de la miel, por ello estos análisis se realizaron de acuerdo a la anterior norma de calidad para la miel (España, BOE núm. 244, 1983), siendo los requerimientos microbiológicos utilizados los expresados en la tabla III.2.

Tabla III.2. Requerimientos microbiológicos aplicados a las mieles.

Microorganismo	Máximos admisibles
Enterobacterias totales	Ausencia
Escherichia coli	Ausencia
Salmonella-Shigella	Ausencia
Recuento de colonias aerobias mesófilas	$1x10^4$ col/g
Recuento de mohos y levaduras	$1x10^2$ col/g

En primer lugar, en todos los análisis microbiológicos, se realizó un macerado inicial pesando asépticamente 10 gramos de miel en bolsas estériles y añadiendo 90 mL de agua de peptona tamponada al 0.1% a pH 7.2 y esterilizada. Esta mezcla se homogenizó con la ayuda de un stomacher (Interscience Bagmixer 400, Francia) durante 2 minutos, obteniéndose así la dilución 1/10, y a partir de ésta se prepararon las diluciones decimales progresivas. Se realizó el recuento en las placas que contenían entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias. El resultado expresado en col/g se obtuvo multiplicando el número de colonias contado en la placa por el factor de dilución.

5.1. Enterobacterias

Se realizó de acuerdo a la norma ISO 21528-1:2004. En primer lugar se hizo un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada incubando durante 18 h ± 2 h a 37ºC ± 1ºC. Posteriormente se transfirió a un medio de enriquecimiento, que fue el caldo glucosa bilis verde brillante tamponado (caldo EE) incubando durante 24 h ± 2 h a 37ºC ± 1ºC en condiciones de anaerobiosis. Por último se transfirió a un medio de aislamiento, que fue el agar rojo bilis violeta glucosa (VRBG) y se incubó durante 24 h ± 2 h a 37ºC ± 1ºC en condiciones de anaerobiosis. No fue necesario realizar pruebas de confirmación.

5.2. Escherichia coli

Se realizó de acuerdo a la norma ISO 16649-2:2001. Se realizó una siembra en profundidad en agar triptona bilis con x-glucuronido (TBX) y posteriormente se incubó a 44ºC ± 1ºC durante 22 h ± 2 h.

5.3. Salmonella-Shigella

Se realizó de acuerdo a la norma ISO 6579:2002. Se realizó un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada incubando durante 18 h ± 2 h a 37ºC ± 1ºC. Posteriormente se transfiró a un medio de enriquecimiento, que fue el caldo Rappaport Vassiliadis soja (RVS) incubando 24 h ± 3 h a 41,5ºC ± 1ºC. Por último se transferió a un medio de aislamiento, que fue el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) incubando 24 h ± 2 h a 37ºC ± 1ºC y eligiendo como agar secundario el agar verde brillante (BGA) incubando 24 h ± 3 h a 37ºC ± 1ºC.

5.4. Microorganismos aerobios mesófilos

Se realizó de acuerdo a la norma ISO 4833:2003. Se realizó una siembra en profundidad en agar recuento en placa (PCA), sembrando un mililitro de la muestra y de sus diluciones decimales en placas Petri estériles y homogenizando posteriormente. Una vez sólido el medio, se añadió una doble capa de agar y se incubó a 30ºC ± 1ºC durante 48 horas.

5.5. Mohos y levaduras

Se realizó de acuerdo a la norma ISO 7954:1987. Se realizaba una siembra en superficie en agar cloranfenicol glucosado (CGA), se realizó una siembra en superficie de 1 mL de muestra y de las diluciones decimales. Las placas se incubaron a 25ºC ± 1ºC con lecturas a los 3, 4 y 5 días.

6. Análisis de la viscosidad de la miel

Para determinar el valor de la viscosidad de la miel se utilizó un reómetro (Thermo Electron Rheostress 1, Alemania), realizando ensayos cono-placa con un sensor de titanio de 35 mm de diámetro y un ángulo de 2º.

Para la determinación de la viscosidad se llevaron a cabo ensayos a velocidad controlada, en los cuales se realizaba gradiente de velocidad que variaba de 0 a 300 s^{-1} y posteriormente bajaba hasta 0, con una duración de 600 segundos por ensayo. A partir de los valores obtenidos, se calculaba la viscosidad para cada miel a cada una de las temperaturas estudiadas (25, 35, 45, 50 y 55 ºC).

Cálculos

Para calcular la viscosidad se comprobó que las mieles tenían un comportamiento newtoniano, de manera que los esfuerzos cortantes variaron

linealmente con el gradiente de velocidad. De esta forma, la viscosidad se obtuvo como la pendiente del ajuste lineal esfuerzo vs. gradiente de velocidad tal y como se muestra en la ecuación III.10.

$$\tau=\eta*\dot{\gamma} \qquad \text{(III.10)}$$

Donde:

τ=Esfuerzo constante (Pa)

η=viscosidad (Pa*s)

$\dot{\gamma}$ =gradiente de velocidad (1/s)

7. Análisis estadístico

El tratamiento de los datos se llevó a cabo utilizado los programas: Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics INC., USA), SPSS versión 16 (SPSS INC., USA) y Unscrambler versión 10.0 (CAMO A/S, Noruega).

IV. SELECCIÓN DE PARÁMETROS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LAS MIELES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO/TEMPERATURA DE EXPOSICIÓN

IV. Selección de parámetros y condiciones experimentales para evaluar la calidad de las mieles en función del tiempo/temperatura de exposición

1. Introducción

Desde que el néctar es recolectado por las abejas, lo transforman en miel y ésta llega al consumidor final, la miel experimenta una serie de transformaciones que hacen que su composición varíe con el tiempo. La calidad de la miel depende del trabajo de las abejas para producirla y de la intervención del hombre para extraerla de la colmena (de forma apropiada y en el momento adecuado) y manipularla antes de ponerla a disposición de las empresas envasadoras, así como del posterior tratamiento industrial.

El proceso de industrialización de la miel, aunque es relativamente sencillo, puede llegar a tener una gran repercusión en la calidad final de la miel procesada, hecho que se pone especialmente de manifiesto durante su comercialización. Si las etapas de licuación, pasteurización, así como las de almacenamiento (tanto previo de la materia prima como de la miel envasada), no se controlan adecuadamente, pueden repercutir negativamente en la calidad (mermando en gran medida las propiedades beneficiosas), provocando un efecto parecido al de su envejecimiento natural. Por tanto, se hace imprescindible un control exhaustivo de los tiempos y las temperaturas de las etapas de proceso, y del almacenamiento anterior y posterior al proceso. La vigilancia de estas variables no siempre se lleva a cabo con la rigurosidad necesaria, repercutiendo en la calidad final de las mieles durante su comercialización. La evaluación de este tipo de alteración de la calidad (calentamiento excesivo o envejecimiento natural) se suele llevar a cabo determinando los niveles de hidroximetilfurfural (Sancho et al., 1992; Fallico et al., 2004; Turhan et al., 2008).

El hidroximetilfurfural (HMF) es el parámetro más habitual como control de rutina en las industrias de envasado de miel, tanto para determinar la frescura de las materias primas que entran en producción como de las mezclas que se realizan para conformar lotes de producción (Juan-Borrás, 2015). Lo más recomendable es que el nivel de este parámetro sea lo menor posible antes de entrar en el proceso ya que tenderá a incrementarse con el paso del tiempo.

La humedad es un parámetro muy importante en la calidad de la miel, ya que algunas de las causas de su alteración, como la cristalización o la fermentación, están directamente relacionados con él. La legislación exige un valor máximo de 20 g/100g (España, BOE núm. 186, 2003). Las mieles suelen tener un porcentaje de humedad inferior al 17.5 g/100g, aunque en ocasiones los niveles son superiores , de ahí la importancia de su control antes del envasado (Juan-Borrás, 2015).

La miel es un producto de naturaleza ácida, aunque dicha acidez es enmascarada por la gran cantidad de azúcares que contiene, haciendo prevalecer el sabor dulce. Existe una gran variabilidad en la composición cualitativa y cuantitativa de la fracción ácida. En ella se pueden distinguir tres tipos de acidez: libre, lactónica y total, siendo esta última la suma de las otras dos.

La conductividad eléctrica de la miel está directamente relacionada con su contenido en minerales. Mieles con bajos contenidos en minerales tendrán conductividades bajas, y mieles con altos contenidos en minerales tendrán conductividades altas. Las mieles de origen floral se caracterizan por presentar conductividades más bajas que las mieles de mielada (De lorenzo y Guadalix, 2002).

El objetivo principal de capítulo ha sido seleccionar los parámetros y las condiciones experimentales que permitan evaluar la calidad de las mieles en función de las condiciones de tiempo/temperatura de exposición. Para ello se ha evaluado el comportamiento de diferentes parámetros de calidad (HMF, acidez, conductividad y humedad), abarcando un amplio rango de temperaturas/tiempos.

2. Materiales y métodos

2.1. Materia Prima

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando miel de diferentes tipos: limón cruda (A); mielada cruda (B); milflores importada cruda (C); milflores española cruda (D); milflores española licuada (E); milflores española pasteurizada (F) (figura IV.1). Todas las mieles se obtuvieron directamente de una empresa apícola de la Comunidad Valenciana.

La elección de estas mieles se realizó en base al siguiente criterio: la miel de limón, por ser una miel de cítrico característica de la Comunidad Valenciana; la miel de mielada, fue elegida como ejemplo de miel no floral; la miel milflores importada (procedente de Argentina), por la importancia que tienen las mieles de importación en las industrias de envasado; la miel milflores española fue elegida

por ser el tipo de miel de mayor consumo en España. Las mieles de milflores licuada y pasterizada (obtenidas directamente en la industria durante su procesado) se utilizaron para evaluar las posibles diferencias de comportamiento (en los diferentes parámetros de calidad considerados) con respecto a la miel milflores cruda.

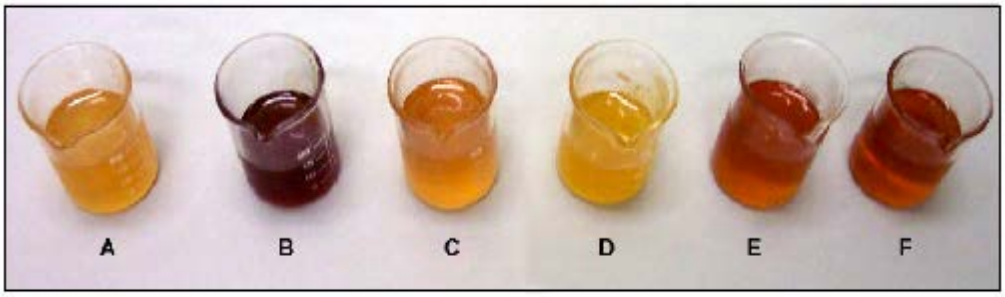


Figura IV.1. Muestras de miel utilizadas durante el estudio.

2.2. Diseño experimental

Para evaluar la influencia de la temperatura y del tiempo en los diferentes parámetros de calidad, se hizo un diseño experimental que abarcase las temperaturas a las que normalmente están sometidas las mieles durante el proceso industrial, incluyendo temperaturas de almacenamiento, licuación y pasteurización (tabla IV.1). Los tiempos se consideraron en función de las temperaturas, de manera que fueron mayores cuando las temperaturas eran bajas y menores cuando eran altas. En el diseño se contemplaron tiempos extremos de tratamiento.

Para llevar a cabo los tratamientos correspondientes a las temperaturas bajas se utilizaron estufas (Selecta Incubat, España) a las diferentes temperaturas de estudio (35ºC, 45ºC y 55ºC). Se introdujo en cada estufa un recipiente cerrado de 1 kg de capacidad para cada una de las mieles, extrayendo para cada tiempo de los considerados en el diseño experimental, la cantidad necesaria de miel para realizar los análisis correspondientes (evitando en la medida de lo posible las variaciones de temperatura).

Para las temperaturas altas (65ºC, 75ºC y 85ºC) se utilizó un termobloque para tubos (Selecta Tembloc, España). Se utilizaron tubos de ensayo de cristal de 15 mm de diámetro, conteniendo cada tubo solamente la cantidad de miel necesaria para cada análisis.

Tabla IV.1. Diseño experimental del estudio.

Tiempo (h)	35ºC	45ºC	55ºC	65ºC	75ºC	85ºC
0	X	X	X	X	X	X
1					X	X
2					X	X
3				X	X	X
4					X	X
5					X	X
6				X	X	X
12				X		X
24		X	X	X	X	
48	X	X	X	X		
72			X	X		
96				X		
168	X	X	X	X		
336	X	X	X			
504	X	X	X			
672	X	X	X			

2.3. Determinaciones analíticas

Los parámetros analizados en el estudio fueron: hidroximetilfurfural (HMF), acidez, conductividad y humedad, tal y como se ha descrito en el capítulo III (materiales y métodos).

2.4. Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de medias mediante una prueba T de Student con ayuda del programa SPSS versión 16 (SPSS INC., USA). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con ayuda del programa Unscrambler versión 10.0 (CAMO A/S, Noruega) y se modelizó el comportamiento del incremento del HMF mediante un General Linear Model (GLM) con el programa Statgraphics plus 5.1 (Manugistics INC., USA)

3. Resultados y discusión

3.1. Evolución de parámetros de calidad con el tiempo y la temperatura de tratamiento

3.1.1. Evolución del Hidroximetilfurfural

La Tabla IV.2. muestra los valores de HMF presentes en las diferentes mieles antes de ser sometidas a los tratamientos del estudio. Como se puede apreciar los niveles iniciales eran bastante altos, exceptuando la miel milflores española cruda. Esto parece más lógico para las mieles licuada y pasteurizada debido al tratamiento térmico que han sufrido, pero no es tan normal en el resto de las mieles, lo que pone de manifiesto que estas mieles ya estaban un tiempo en la cooperativa o habían sufrido un manejo no muy cuidadoso desde que fueron recolectadas hasta su llegada a dicha cooperativa.

Tabla IV.2. Valores medios iniciales de HMF en las diferentes mieles estudiadas

Tipo de miel	Valor inicial de HMF (mg/kg)
Miel de limón	15.19 ± 1.60
Miel de mielada	19.43 ± 2.12
Miel milflores importada	21.38 ± 2.55
Miel milflores española cruda	4.76 ± 1.84
Miel milflores española licuada	16.35 ± 1.91
Miel milflores española pasteurizada	21.23 ± 2.22

En la figura IV.2 se observa la evolución del HMF en todas las mieles sometidas a los tratamientos propuestos. Todos los ejes verticales tienen la misma escala, pero en los ejes horizontales se ha variado el valor para poder apreciar mejor el incremento de HMF a cada temperatura, ya que como se ha comentado anteriormente los tiempos de tratamiento eran distintos para las diferentes temperaturas.

A simple vista se aprecia la influencia del tiempo en el incremento de HMF. En todos los casos se observa un aumento gradual de dicho parámetro, siendo mayor cuando las temperaturas eran más elevadas. Este comportamiento se da en todos los tipos de miel, aunque no influye de la misma forma en todas ellas. En las condiciones más extremas (altas temperaturas y tiempos largos) se observa que la miel de mielada sufre un incremento mayor al resto. Los valores más elevados de

HMF obtenidos (incluso valores mayores de 500 mg/kg) nunca se van a dar en la industria de envasado de miel, sin embargo, reflejan que pequeños incrementos de la temperatura pueden suponer un gran aumento en el contenido de HMF.

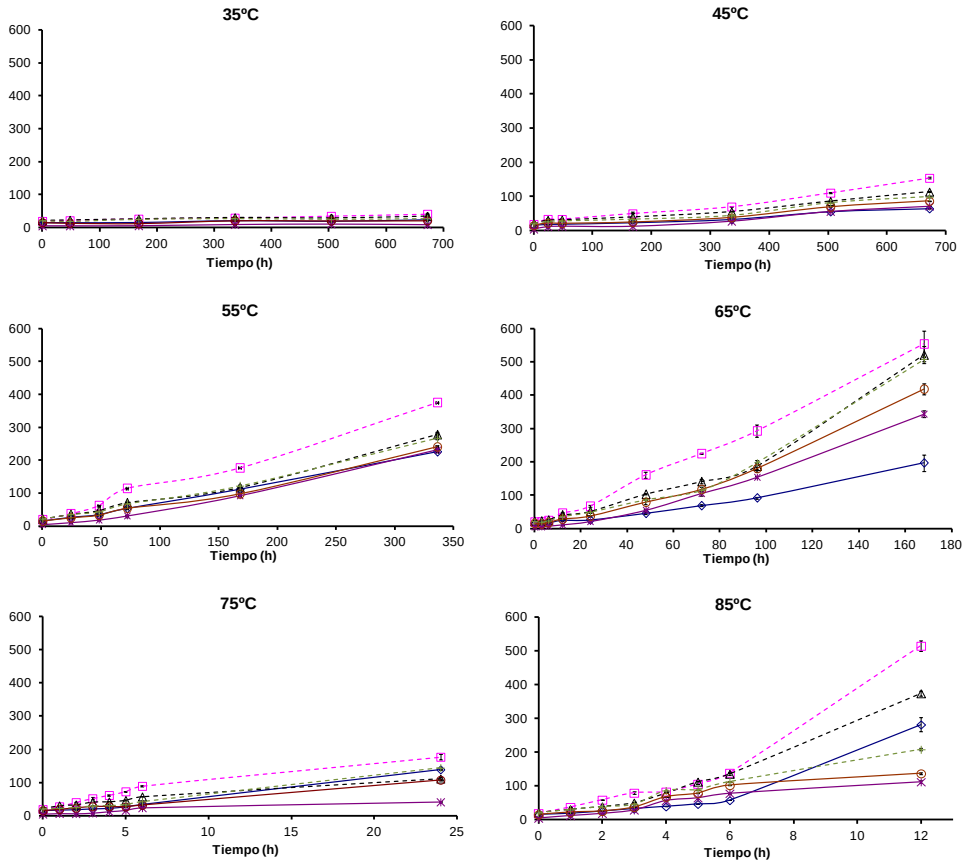


Figura IV.2. Evolución del contenido de HMF (mg/kg) a diferentes temperaturas en miel de limón (◊); mielada (-□-); milflores importada (-Δ-); milflores española cruda (ж); milflores española licuada (o); milflores española pasteurizada (-+-).

Las figuras IV.3 y IV.4 muestran los incrementos de HMF sufridos por las mieles en tratamientos concretos del diseño experimental: a 336 horas para temperaturas bajas (35, 45 y 55 ºC) y a 6 horas para temperaturas altas (65, 75 y 85ºC).

En ambas gráficas se aprecia claramente la influencia de la temperatura, ya que el aumento de HMF es mayor cuanto mayor es la temperatura de

tratamiento. Además, se observa que la miel de mielada es la que experimenta un mayor aumento de los niveles de HMF, seguida de la miel de milflores importada. Esto indica que no todas las mieles se comportan igual frente al incremento de este parámetro. También se observa que la miel de milflores sufre un incremento de HMF, similar tanto si es cruda, licuada o pasterizada, al ser sometida a las diferentes temperaturas (35, 45, 55, 65, 75 y 85ºC).

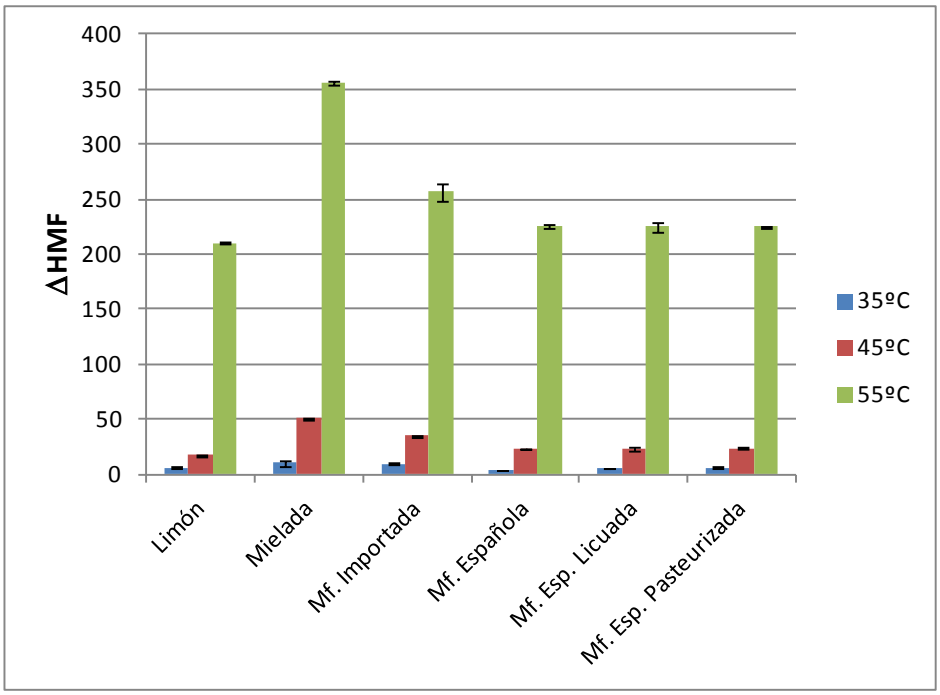


Figura IV.3. Incremento del contenido de HMF para todas las mieles al ser sometidas a las temperaturas bajas del estudio durante 336 horas.

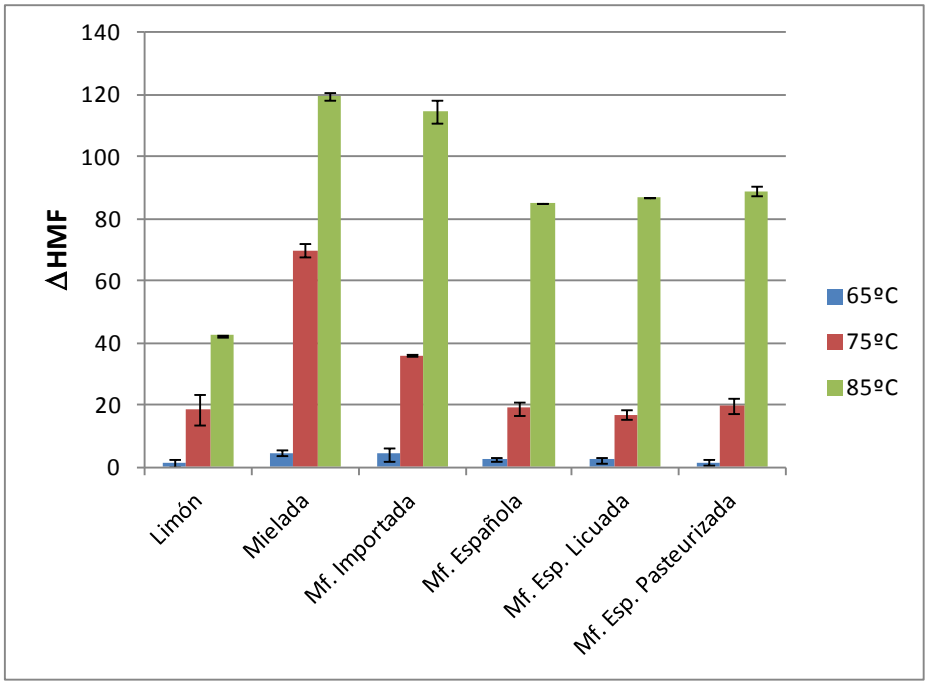


Figura IV.4. Incremento del contenido de HMF para todas las mieles al ser sometidas a las temperaturas altas del estudio durante 6 horas.

3.1.2. Evolución de la acidez

En la figura IV.5, se muestra la evolución de la acidez total para las diferentes mieles sometidas a las condiciones propuestas en el diseño experimental. La miel de mielada presentó el valor inicial más alto de acidez (60.7 meq/kg), siendo más del doble del valor inicial obtenido para algunas de las mieles estudiadas, todas ellas de procedencia floral. La miel de limón fue la que mostró un menor valor inicial (23.9 meq/kg), mientras que para las mieles de milflores los valores iniciales de acidez variaron entre los 31.7 meg/kg de la miel milflores española pasteurizada y los 35.6 meq/kg de la miel milflores importada.

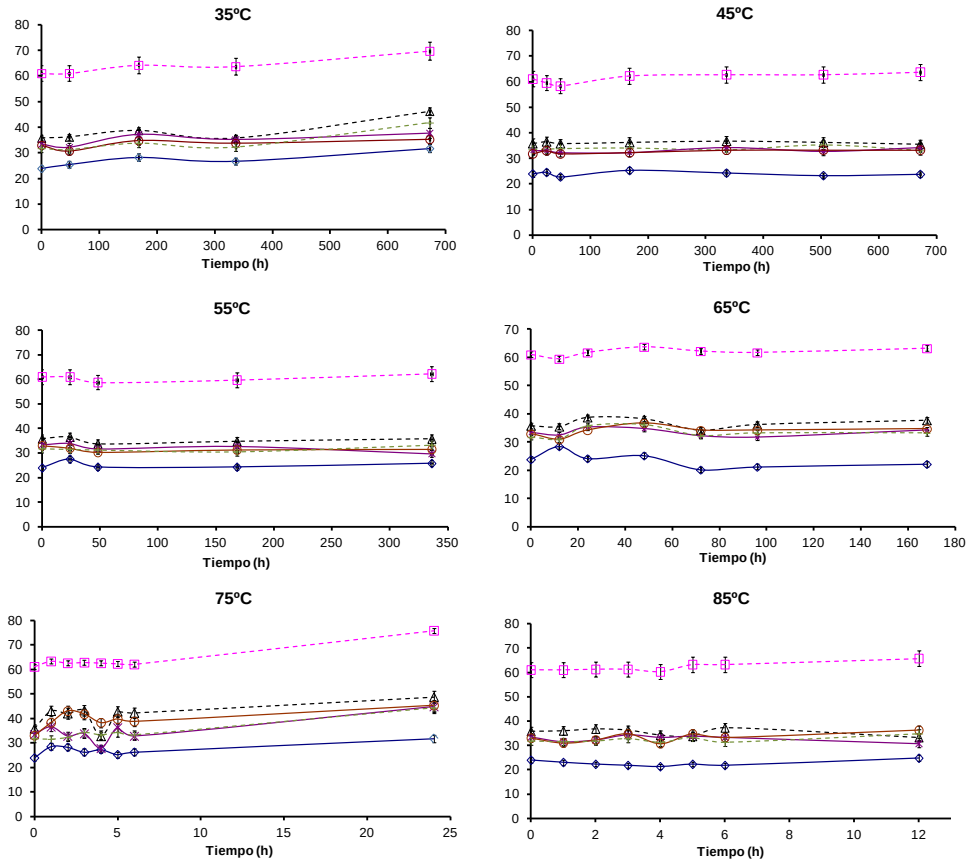


Figura IV.5. Evolución de la acidez total (meq/kg) a las diferentes temperaturas en miel de limón (◊); mielada (-□-); milflores importada (-Δ-); milflores española cruda (x); milflores española licuada (o); milflores española pasteurizada (-+-).

Viendo los diferentes gráficos de evolución de la acidez, se observa que cada una de las mieles presentó un valor de acidez inicial característico, que se mantuvieron relativamente constantes, aunque con una ligera tendencia a incrementarse al ser sometidas a las condiciones más extremas. Este comportamiento se puede explicar por la mayor formación de HMF que tiene lugar a altas temperaturas, ya que éste se descompone en ácido levulínico y ácido fórmico, lo que contribuye a incrementar los niveles acidez (Estupiñan et al., 1998).

En definitiva se puede afirmar que el tratamiento térmico no parece afectar de forma significativa los valores de acidez de las mieles, aunque si pueden verse incrementados de forma indirecta, si los tratamientos son muy severos.

3.1.3. Evolución de la conductividad

La figura IV.6 representa la evolución de la conductividad eléctrica en los diferentes tipos de miel sometidos a las diferentes temperaturas y tiempos de estudio. Cada miel presentó unos determinados valores iniciales, característicos de sus diferentes orígenes botánicos, variando entre los 217 µS/cm de la miel de limón a los 813 µS/cm de la miel de mielada.

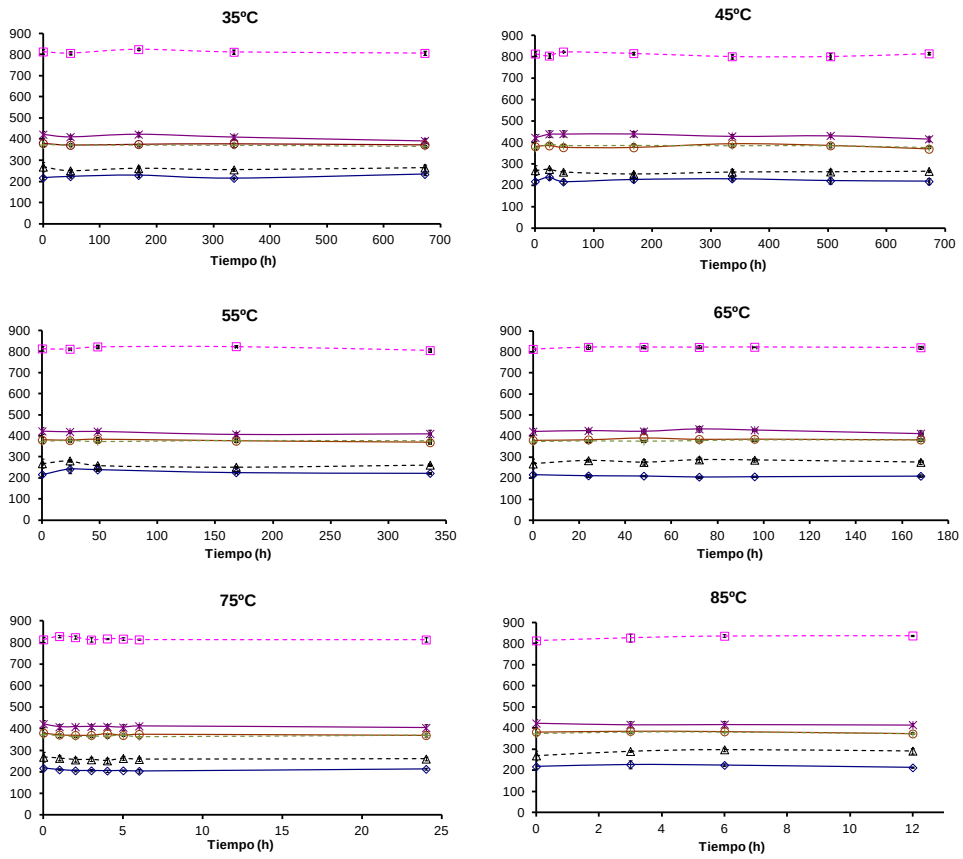


Figura IV.6. Evolución de la conductividad (µS/cm) a las diferentes temperaturas en miel de limón (◊); mielada (-□-); milflores importada (-Δ-); milflores española cruda (ж); milflores española licuada (o); milflores española pasteurizada (-+-).

Es evidente que la miel de mielada presentó valores muy superiores al resto de las mieles, debido a su diferente origen botánico. Mientras que las mieles de mielada proceden de las secreciones de las plantas o mielatos (con alto contenido en minerales), las demás proceden del néctar de flores.

Los valores de conductividad eléctrica se mantuvieron prácticamente inalterados con los distintos tratamientos. Este hecho pone en evidencia que este parámetro no se ve afectado por los tratamientos considerados, incluso aplicando altas temperaturas y tiempos largos.

3.1.4. Evolución de la humedad

La figura IV.7 muestra los valores de humedad obtenidos para las diferentes mieles y condiciones del estudio. Las mieles estudiadas presentaban inicialmente unos valores de humedad comprendidos entre el 16,5 y el 18,5 g/100g, siendo la miel milflores española la que mostró el valor menor y la miel milflores importada la que presentó el valor más elevado. La variabilidad de humedad entre tipos de miel puede estar influenciada por las condiciones climatológicas, pero sobre todo por la manipulación llevada a cabo por el apicultor en la colmena. Un valor demasiado alto de la humedad en la miel se puede deber a un tiempo insuficiente de maduración de la miel en la colmena (Juan-Borras et al., 2015).

En la figura IV.7 se observa que los tratamientos no ocasionaron variaciones significativas en los valores de humedad. Por lo tanto el contenido de agua de una miel depende fundamentalmente del valor que tiene en el momento de cortarla en las colmenas. Este hecho hace imprescindible que este parámetro se controle en la etapa de recepción de las materias primas en las industrias de envasado, para evitar fermentaciones durante la comercialización de la miel envasada.

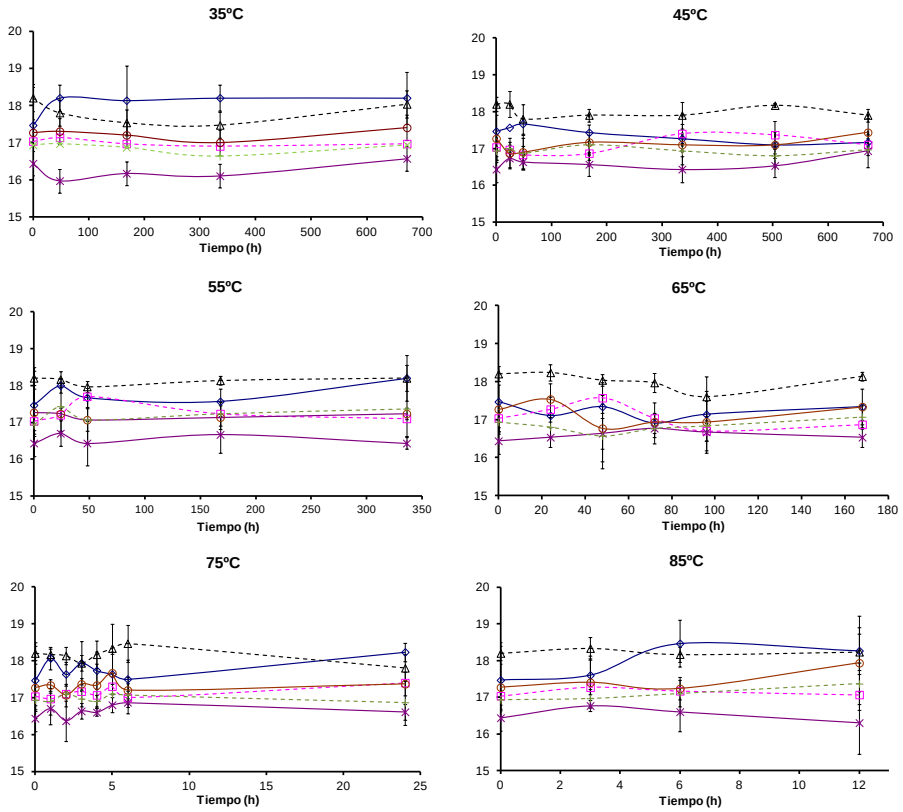


Figura IV.7. Evolución de la humedad (%) a las diferentes temperaturas en miel de limón (◊); mielada (-□-); milflores importada (-Δ-); milflores española cruda (x); milflores española licuada (o); milflores española pasteurizada (-+-).

3.2. Evaluación del efecto de las condiciones tiempo/temperatura sobre los parámetros de calidad analizados

Con la finalidad de evaluar la significación estadística de las variaciones observadas para cada parámetro, en función de del tiempo y la temperatura, se realizaron pruebas T de comparación de medias ($\alpha<0.05$). En todos los casos, excepto para el HMF, se concluyó que ningún parámetro variaba significativamente al aplicar los distintos tratamientos.

Para tener una visión general de la distribución de los datos en todas las mieles crudas, la figura IV.8 muestra los diagramas "box and whisker" de todos los parámetros analizados. Los valores de acidez, humedad y conductividad, muestran una baja dispersión en todas las mieles, y por lo tanto una escasa

variabilidad de los datos (Cajas y bigotes estrechos). Por el contrario, para el HMF, la dispersión es mucho mayor (cajas y bigotes más anchos), lo que indica que se ve afectado por los tratamientos aplicados.

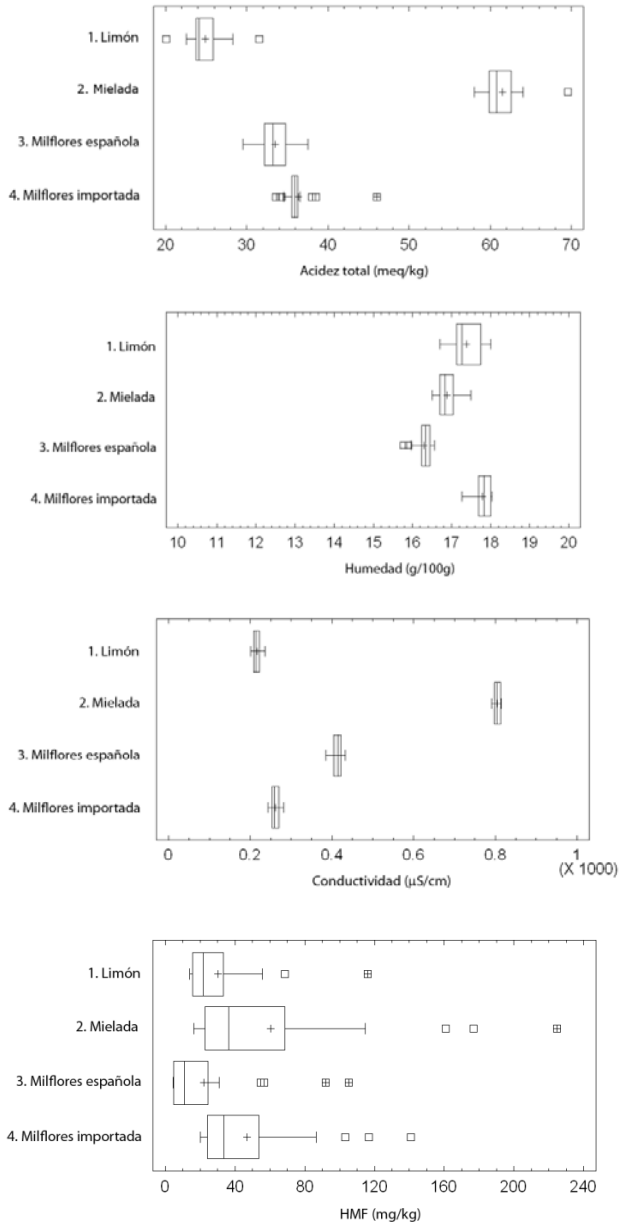


Figura IV.8. Diagramas "BOX and WHISKER" de los valores obtenidos para los cuatro parámetros analizados en cuatro mieles crudas.

Para tener una visión global del efecto del tipo de miel sobre los parámetros estudiados y las relaciones existentes entre dichos parámetros, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Los dos primeros componentes explicaban el 82% de la variabilidad de los datos (PC1: 51.82% y PC2: 30.18%)

La figura IV.9 muestra el biplot obtenido, donde se muestran simultáneamente las muestras (scores) y los parámetros (loadings). Se observa que la acidez y la conductividad tienen una alta correlación positiva y ambas a su vez una correlación negativa con la humedad. No hay una relación aparente entre HMF y los otros tres parámetros. También se observa las diferencias entre mieles, al situarse en puntos diferenciados del plano, siendo las mieles de limón y milflores importada las más similares ya que presentan los valores más altos de humedad y más bajos de acidez y conductividad. Ocurre lo contrario con la miel de mielada que presenta los valores más bajos de humedad y más altos de acidez y conductividad. Por último la miel milflores española tiene valores intermedios en las tres variables.

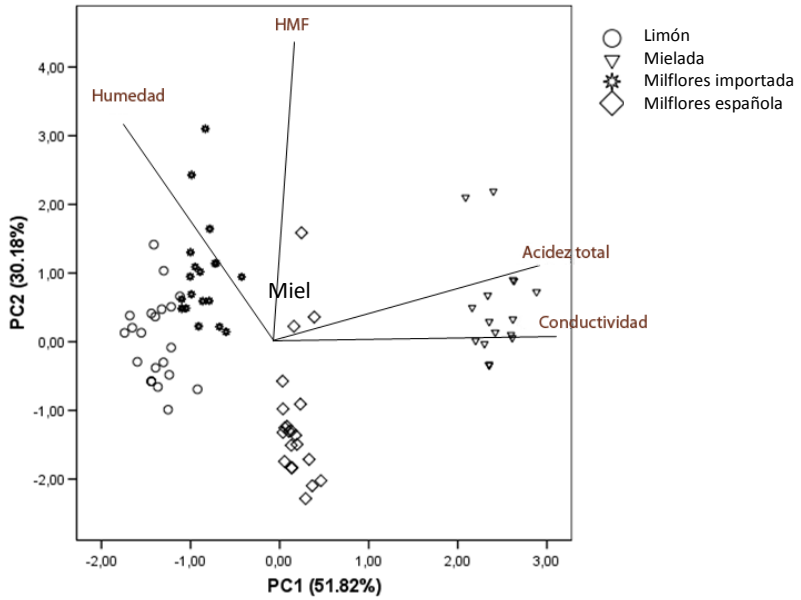


Figura IV.9 Biplot de componentes principales

Una vez demostrado que el HMF es el único parámetro que experimenta una evolución significativa con el tiempo y la temperatura, se consideró interesante utilizar un modelo estadístico que englobase todos los parámetros evaluados como herramienta de predicción del contenido de HMF en las etapas previas a la pasterización. Por ello, en la obtención del modelo se tuvo en cuenta únicamente la información obtenida en las mieles crudas (mieles de limón, mielada, milflores importada y milflores española) y en los tratamientos comprendidos entre 35 y 65ºC. De esta manera, sería posible estimar el nivel de HMF previsto en una miel antes de ser pasterizada, conociendo las condiciones de tiempo/temperatura a las que haya estado expuesta.

Aunque se ha visto que la humedad, la acidez y la conductividad no parecen variar significativamente al ser expuestas a las condiciones del estudio, se consideró apropiado tener en cuenta estos parámetros en la construcción del modelo, ya que cada miel tenía unos valores diferentes. Como el nivel de HMF de partida de cada miel era distinto, para poder obtener un modelo que fuera válido independientemente del valor de HMF inicial, se consideró en el estudio los valores de los incrementos de HMF en relación al valor inicial (HMF_t-HMF_0).

Como modelo de predicción se utilizó el GLM (Modelo Lineal Generalizado) ya que es lo suficientemente flexible como para permitir utilizar tanto variables cualitativas como cuantitativas, permitiendo añadir o eliminar los dos tipos de variables según sea necesario.

Inicialmente se probó un modelo donde se incluían todas las variables estudiadas (Ecuación IV.1).

ΔHMF=f(tipo de miel, conductividad, acidez total, humedad, temperatura, tiempo) (IV.1)

Sin embargo, el modelo de predicción definitivo no incluyó la conductividad, la acidez total ni la humedad, ya que se observó que no existía correlación entre dichos parámetros y la variación del contenido de HMF. En este sentido, el modelo definitivo incluyó: tipo de miel, temperatura, tiempo (Ecuación IV.2).

ΔHMF=f (tipo de miel, temperatura, tiempo) (IV.2)

En el modelo construido la variable tipo de miel se consideró categórica, mientras que la temperatura y el tiempo se consideraron cuantitativas. Se tuvieron también en cuenta los cuadrados e interacciones. La tabla IV.3 muestra los valores de F-ratio y P-valor para cada uno de las variables predictivas que resultaron ser significativas. Estos valores informan sobre la importancia que tienen cada uno de los términos del modelo en la predicción del incremento del HMF. Como se puede apreciar "temperatura x tiempo" es el parámetro que mayor influencia tiene sobre el contenido de HMF, seguido del tiempo. La interacción entre estos dos factores indica que a diferentes temperaturas la influencia del tiempo es diferente.

Tabla IV.3 Valores de F-Ratio y P-Value de los diferentes términos que se han utilizado en el modelo de predicción. Donde T: tipo de miel; Te: temperatura; Ti: tiempo.

	F-Ratio	P-Value
T	12.55	0.0000
Te	10.15	0.0023
Ti	87.63	0.0000
Te*Ti	116.26	0.0000

La tabla IV.4 muestra los coeficientes del modelo lineal (GLM) obtenidos, donde las variables D_1, D_2 y D_3 son variables dummy (artificiales) definidas como indica la tabla IV.5.

Tabla IV.4 Valor de los coeficientes utilizados en el modelo de predicción.

Parámetro	Valor del coeficiente
Constante	-10.43
D_1	-6.07
D_2	8.51
D_3	2.70
Te	0.36
Ti	-0.30
Te * Ti	0.01

Tabla IV.5 Valores de las variables dummy dependiendo del tipo de miel.

Variable dummy	Valor	
D_1	1	Si la miel es de limón
	-1	Si la miel es milflores españona
	0	En caso contrario
D_2	1	Si la miel es de mielada
	-1	Si la miel es milflores españona
	0	En caso contrario
D_3	1	Si la miel es milflores importada
	-1	Si la miel es milflores españona
	0	En caso contrario

Considerando los valores presentados en las tablas IV.4 y IV.5, el modelo de predicción obtenido para la variación de HMF es el que se muestra en la ecuación IV.3.

$$\Delta HMF=-10.43-6.07*D_1+8.51*D_2+2.70*D_3+0.36*Te-0.30*Ti+0.01*Ti*Te \qquad (IV.3)$$

Este modelo explica el 75.48% de la variabilidad de los datos y con él puede estimarse el incremento de HMF con un error estándar de predicción de 7.87.

La Figura IV.10 muestra como ejemplo la superficie de respuesta calculada para la miel milflores española. En ella se puede apreciar de forma gráfica el incremento de HMF en función de la temperatura y del tiempo.

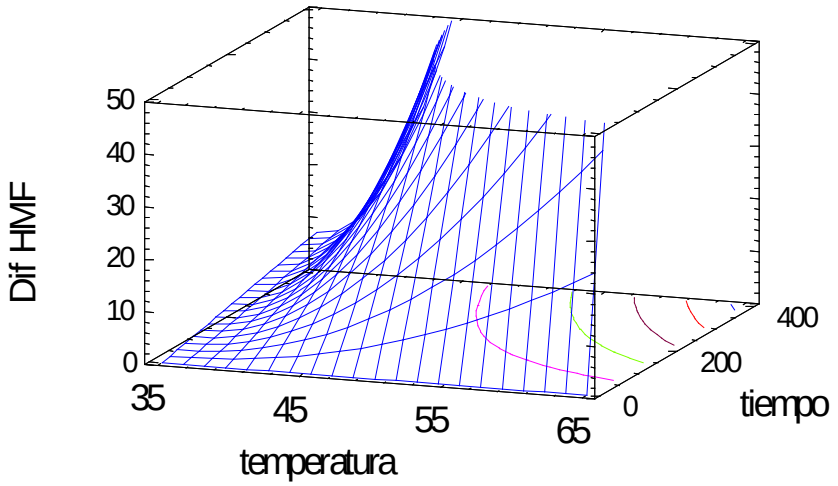


Figura IV.10. Superficie de respuesta calculada por el modelo para la miel milflores española en función del tiempo (h) y la temperatura (ºC).

Con la finalidad de evaluar la bondad del modelo se han representado los valores predichos por el modelo frente a los valores observados experimentalmente (figura IV.11). Sólo se han tenido en cuenta los valores inferiores a 80 mg/kg ya que valores superiores se alejan mucho de la diagonal. Además, en tipos de mieles convencionales no es habitual obtener valores tan elevados.

La menor distancia entre los puntos y la línea diagonal (varianzas residuales) en la zona de los valores de ΔHMF más bajos indica que en esta zona las predicciones son más exactas. De la misma forma, se aprecia que la exactitud en la zona de valores más altos es peor, ya que las distancias son mayores. Estudiando más detenidamente los valores de las varianzas residuales, se aprecia que estas dos zonas (predicciones más exacta y menos exactas), se corresponden con las condiciones de almacenamiento y licuación respectivamente, lo que nos indica que para mejorar la exactitud en modelizaciones futuras sería conveniente separar los rangos de tiempo y temperatura de las diferentes etapas.

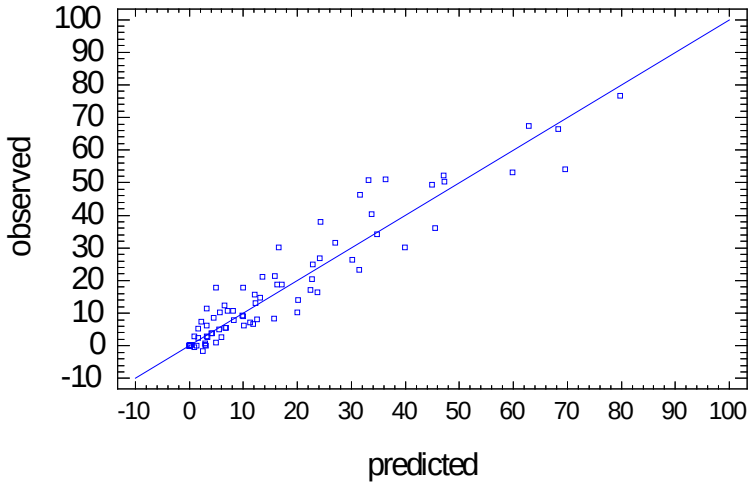


Figura IV.11. Valores de ΔHMF predichos por el modelo frente a valores calculados experimentalmente.

4. Conclusiones

El HMF es el único parámetro que varía significativamente al someter las mieles a las temperaturas y tiempos de estudio, ya que la acidez, la conductividad y la humedad no experimentan cambios apreciables.

El HMF no evoluciona de la misma manera para las distintas mieles estudiadas, ya que se han observado diferencias significativas entre ellas.

En la evolución del HMF de las mieles, se ha demostrado que no existe una influencia significativa de la acidez, conductividad y humedad.

Parece posible obtener un modelo de predicción del contenido de HMF en miel en función del tiempo y la temperatura. Sin embargo, para obtener un modelo fiable, y que sea aplicable a las condiciones reales de la industria, es necesario estudiar el comportamiento del HMF considerando de forma independiente las diferentes etapas del procesado industrial.

V. EVOLUCIÓN DEL HMF, ACTIVIDAD DIASTÁSICA Y COLOR EN LAS ETAPAS DE ALMACENAMIENTO, LICUACIÓN Y PASTEURIZACIÓN DE LAS MIELES

V. Evolución del HMF, actividad diastásica y color en las etapas de almacenamiento, licuación y pasteurización de las mieles

1. Introducción

En el capítulo anterior quedó patente que el HMF evoluciona significativamente con las variaciones de tiempo/temperatura, al contrario de lo que ocurre con otros parámetros de calidad como la acidez, conductividad y humedad. En el presente capítulo se pretendió profundizar en el estudio del comportamiento del HMF considerando de forma independiente las diferentes etapas del procesado industrial: almacenamiento, licuación y pasterización. Además se consideraron otros parámetros de calidad importantes como son la actividad diastásica y el color.

La actividad diastásica está relacionada con las enzimas mayoritarias presentes en la miel, ya que como producto natural, tiene un contenido alto de enzimas cuando es recolectada, pero al estar sometida a diferentes condiciones de tiempo y temperatura, éstos se van reduciendo. Sin embargo, este parámetro es menos utilizado que el HMF como indicador de la frescura de la miel. Esto es así, no sólo porque su determinación es más compleja y laboriosa, sino además, por el hecho de que las mieles recién recolectadas tienen contenidos enzimáticos distintos en función de su procedencia botánica. Este hecho dificulta la utilización de la actividad diastásica para estimar la frescura de la miel si previamente no se conoce su valor de partida (Serra-Bonvehí et al., 2000; Tosi et al., 2007).

El color de la miel es uno de sus atributos más característicos, y de vital importancia, al ser determinante en la intención de compra por parte del consumidor. Por este motivo, las empresas envasadoras tienen este parámetro en cuenta para conformar los lotes de producción (Juan-Borrás et al., 2015). En el mercado se pueden encontrar mieles de una amplia gama de colores (siempre en un rango situado entre los amarillos y los rojos), desde prácticamente incoloras hasta tonalidades negruzcas (De Lorenzo Y Guadalix, 2002). En la variabilidad del color de las mieles influye la procedencia botánica (por la presencia de pigmentos en los néctares o en las secreciones de las plantas que liban las abejas), la procedencia geográfica, las condiciones climáticas e incluso la mano del apicultor

(Juan- Borrás et al., 2015). A pesar de la importancia de este parámetro, no existe un método oficial para su caracterización. Generalmente, en las empresas envasadoras de miel aplican un sistema específico para la miel, basado en la comparación del color de la misma con un prisma coloreado estándar (colorímetro Pfund).

También se puede utilizar para evaluar el color de la miel otras técnicas basadas en la medida de la reflectancia o transmitancia de la muestra, utilizando espectrofotómetros o espectrocolorímetros (Terrrab et al., 2004; Gonzalez-Miret et al., 2007; Giovanni-Tuberoso et al., 2014).

Por todo ello, el objetivo de este capítulo ha sido estudiar el comportamiento del HMF, la actividad diastásica y el color, simulando las condiciones de cada una de las etapas del procesado industrial de la miel (licuación y pasterización), así como de la etapa de almacenamiento previo.

2. Materiales y métodos

2.1. Materia Prima

En este estudio se utilizaron 5 tipos de miel: mielada, eucalipto, milflores nacional, azahar y romero, proporcionadas por una cooperativa apícola de la Comunidad Valenciana. Se utilizaron tres lotes de cada tipo miel, uno para cada una de las etapas objeto de estudio, por la imposibilidad de realizar todas las experiencias simultáneamente. Sin embargo, se utilizaron en los tres casos mieles del mismo origen geográfico y de características similares.

2.2. Diseño experimental

El diseño experimental se estableció de forma independiente para cada etapa considerada (almacenamiento, licuación y pasterización), simulando las condiciones de tiempo/temperatura a las que las mieles se puede exponer en cada una de ellas.

2.2.1. Almacenamiento

Las mieles depositadas en recipientes de 250 mL, se introducían en estufas de temperatura controlada (Selecta incubat, España). Los tiempos y las temperaturas aplicados se detallan en la tabla V.1.

Tabla V.1. Diseño experimental de la etapa de almacenamiento.

Tiempo (días)	25 ºC	30ºC	35ºC	40ºC
0	X	X	X	X
3	-	-	X	X
7	X	X	X	X
10	-	-	X	X
14	X	X	X	X
17	-	-	X	X
23	X	X	X	X
27	X	X	X	X
34	X	X	X	X
48	X	X	X	X
62	X	X	X	X
76	X	X	-	-
104	X	X	-	-

2.2.2. Licuación

Al igual que en la etapa anterior, las mieles se introducían, en recipientes de 250 mL, en estufa a temperatura controlada (Selecta incubat, España). Previamente, las mieles se tamizaron, tal y como se hace en la industria, para eliminar los posibles restos de panal, abejas, cera, etc. Los tiempos y las temperaturas aplicados en la etapa de licuación se muestran en la tabla V.2.

Tabla V.2. Diseño experimental de la etapa de licuación.

Tiempo (horas)	45 ºC	50ºC	55ºC
0	X	X	X
12	X	X	X
48	X	X	X
72	X	X	X
96	X	X	X

2.2.3. Pasteurización

Al no disponer de un pasteurizador de placas, utilizado en las industrias de envasado, se realizó la pasteurización con la ayuda de en un baño de aceite térmico con regulación de temperatura (Selecta Digiterm 200, España). Se partía de miel previamente licuada a 45ºC durante aproximadamente media hora, ésta era bombeada, con ayuda de una bomba peristáltica con regulación de velocidad

(Heidolph Pumpdrive 5001, Alemania), por el interior de un tubo de silicona de 6 mm de diámetro interno que estaba sumergido en el baño termostático con aceite térmico a la temperatura de trabajo. Con este diámetro de tubo se conseguía una buena transmisión de calor y una adecuada circulación de la miel. El tiempo de residencia de la miel, a cada una de las temperaturas consideradas, se conseguía modificando la longitud del tubo sumergido en el aceite. Los tiempos y las temperaturas de tratamiento aplicadas en la etapa de pasterización se muestran en la tabla V.3.

Tabla V.3. Diseño experimental de la etapa de pasteurización.

Tiempo (minutos)	75 ºC	80ºC	85ºC
0	X	X	X
2	X	X	X
4	X	X	X
6	X	X	X

2.3. Determinaciones analíticas

La determinación de acidez, conductividad eléctrica, humedad, pH, hidroximetilfurfural (HMF), actividad diastásica y color, el estudio de viscosidad y el estudio microbiológico se realizó tal y como se ha descrito en el capítulo III (materiales y métodos).

3. Resultados y discusión

3.1. Etapa de Almacenamiento

3.1.1. Caracterización fisicoquímica y color de las mieles antes de iniciar el estudio de almacenamiento

La tabla V.4 muestra los resultados obtenidos de conductividad, acidez total, pH y humedad, de las mieles antes de iniciar el estudio de almacenamiento.

Tabla V.4. Caracterización fisicoquímica de las mieles antes de comenzar el estudio de almacenamiento.

	Conduct. (µS/cm)	Acidez total (meq/kg)	pH	Humedad (g/100g)	HMF (mg/kg)	Actividad Diastásica (ID)
MIELADA	966 ± 19	35.0 ± 4.8	5.2 ± 0.5	15.4 ± 0.1	4.58 ± 1.67	53.06 ± 3.88
EUCALIPTO	507 ± 12	33.6 ± 0.2	3.9 ± 0.1	16.3 ± 0.6	2.57 ± 0.60	34.01 ± 0.43
MILFLORES	356 ± 17	28.0 ± 1.4	4.1 ± 0.2	16.2 ± 0.6	4.35 ± 0.23	18.30 ± 1.13
AZAHAR	191 ± 9	20.1 ± 5.0	4.0 ± 0.0	18.6 ± 0.6	4.56 ± 0.15	12.02 ± 0.63
ROMERO	163 ± 9	21.7 ± 1.3	3.8 ± 0.0	20.0 ± 0.7	9.48 ± 1.06	14.91 ± 0.91

Todos los valores de los parámetros fisicoquímicos evaluados estaban dentro de los límites legales. Las diferencias existentes entre mieles se debían fundamentalmente a su procedencia botánica. Como era de esperar, la miel de mielada presentó valores altos de conductividad, acidez, pH y bajos de humedad (Juan-Borrás, 2015). En el extremo opuesto se sitúan las mieles de azahar y romero con los valores más bajos para los primeros tres parámetros y más altos para la humedad. Con valores intermedios encontramos la miel de eucalipto y la miel de milflores.

Los valores de HMF eran todos menores de 10 mg/kg, siendo la miel de romero la que presentó un valor superior (9.48 mg/kg). El resto de mieles tenían valores iniciales inferiores a 5 mg/kg, siendo la miel de eucalipto la que presentó un menor valor (2.57 mg/kg). Estos valores ponen de manifiesto que se trataba de mieles recién recolectadas, ya que los valores eran bajos, aunque algo más elevados para la miel de romero, pero dentro de los valores aceptables en la industria de envasado de miel.

En cuanto a la actividad diastásica se puede apreciar que los valores de partida eran muy diferentes debido al distinto origen botánico de las mieles (Tosi et al., 2007). La miel de mielada presentó un valor inicial (53.06 ID) muy superior a las demás, seguida de la de eucalipto (34.01 ID). Los menores valores correspondieron a romero (14.91 ID) y azahar (12.02 ID), situándose la milflores en un valor intermedio (18.30 ID).

En la tabla V.5 se muestran los valores de los parámetros de color CIEL*a*b*de las mieles antes de ser sometidas a los tratamientos de almacenamiento. Observando dicha información sobre la figura V.1, se aprecia que todas las mieles presentaron colores entre el rojo y el amarillo, ya que los valores del tono se

situaron en todos los casos entre 0 y 90º (primer cuadrante del espacio de color CIE L*a*b*). La miel de mielada seguida de la de eucalipto presentaron la menor luminosidad (24.67 y 29.70), pureza de color (chroma) (1.37 y 10.11) y tono (58.29 y 60.75), respectivamente. La miel de azahar mostró, con diferencia, la mayor luminosidad (53.58), pureza de color (22.76) y tono (86.80). Las mieles de milflores y romero presentaron valores intermedios para todos los parámetros de color.

Tabla V.5. Valores de luminosidad, tono y croma en los 5 tipos de mieles estudiadas, antes de ser sometidas a los tratamientos de almacenamiento.

	Luminosidad (L*)	**Chroma (C*)**	**Tono (h*)**
MIELADA	24.67 ± 0.00	1.37 ± 0.03	58.29 ± 0.46
AZAHAR	53.58 ± 0.01	22.76 ± 0.01	86.80 ± 0.03
EUCALIPTO	29.70 ± 0.01	10.11 ± 0.04	60.75 ± 0.05
MILFLORES	32.94 ± 0.00	15.08 ± 0.03	68.99 ± 0.05
ROMERO	36.63 ± 0.01	19.59 ± 0.03	73.56 ± 0.00

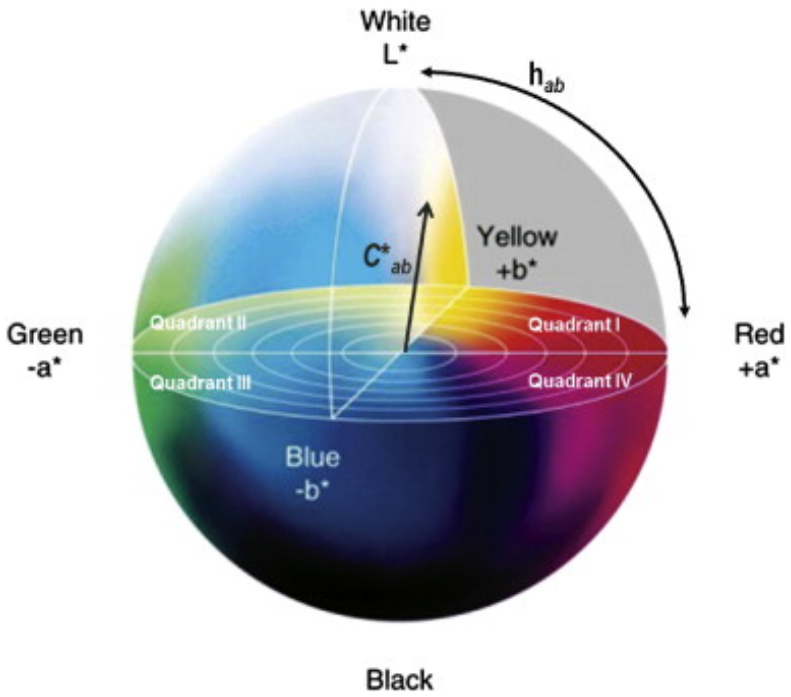


Figura V.1. Esfera de cromaticidad del espacio CIE L*a*b*.

3.1.2. Evolución del HMF con las condiciones de almacenamiento

En la figura V.2 se muestra la evolución del contenido de HMF, en las diferentes mieles estudiadas, al ser sometidas a los tratamientos (tiempos/temperaturas) de almacenamiento.

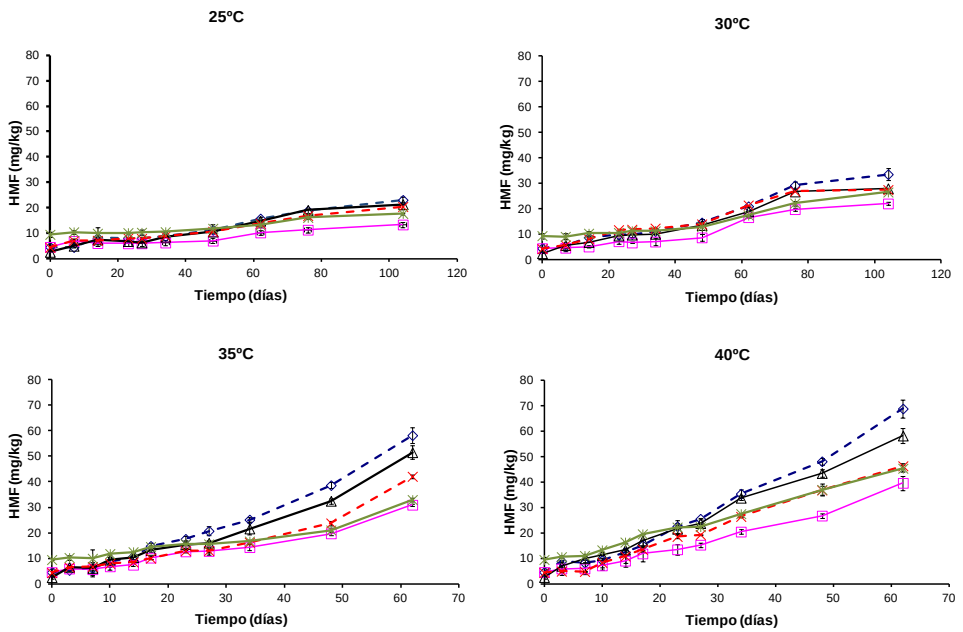


Figura V.2. Evolución del contenido de HMF a los diferentes tiempos/temperaturas de almacenamiento estudiadas en miel de mielada (-◊-); eucalipto (Δ); milflores (-x-); azahar (□);romero (ж).

Se observa claramente la influencia de los tratamientos en el aumento del contenido de HMF de las mieles estudiadas. El HMF fue incrementando con el tiempo, siendo mayor cuanto mayor eran las temperaturas de residencia. En todos casos las mieles de mielada y eucalipto fueron las más afectadas por los tratamientos, y las de azahar y romero las que menos.

Para apreciar mejor el diferente comportamiento de las mieles, en la figura V.3 se ha representado la variación del contenido de HMF a los 62 días con respecto al valor inicial, para cada tipo de miel y a las diferentes temperaturas de estudio.

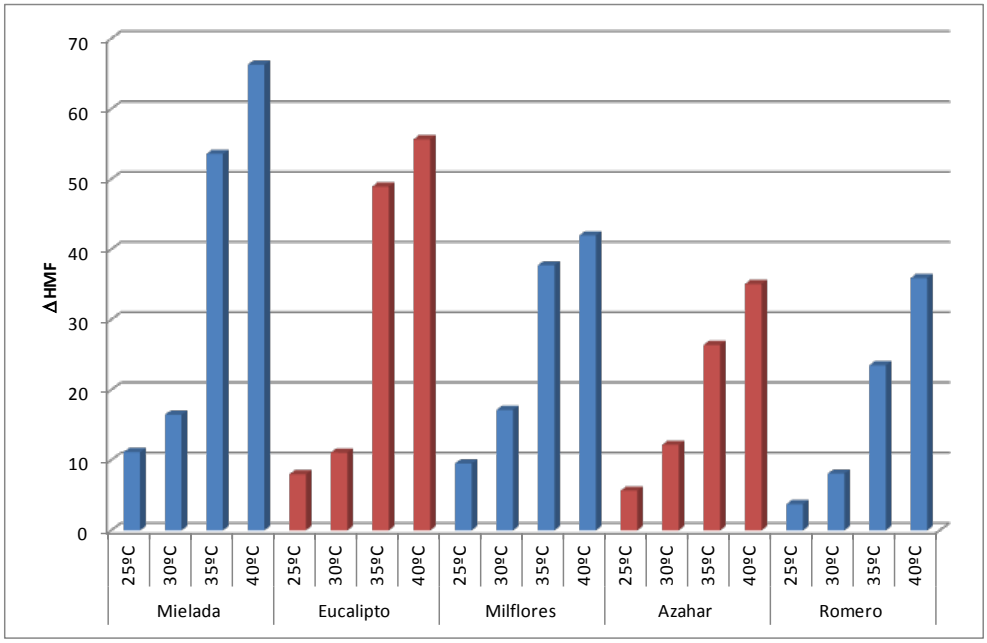


Figura V.3. Variación del contenido de HMF a los 62 días en cada una de las mieles a las diferentes temperaturas de estudio.

Se observa claramente la influencia de la temperatura, siendo las mieles de mielada y de eucalipto las que presentaron mayor variación y las de romero y azahar las que menos.

3.1.3. Evolución de la actividad diastásica con las condiciones de almacenamiento

En la figura V.4 se muestra la evolución de la actividad diastásica en las diferentes mieles estudiadas al ser sometidas a los tiempos y temperaturas de almacenamiento.

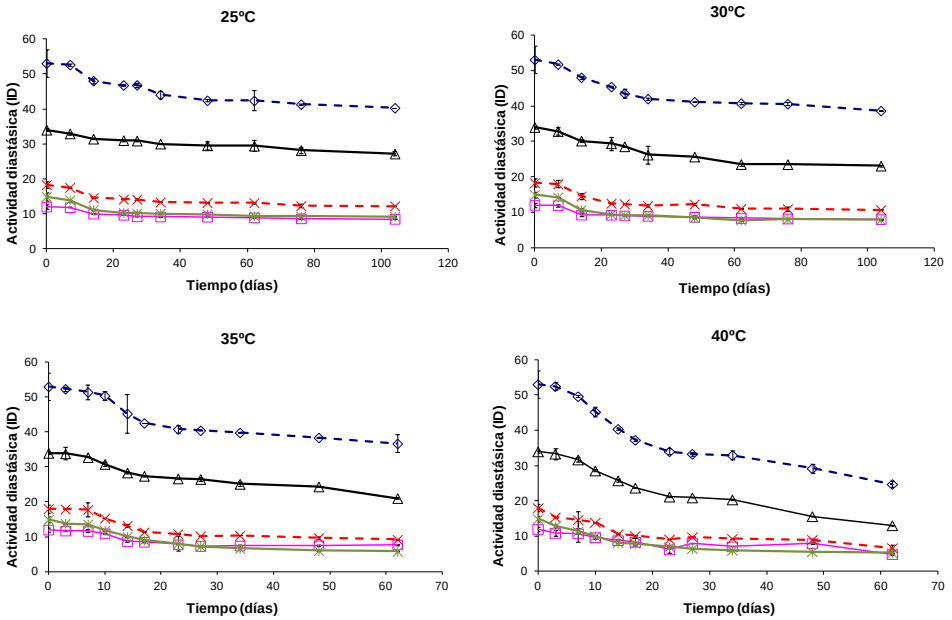


Figura V.4. Evolución de la actividad diastásica a las diferentes temperaturas de almacenamiento estudiadas en miel de mielada (-◊-);eucalipto (Δ); milflores (-x-); azahar (□); romero (✳).

Se observa que a mayor temperatura la disminución de la actividad diastásica de las mieles fue más rápida, especialmente cuanto mayor era el punto de partida. En general, se observa un descenso más rápido de la actividad diastásica durante los primeros 20 días de tratamiento, decreciendo posteriormente más lentamente.

Para apreciar mejor el diferente comportamiento de las mieles en relación a este parámetro, en la figura V.5 se ha representado la variación de la actividad diastásica tras 62 días de tratamiento, con respecto al valor inicial, para cada tipo de miel y a las diferentes temperaturas de estudio

Se observa que la mayor disminución de este parámetro se dio en las mieles que partían de un mayor valor inicial (mielada y eucalipto), y la menor disminución en la de azahar (la de menor valor inicial). En todas las mieles, el descenso de la actividad diastásica fue mayor cuanto más altas eran las temperaturas.

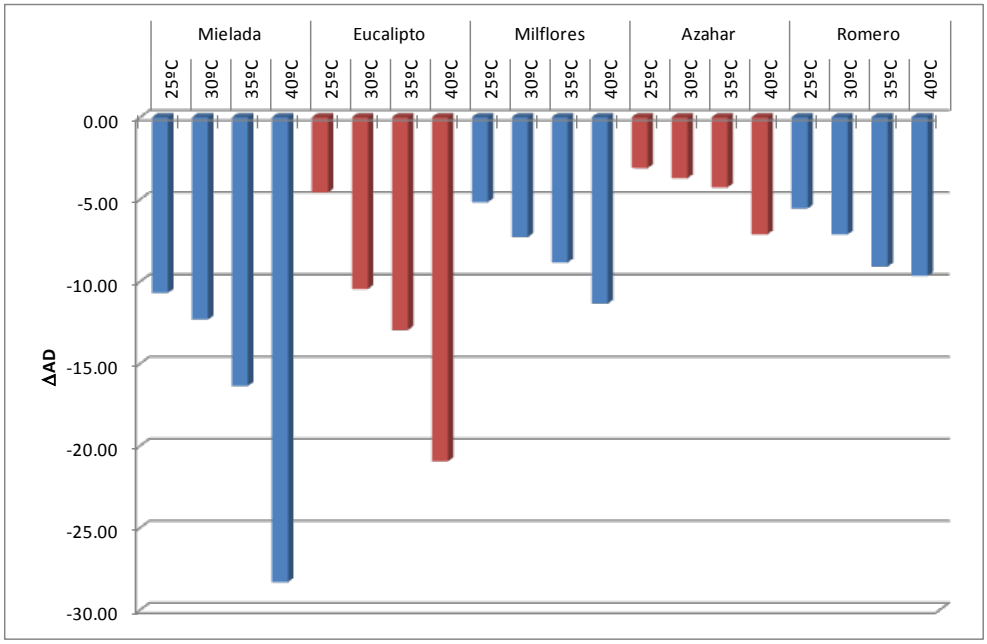


Figura V.5. Variación de los valores de actividad diastásica a los 62 días en cada una de las mieles a las diferentes temperaturas de estudio.

A la vista de estos resultados de HMF y actividad diastásica, se pone de manifiesto que para preservar la calidad de la miel es esencial el control de la temperatura y del tiempo de permanencia durante el almacenamiento de la miel recién cosechada. Durante la época estival, temperaturas de 30 y 40ºC son habituales en zonas del sur de Europa, y pueden provocar cambios significativos en parámetros como el HMF y la actividad diastásica, incluso en periodos de tiempo relativamente cortos. Sin embargo parece más aconsejable la utilización del HMF como indicador del envejecimiento de la miel, ya que en principio todas las mieles parten de valores muy bajos y semejantes. Este hecho que no ocurre con la actividad diastásica, ya que habría que conocer el valor de partida para estimar si una miel conserva su frescura en un momento dado.

3.1.4. Evolución del color con las condiciones de almacenamiento

En relación a los parámetros de color, se observó en todas las mieles una tendencia similar, reduciéndose la luminosidad y la pureza de color al aumentar el tiempo y la temperatura de residencia, y variando el tono hacia valores más rojizos y menos amarillos. La única excepción fue la miel de mielada en la que se invirtió esta tendencia, evolucionado hacia valores más amarillos. Sin embargo,

hay que tener en cuenta que en este tipo de miel las variaciones son menos apreciables al ojo humano, ya que la pureza de color es mucho menor (más cerca del origen de coordenadas), tal y como se puede apreciar en la figura V.6.

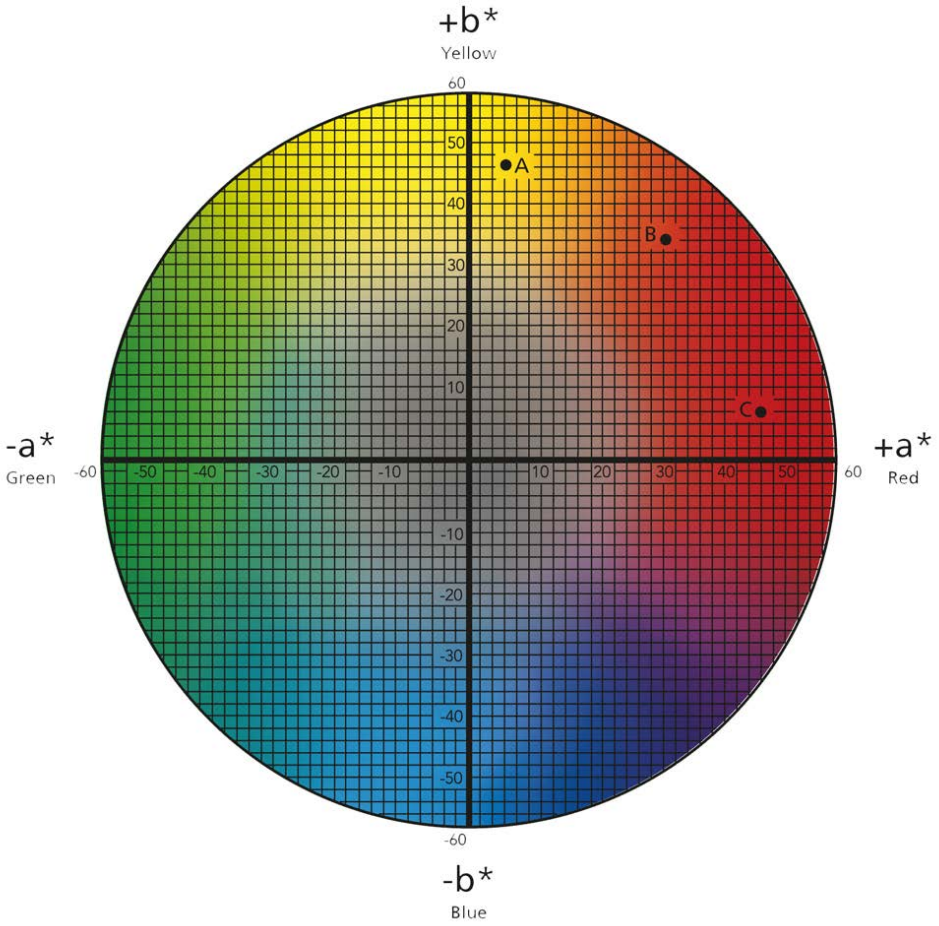


Figura V.6. Plano de color del espacio CIE L*a*b*.

Debido a la gran cantidad de gráficas generadas, y para mostrar de forma más sintetizada los cambios de color, las figuras V.7 y V.8 muestran las variaciones de los parámetros CIE L*a*b* para las mieles de mielada y de romero, ya que fueron las que presentaron las menores y mayores variaciones, respectivamente. Las gráficas del resto de mieles se muestran en los anexos (ANEXO I).

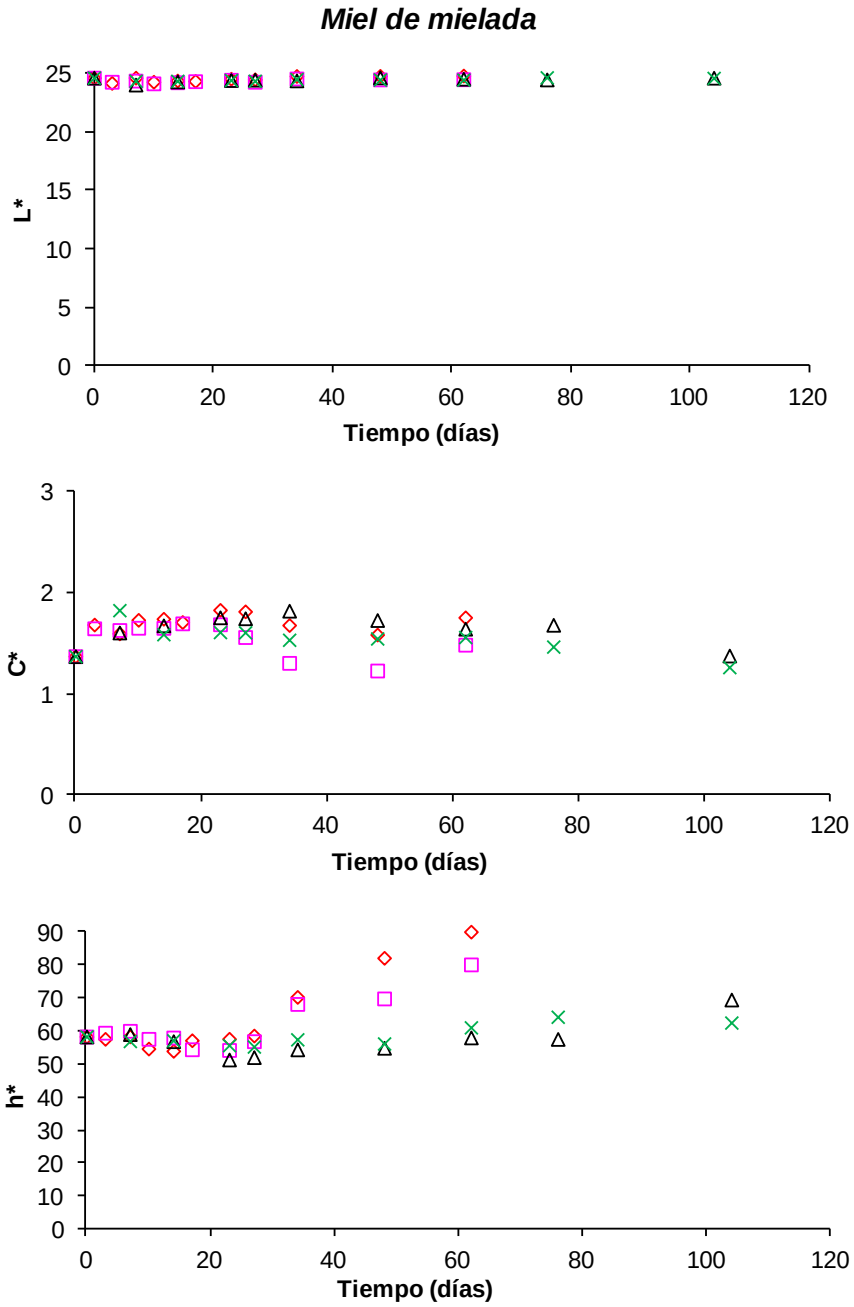


Figura V.7. Evolución en el tiempo de la lunimosidad (L*), el chroma (C*) y el tono (h*) en miel de mielada sometida a diferentes temperaturas: 25ºC (x); 30ºC (Δ); 35ºC (□); 40ºC (◊).

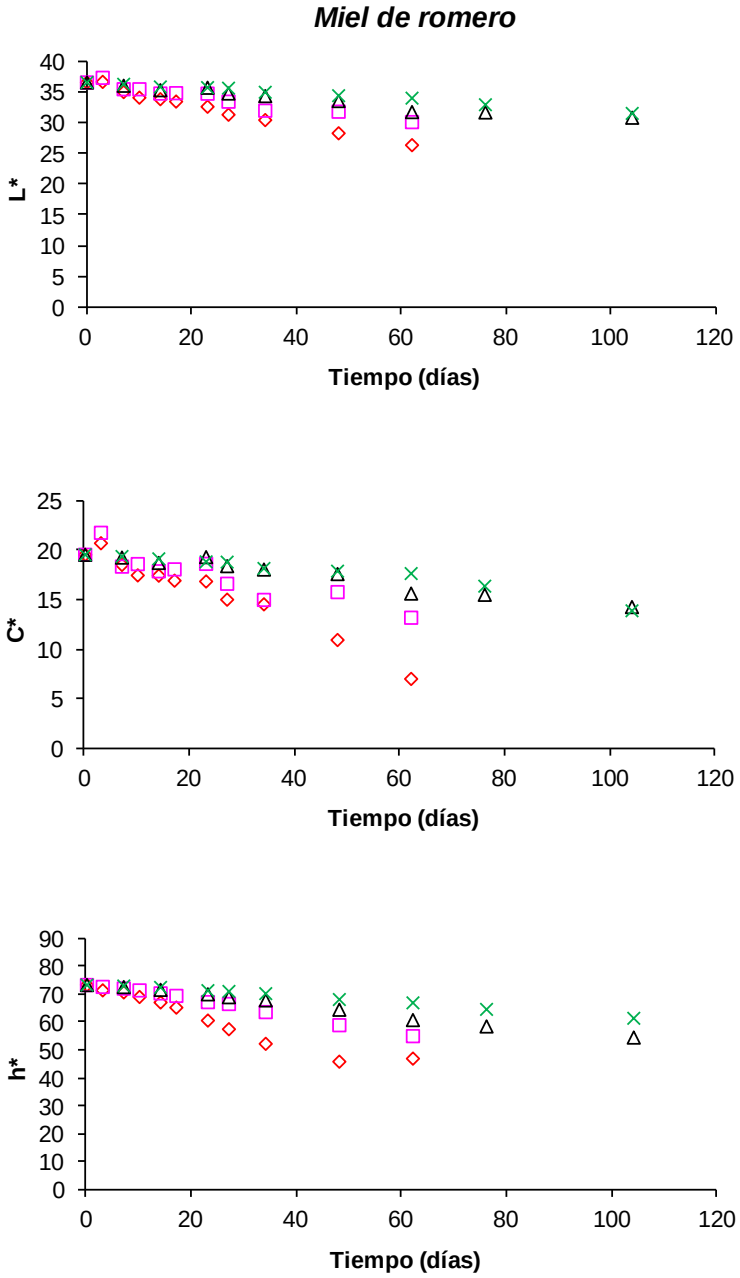


Figura V.8. Evolución en el tiempo de la lunimosidad (L*), el chroma (C*) y el tono (h*) en miel de romero sometida a diferentes temperaturas: 25ºC (x); 30ºC (Δ); 35ºC (□); 40ºC (◊)

En las figura V.7 se observa que, en la miel de mielada, las variaciones en los parámetros de color (L*, C* y h*) fueron muy pequeñas. Los valores de luminosidad eran similares para todas las temperaturas y tiempos, oscilando entre 24 y 25. Aunque las variaciones de tono llegaron a ser de hasta 30º (60 días a 40ºC) al movernos en valores de croma inferiores a 2, la diferencias de color eran inapreciables.

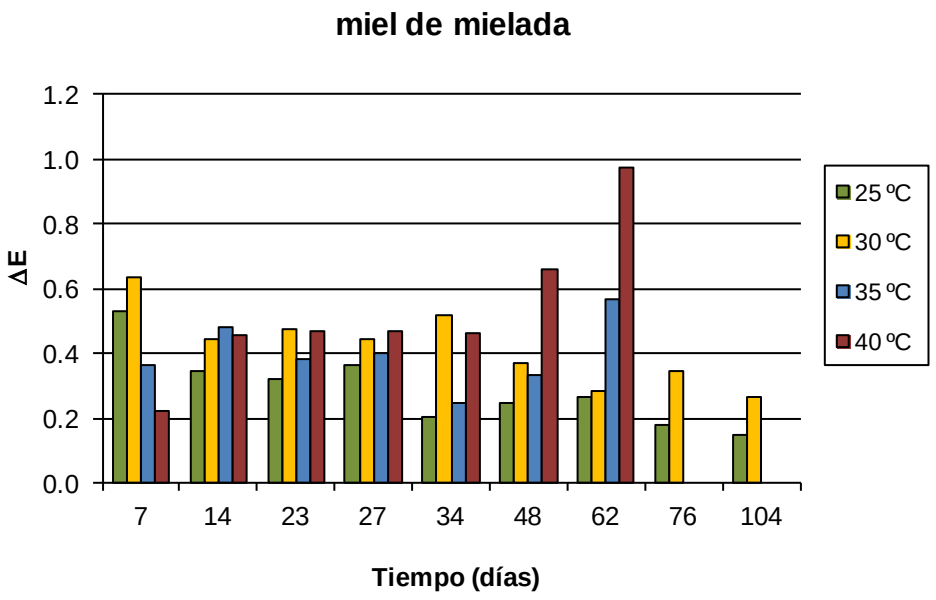
En lo que respecta a la miel de romero (figura V.8) se observa una mayor influencia de las condiciones de almacenamiento, en comparación con la de mielada. La luminosidad, el croma y el tono se ven reducidas de forma más acusada cuanto mayor era el tiempo y la temperatura de almacenamiento, alcanzando a 40ºC disminuciones de luminosidad de más de 10 puntos, de chorma (C*) de 12.5 puntos y de tono (h*) de 26º.

En las mieles de eucalipto y milflores (ANEXO I) el comportamiento es análogo a la miel de romero, pero con variaciones menos acusadas. Sin embargo, en la miel de azahar se aprecia un comportamiento algo distinto, ya que a temperaturas de 25, 30 y 35 ºC las variaciones no eran muy acusadas, pero a 40ºC los valores de luminosidad, croma y tono descendieron bruscamente. Este comportamiento puede ser debido a variaciones en la opacidad/translucidez de la miel de azahar al ser sometidas a temperaturas más altas.

En la figura V.9 se muestra la variación de color para la miel de mielada y la de romero después de cada tratamiento, representando las diferencias de color (ΔE) entre el punto final y el punto inicial, calculado en base a la ecuación (V.1)

$$\Delta E = \sqrt[2]{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \qquad \text{(V.1)}$$

En la miel de romero se aprecia de forma muy evidente la influencia del tiempo y la temperatura en la variación total de color, sin embargo en la de mielada los valores absolutos de variación de color son mucho menores. En esta última las diferencias de color nunca fueron superiores a 5 puntos, valor por encima del cual el ojo humano es capaz de apreciar diferencias (Hutchings, 1999).



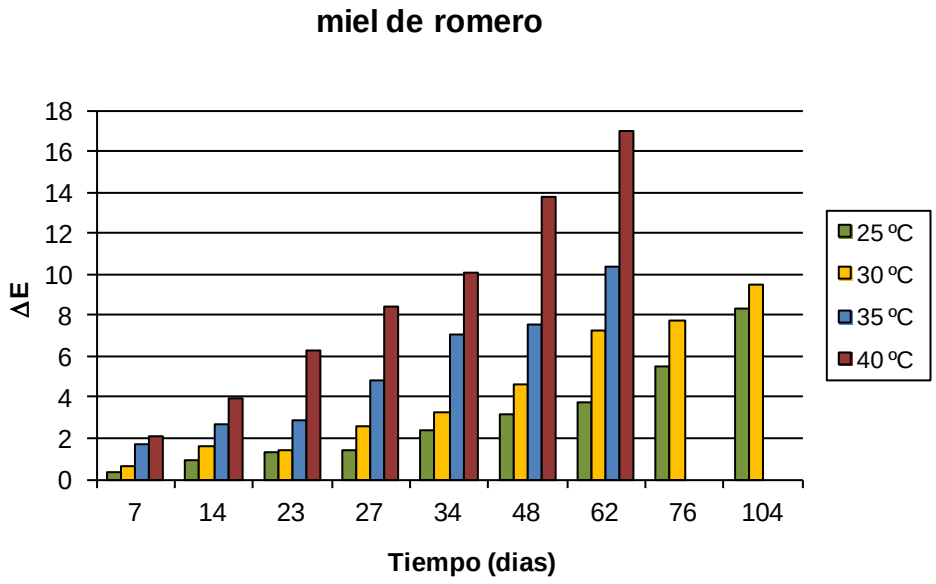


Figura V.9. Valores de las diferencias de color obtenidas durante la etapa de almacenamiento en las mieles de mielada y romero.

Para evaluar la influencia de los tratamientos en la translucidez de las mieles se calculó el coeficiente absorción/dispersión (K/S). Las figuras V.10 y V.11 muestran los valores de dicho coeficiente para las diferentes longitudes de onda del espectro visible (400-700 nm) al tiempo 0 y después de ser sometidas a 40ºC durante 62 días, tratamiento en el que se apreció la mayor diferencia de color.

A tiempo inicial (figura V.10), La miel de azahar, mostró con diferencia una mayor opacidad a lo largo de todo el rango de longitudes de onda, con relación a las demás. En el caso opuesto, está la de mielada que mostró la mayor translucidez (menor opacidad).

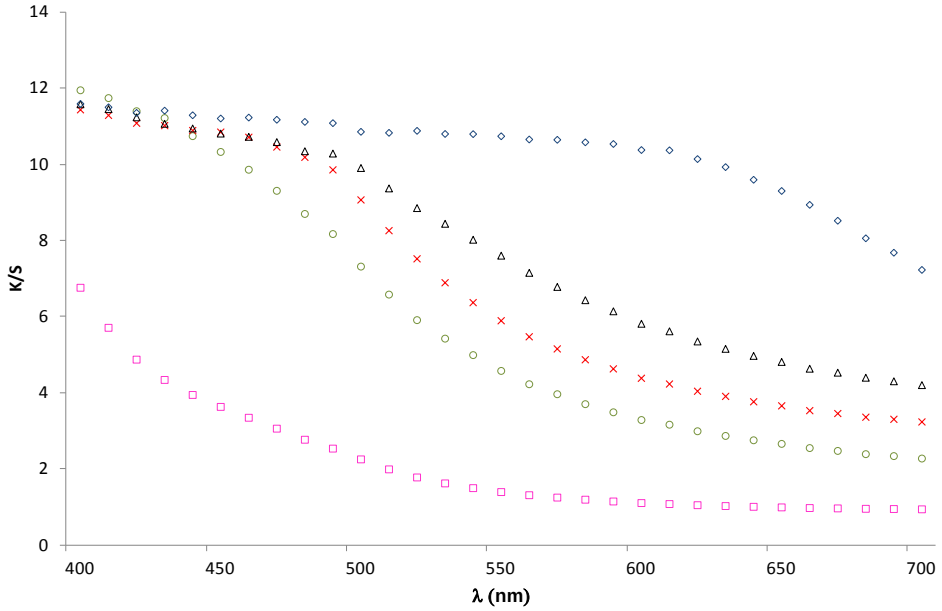


Figura V.10. Valores iniciales (t=0) de K/S en miel de mielada (◊); azahar (□); eucalipto (Δ); milflores (x); romero (O).

En la figura V.11 se observa que para todas las mieles, excepto para la miel de mielada, los valores de la constante K/S aumentaron de forma considerable, especialmente a longitudes de onda bajas. Esto refleja que todas las mieles se hacen más translúcidas como consecuencia del tratamiento aplicado. La miel de azahar es la que experimenta un mayor aumento de la constante K/S, acercándose a los valores de las demás. Esta variación en la translucidez de la miel de azahar es probablemente la causante del cambio brusco en los valores de luminosidad, croma y tono al pasar de temperaturas de 35 a 40ºC que se ha comentado anteriormente.

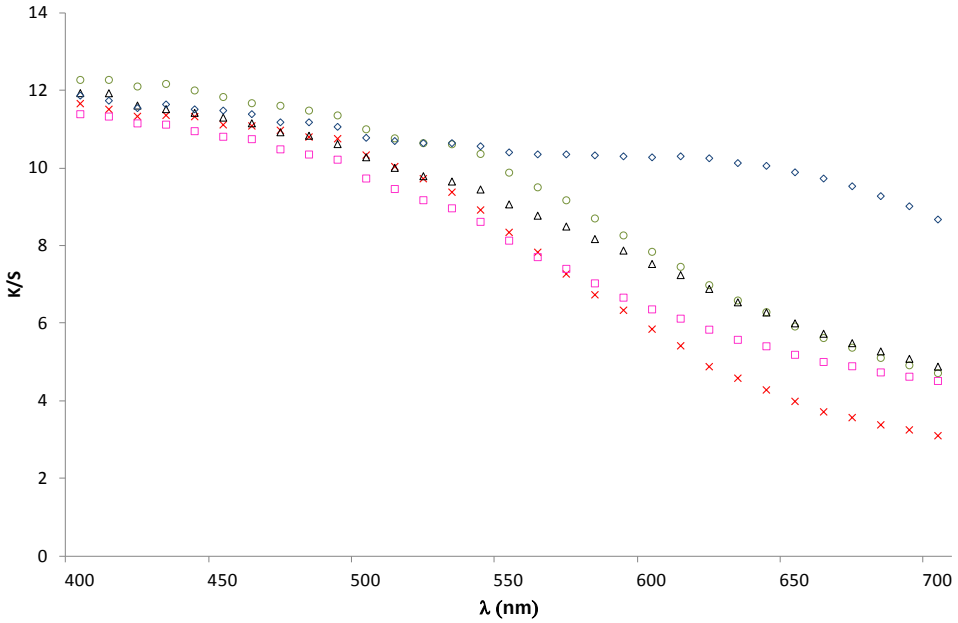


Figura V.11. Valores de K/S en miel de mielada (◊);eucalipto (Δ); milflores (x); azahar (□); romero (O), al ser sometidas durante 62 días a 40ºC.

Del estudio del color, también se pone de manifiesto la importancia del control de la temperatura y del tiempo de permanencia durante el almacenamiento de la miel recién cosechada, ya que éste puede sufrir variaciones de color apreciables, especialmente en las mieles más claras.

3.2. Etapa de Licuación

3.2.1. Caracterización fisicoquímica y color de las mieles antes de iniciar el estudio de licuación

La tabla V.6.muestra los valores de los parámetros fisicoquímicos de las mieles antes de comenzar el estudio de licuación. Tal y como se ha comentado anteriormente, por la imposibilidad de realizar todas las experiencias de almacenamiento, licuación y pasterización simultáneamente, fue necesario emplear lotes distintos en cada caso.

Tabla V.6. Valores iniciales de las mieles antes de comenzar el estudio de licuación.

	Conduct. (µS/cm)	Acidez total (meq/kg)	pH	Humedad (g/100g)	HMF (mg/kg)	Actividad Diastásica (ID)
MIELADA	732 ± 15	43.2 ± 2.6	4.8 ± 0.1	15.6 ± 0.3	4.29 ± 0.23	50.59 ± 1.90
EUCALIPTO	456 ± 7	33.4 ± 3.1	4.1 ± 0.1	17.3 ± 0.4	4.49 ± 0.69	34.27 ± 0.48
MILFLORES	180 ± 4	28.9 ± 1.7	4.0 ± 0.2	19.6 ± 0.4	4.84 ± 0.38	22.67 ± 0.48
AZAHAR	171 ± 4	29.1 ± 2.1	4.0 ± 0.1	18.0 ± 0.4	4.54 ± 0.23	21.17 ± 0.59
ROMERO	105 ± 3	24.2 ± 1.7	3.9 ± 0.1	18.8 ± 0.3	5.03 ± 0.38	12.90 ± 1.23

Todos los valores de los parámetros analizados, estaban dentro de los límites legales. Las diferencias observadas entre las mieles, al igual a lo observado en el estudio de almacenamiento, eran debidas especialmente a su origen botánico. La miel de mielada presentó valores más altos de conductividad, acidez, pH y actividad diastásica, mientras que las mieles de romero y azahar, fueron las que mostraron los valores más bajos en estos cuatro parámetros. Las mieles de eucalipto y milflores mostraron valores intermedios. Estos datos fueron similares a los obtenidos en las mieles utilizadas en la etapa de almacenamiento. La única excepción fue la conductividad en la miel de milflores, con valor de 356 µS/cm en la etapa de almacenamiento y de 180 µS/cm en la de licuación. Este hecho no es sorprendente ya que este tipo de miel, calificada como tal cuando no puede ser clasificada con un origen botánico específico, puede presentar características muy variables entre lotes.

Los niveles de HMF fueron en todos los casos muy bajos, oscilando entre 4.29 mg/kg en la miel de mielada y 5.03 mg/kg en la de romero. Estos valores confirman que se trataba de mieles recién recolectadas.

La actividad diastásica de la miel de mielada fue la más alta (50.59 ID), seguida de la de eucalipto (34.27 ID). La miel de romero presentó el menor valor (12,90 ID) y las de milflores y azahar valores intermedios (22.67 ID y 21.17 ID, respectivamente).

En la tabla V.7 se muestra la información de los parámetros de color CIEL*a*b*de las mieles antes de ser sometidas a los tratamientos de licuación.

Con la finalidad de reproducir las etapas del proceso llevado a cabo en la industria, las mieles se sometieron a un filtrado, previo a la licuación, que tiene por objeto eliminar partículas sólidas como restos de colmenas, abejas muertas, impurezas, etc. Este filtrado motivó la oclusión de pequeñas burbujas de aire en las muestras, lo que dio lugar a medidas erróneas en el color de las mieles al tiempo inicial (t=0 h). Por este motivo, a efectos de la observación de la evolución del color, se consideró como tiempo inicial el siguiente (t=12h), ya que en este tiempo las burbujas ya habían desaparecido (tabla V.7).

Tabla V.7. Valores de luminosidad, tono y croma de las 5 mieles estudiadas, después de permanecer 12 horas a las temperaturas de estudio.

	Luminosidad (L*)	Chroma (C*)	Tono (h*)
55ºC			
MIELADA	24.99 ± 0.03	1.85 ± 0.08	51.58 ± 0.01
EUCALIPTO	30.56 ± 0.01	12.03 ± 0.03	60.39 ± 0.02
MILFLORES	32.08 ± 0.00	12.05 ± 0.02	65.27 ± 0.03
AZAHAR	36.87 ± 0.01	18.37 ± 0.02	78.28 ± 0.00
ROMERO	36.06 ± 0.03	17.88 ± 0.04	77.18 ± 0.02
50ºC			
	Luminosidad (L*)	Chroma (C*)	Tono (h*)
MIELADA	24.66 ± 0.03	1.89 ± 0.03	55.61 ± 0.05
EUCALIPTO	29.85 ± 0.02	10.41 ± 0.03	62.33 ± 0.02
MILFLORES	31.87 ± 0.01	12.96 ± 0.02	64.36 ± 0.02
AZAHAR	37.15 ± 0.03	18.87 ± 0.02	78.73 ± 0.02
ROMERO	35.91 ± 0.01	17.72 ± 0.02	76.48 ± 0.01
45ºC			
	Luminosidad (L*)	Chroma (C*)	Tono (h*)
MIELADA	24.68 ± 0.03	1.87 ± 0.06	53.34 ± 0.01
EUCALIPTO	30.31 ± 0.01	10.43 ± 0.06	64.70 ± 0.02
MILFLORES	31.66 ± 0.00	11.55 ± 0.03	64.48 ± 0.02
AZAHAR	37.47 ± 0.01	19.28 ± 0.02	79.37 ± 0.00
ROMERO	35.13 ± 0.03	15.13 ± 0.04	77.44 ± 0.02

Todas la mieles tenían un color comprendido entre el amarillo y el rojo (primer cuadrante del espacio de color CIE L*a*b*). Tomando como valores iniciales los de la tabla V.7, se puede observar que, como era de esperar, la miel de mielada es la más distinta desde el punto de vista del color, mostrando la menor luminosidad,

la menor pureza de color (chroma) y el menor tono. Los valores más altos de los tres parámetros correspondieron a las mieles de azahar y romero, con pocas diferencias entre ellas. Valores intermedios presentaron las mieles de eucalipto y milflores.

3.2.2. Evolución del HMF con las condiciones de licuación

En la figura V.12 se muestra la evolución del contenido de HMF en las diferentes mieles después de ser sometidas a las condiciones de licuación. Todas las mieles experimentaron un aumento semejante de este parámetro, siendo la de romero la que mostró en todo momento los valores más altos. Se observa que los niveles de HMF se incrementaron con el tiempo, de forma más acusada cuanto mayor era el aumento de la temperatura de licuación.

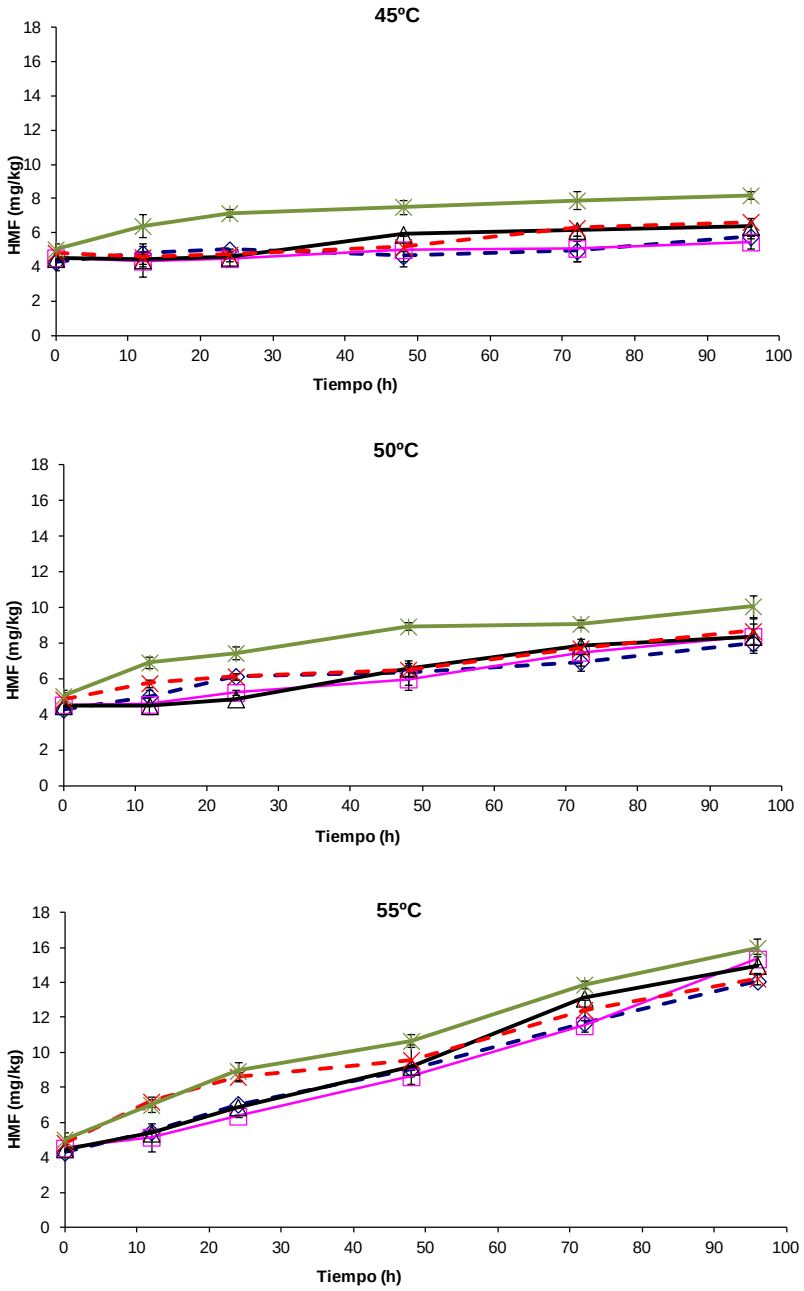


Figura V.12. Evolución del contenido de HMF a las diferentes temperaturas de licuación estudiadas en miel de mielada (-◊-); eucalipto (Δ); milflores (-x-); azahar (□); romero (✳).

La figura V.13 muestra el incremento de HMF para todas las mieles al mayor tiempo de estudio de licuación (96 h). Las variaciones observadas en todas las mieles fueron similares y en ningún caso superiores a los 11 mg/kg. Es interesante puntualizar que se experimentó un mayor aumento del incremento de HMF cuando se pasaba de 50ºC a 55ºC, en relación al experimentado cuando se elevaba la temperatura de 45ºC a 50ºC. Este comportamiento fue similar en las cinco mieles estudiadas.

Es de destacar que los incrementos de HMF, a nivel global, en esta etapa fueron mucho menores a los observados en la etapa de almacenamiento. Aunque las temperaturas eran inferiores en el almacenamiento, se demuestra que tiempos prolongados pueden provocar incrementos más importantes de HMF, a los experimentados a temperaturas algo superiores aplicadas a tiempos menores.

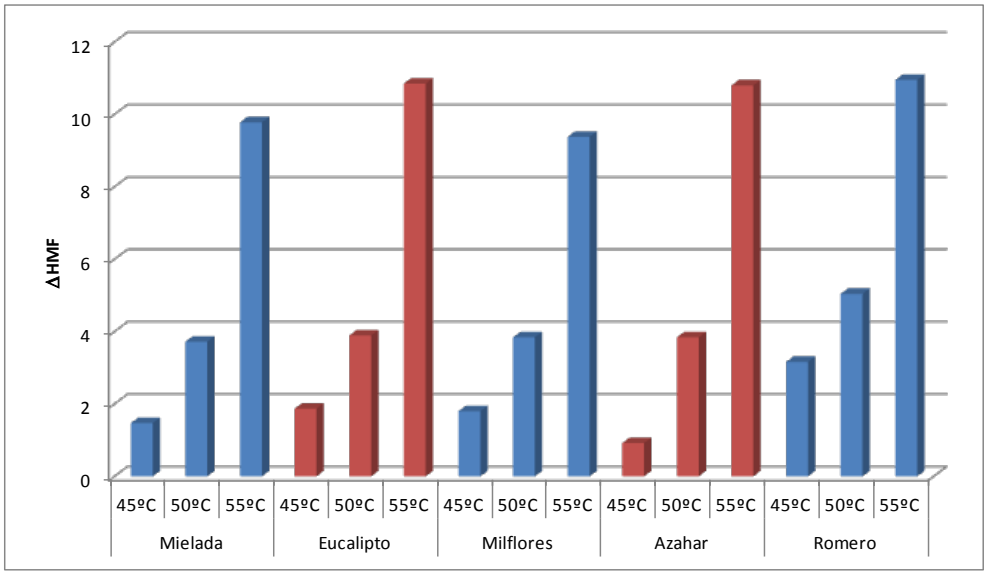


Figura V.13. Incremento del valor de HMF a las 96 horas en cada una de las mieles a las diferentes temperaturas de estudio.

3.2.3. Evolución de la actividad diastásica con las condiciones de licuación

En la figura V.14 se muestra la evolución de la actividad diastásica en las diferentes mieles estudiadas al ser sometidas a los tiempos y temperaturas de licuación.

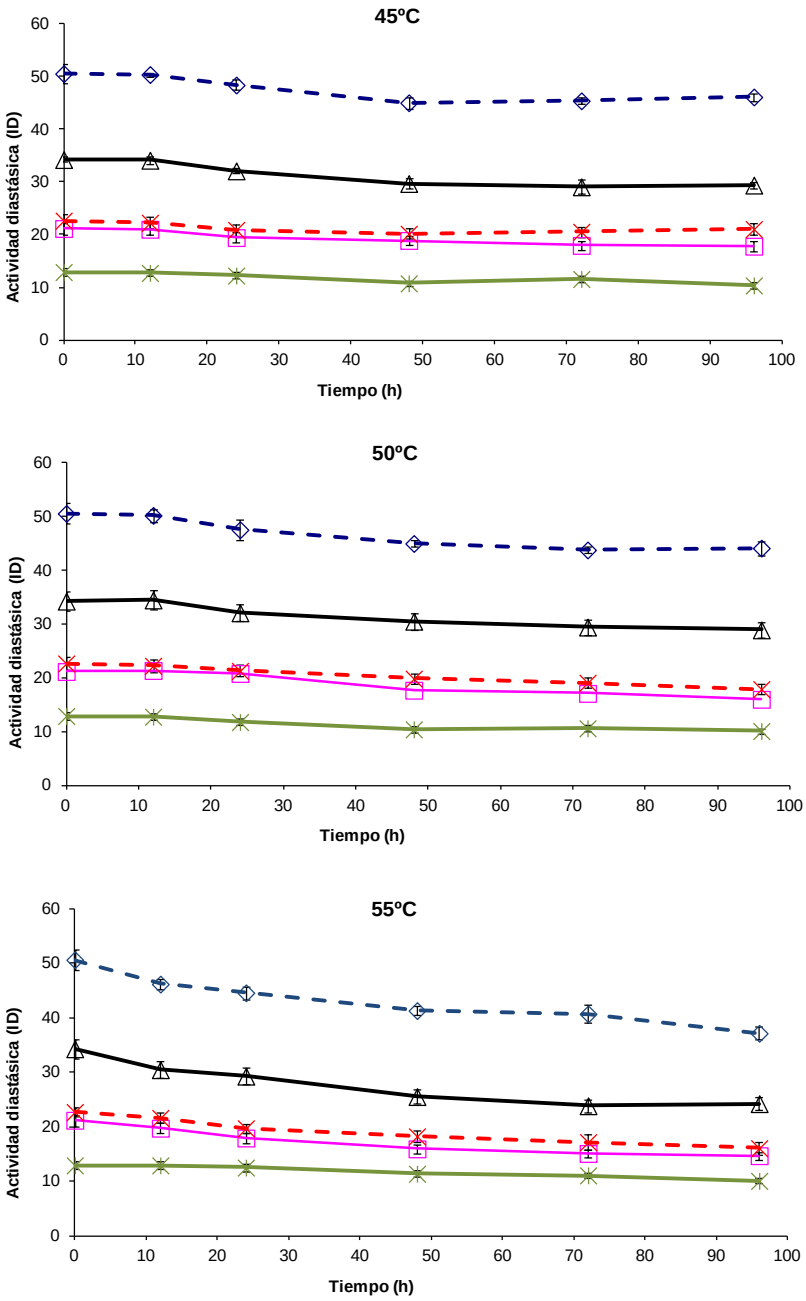


Figura V.14. Evolución de la actividad diastásica a las diferentes temperaturas de licuación estudiadas en miel de mielada (-◊-); eucalipto (Δ); milflores (-x-); azahar (□); romero (ж).

Al igual que lo observado para el HMF, se aprecia claramente la influencia del aumento de la temperatura en la evolución (en este caso disminución) de la actividad diastásica, especialmente en aquellas mieles que parten de valores iniciales más altos (mielada y eucalipto).

En la figura V.15 se ha representado el incremento del índice de actividad diastásica a las 96 horas de tratamiento para las cinco mieles, a las diferentes temperaturas estudiadas.

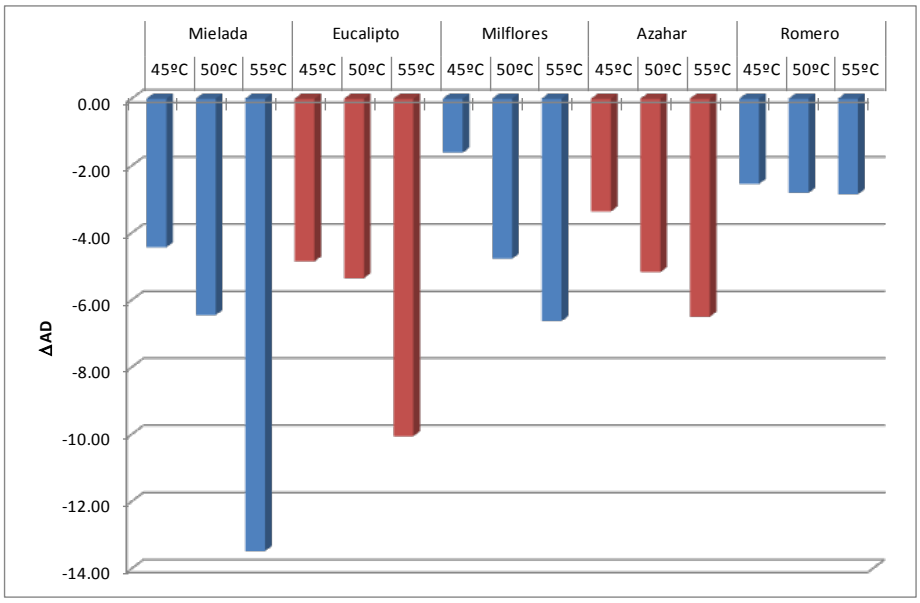


Figura V.15. Variación del índice de actividad diastásica a las 96 hora en cada una de las mieles a las diferentes temperaturas de estudio.

Al igual que lo observado para el HMF, la disminución de la actividad diastásica, a nivel global, durante la etapa de licuación fue menor que la que tuvo lugar en la etapa de almacenamiento. Esto confirma que la actividad diastásica también se ve más afectada por tiempos prolongados aunque las temperaturas sean inferiores.

3.2.4. Evolución del color con las condiciones de licuación

Las figuras V.17 y V.18 muestran, como ejemplo, las variaciones de los parámetros CIE L*a*b* de la miel romero y la de mielada, tal y como se hizo en la etapa de almacenamiento. Las gráficas de variación de parámetros de color para el resto de mieles se muestran en el ANEXO II.

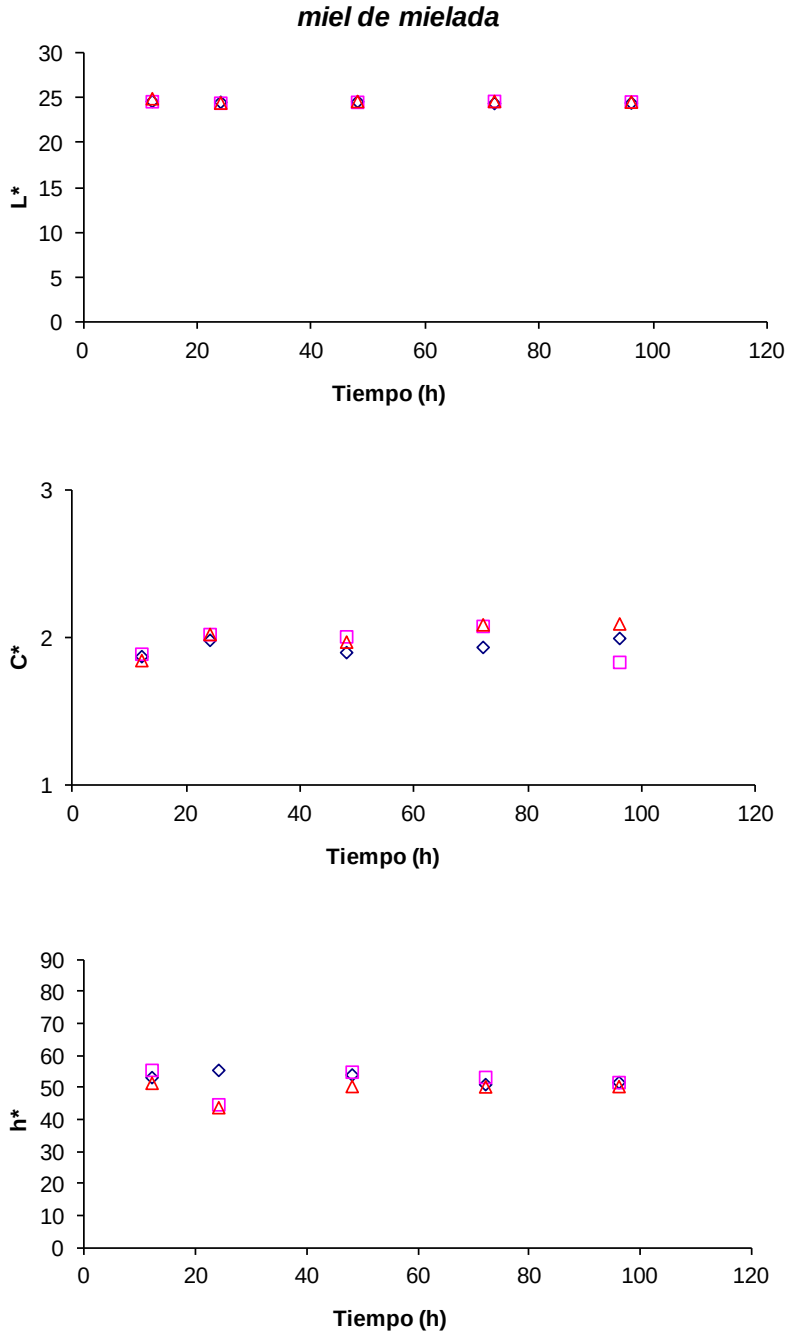


Figura V.16. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de mielada con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 45ºC (◊); 50ºC (□); 55ºC (Δ).

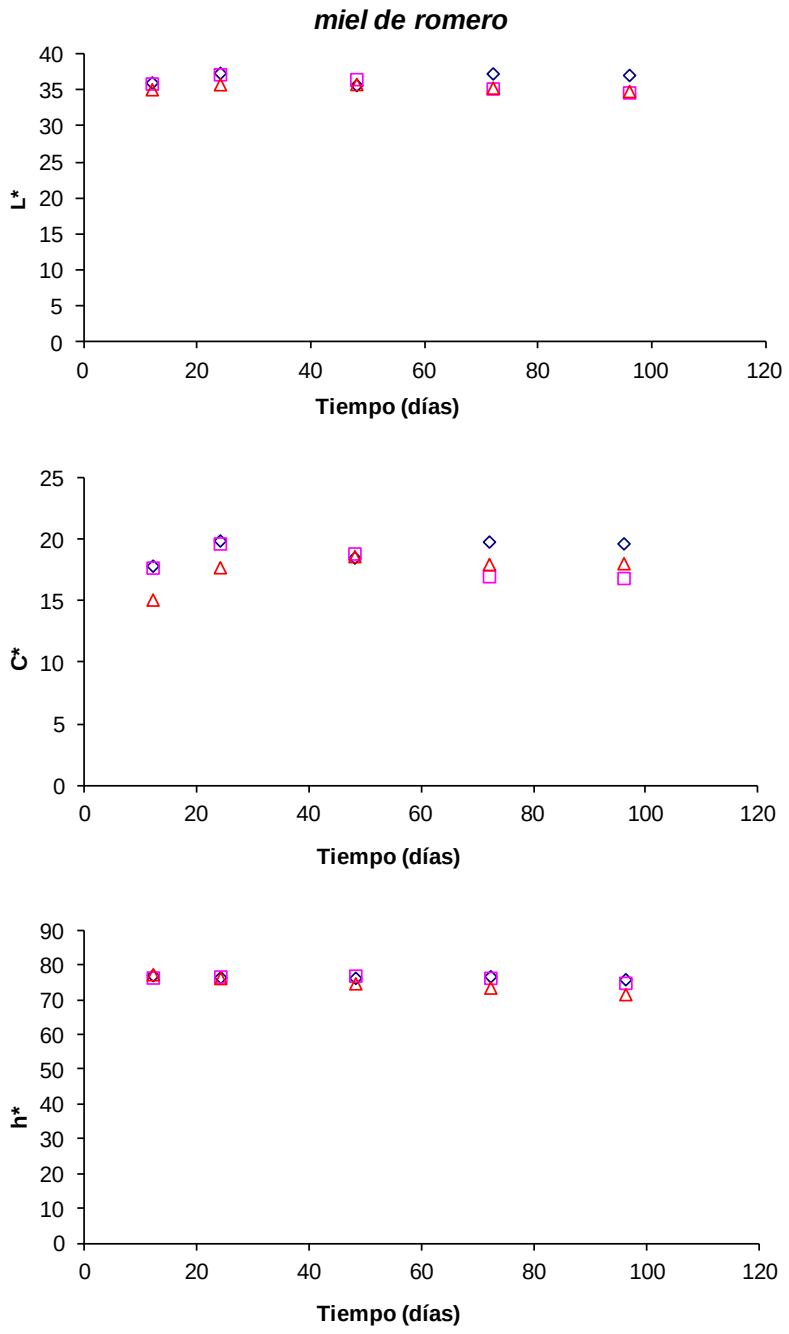


Figura V.17. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de romero con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 45ºC (◊); 50ºC (□); 55ºC (Δ).

Al contrario de lo que ocurría en la etapa de almacenamiento, se puede apreciar en las gráficas V.16 y V.17 que las variaciones de color sufridas por las mieles fueron mínimas. En ningún caso fueron apreciables por el ojo humano, ya que los valores de las diferencias de color (ΔE) fueron inferiores a 1 en la miel de mielada y menores de 3.7 en la miel de romero (figura V.18). En ninguna miel se superó el valor de 5, a partir del cual el ojo humano es capaz de apreciar diferencias (Hutchings, 1999).

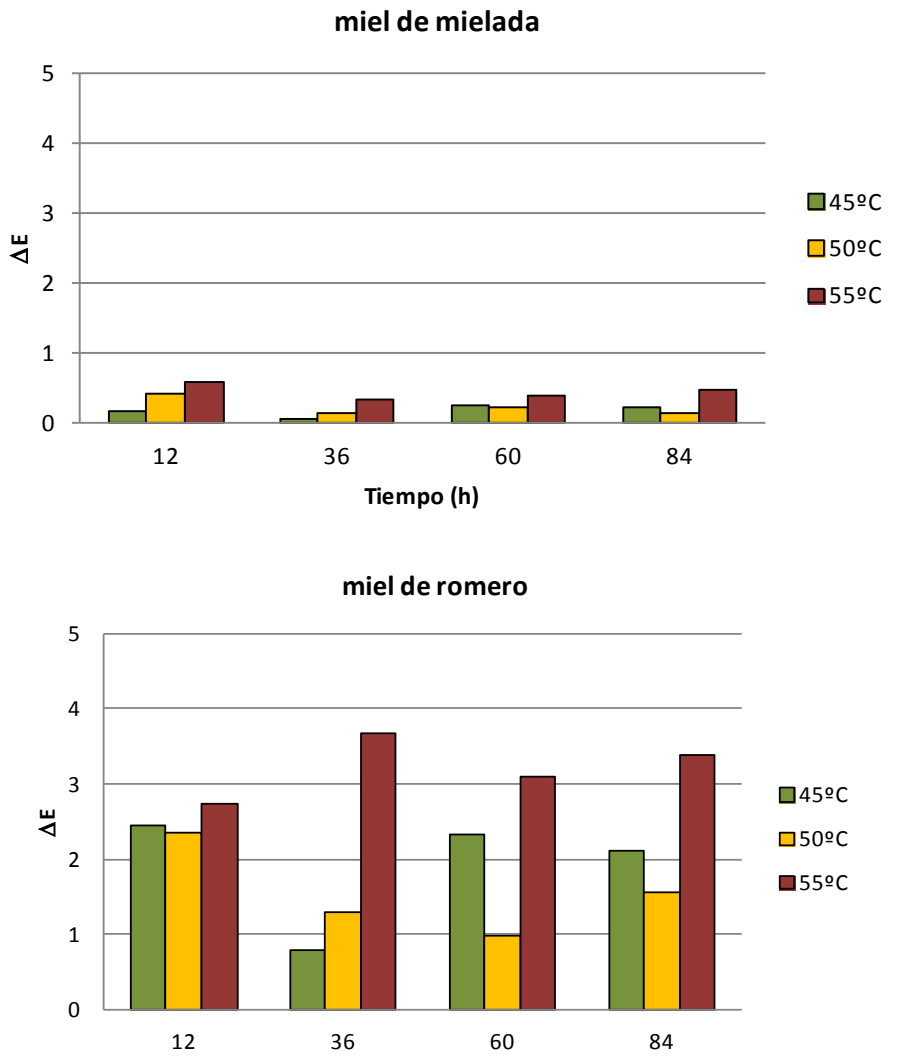


Figura V.18. Valores de las diferencias de color obtenidas durante la etapa de licuación en las mieles de mielada y romero.

En la figura V.19 se representa los valores iniciales (12 horas) de K/S de las diferentes mieles. Se observa que la miel de mielada presentó una mayor translucidez (valores más altos). En el lado opuesto, la miel de azahar mostró los valores más bajos, y por tanto era la que tenía menor translucidez a lo largo de todo el rango de longitudes de onda. El resto de mieles se encontraban en un término medio, siendo la miel de eucalipto la más opaca de las tres, seguida de la de milflores y la de romero.

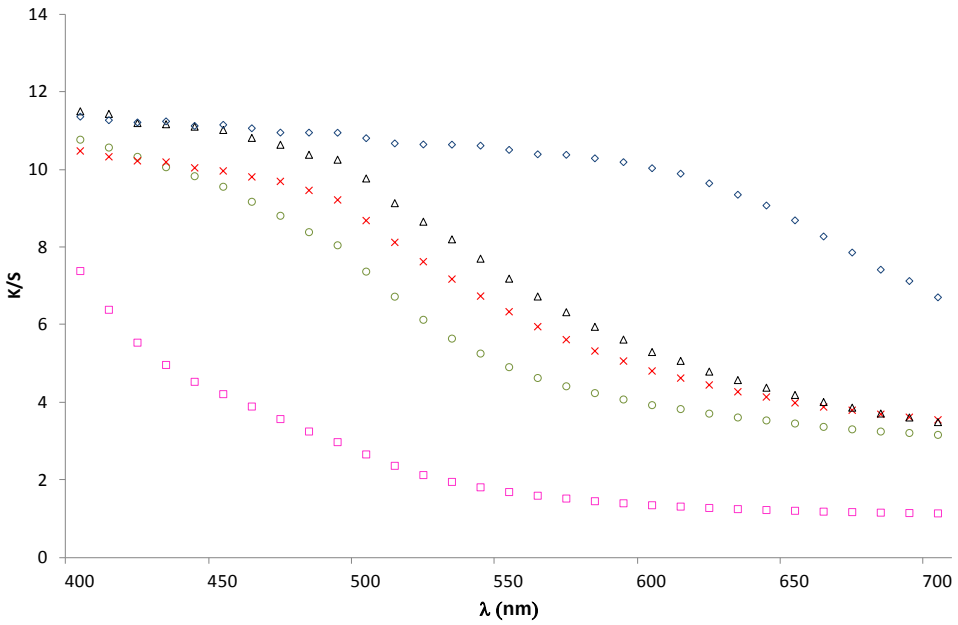


Figura V.19. Valores iniciales (12horas a 55ºC) de K/S en miel de mielada (◊); eucalipto (Δ); milflores (x); azahar (□); romero (O).

En la figura V.20 se representa los valores de K/S para las mieles después de ser sometidas al tratamiento más extremo de la licuación (96 horas a 55ºC). Comparando esta figura con la correspondiente al momento inicial (12 horas a 55ºC), se aprecia que no existen grandes variaciones por causa de los tratamientos térmicos de licuación. Tan sólo se aprecia un ligero aumento, con el tratamiento, de los valores de K/S en las mieles de romero, milflores y eucalipto a bajas longitudes de onda, aunque esto no supone a penas variaciones en la translucidez de las muestras.

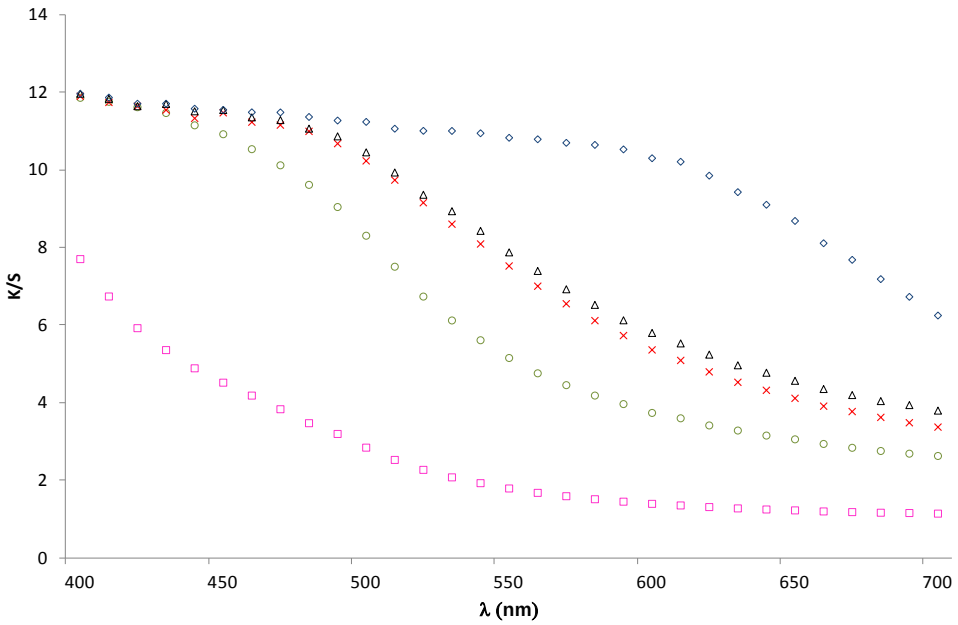


Figura V.20. Valores de K/S en miel de mielada (◊); eucalipto (Δ); milflores (x); azahar (□); romero (O), al ser sometidas a 55ºC durante 96 horas.

Los tratamientos de licuación no afectan de forma apreciable al color de las mieles, ni siquiera en las condiciones más extremas consideradas.

3.2.5. Efecto de la licuación en la viscosidad de las mieles

La viscosidad es un parámetro muy importante durante la manipulación de la miel en la industria, ya que condiciona su mezclado y bombeo. De hecho, los tratamientos de licuación se realizan en la industria (entre 40 y 55 ºC) para reducir la viscosidad de las mieles, y así poder vaciar con facilidad los bidones que las contienen. En las figuras V.21 a V.25 se muestran los valores obtenidos en los ensayos reológicos, donde se representan los esfuerzos cortantes (τ) frente a los gradientes de velocidad ($\dot{\gamma}$) en las diferentes mieles para las siguientes temperaturas: 25, 35, 45, 50 y 55ºC.

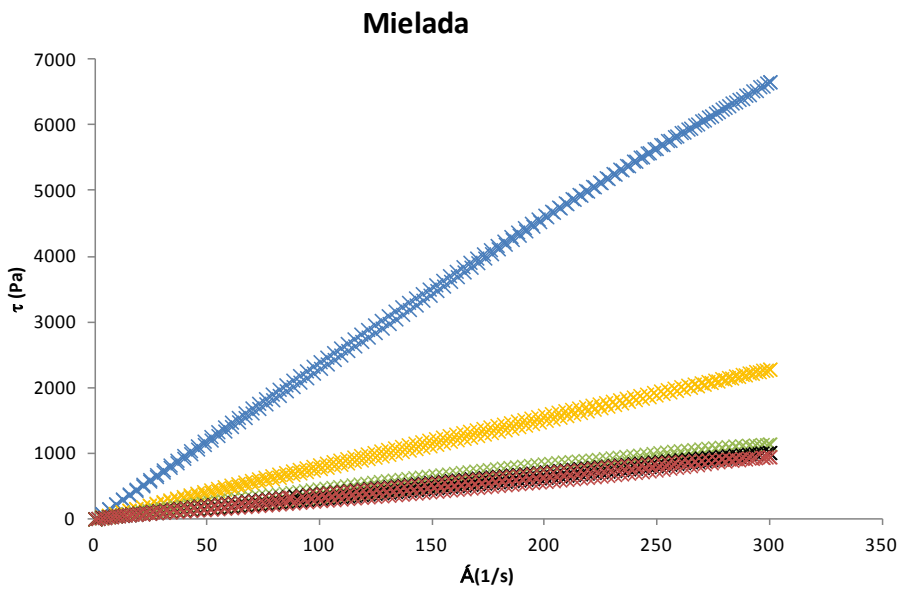


Figura V.21. Representación de los esfuerzos cortantes frente a los gradientes de velocidad en miel de mielada a: 25ºC (x); 35ºC (x); 45ºC (x); 50ºC (x); 55ºC (x).

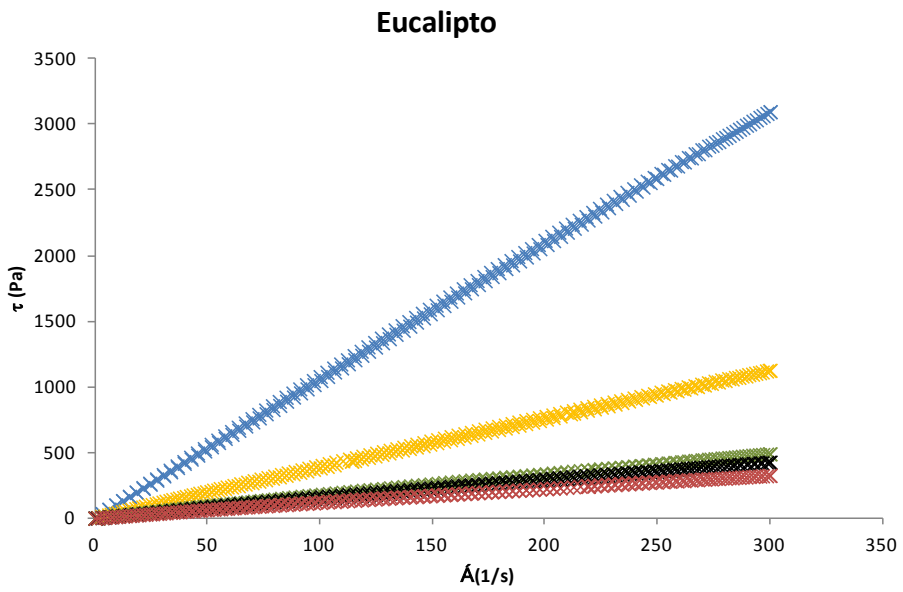


Figura V.22. Representación de los esfuerzos cortantes frente a los gradientes de velocidad en miel de eucalipto a: 25ºC (x); 35ºC (x); 45ºC (x); 50ºC (x); 55ºC (x).

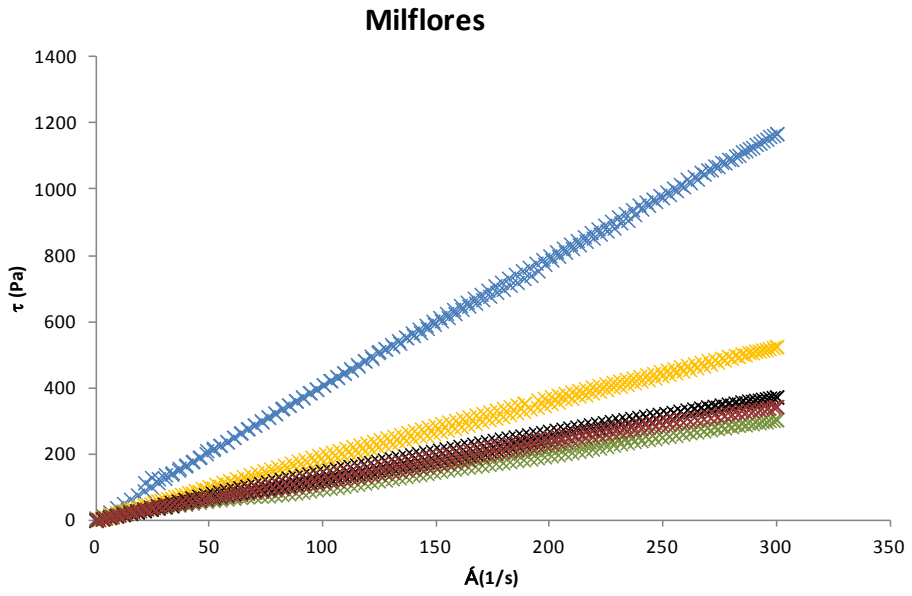


Figura V.23. Representación de los esfuerzos cortantes frente a los gradientes de velocidad en miel de milflores a: 25ºC (x); 35ºC (x); 45ºC (x); 50ºC (x); 55ºC (x).

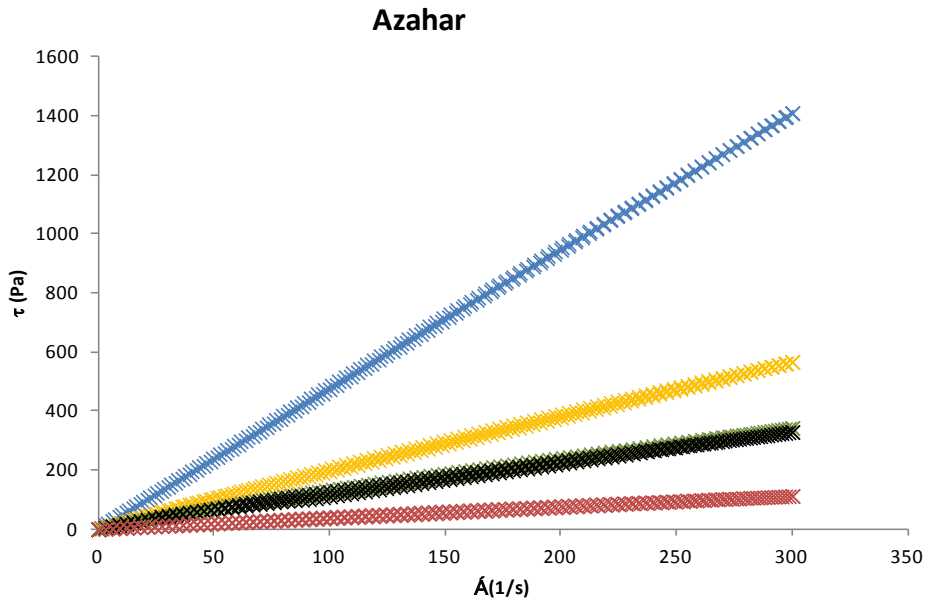


Figura V.24. Representación de los esfuerzos cortantes frente a los gradientes de velocidad en miel de azahar a: 25ºC (x); 35ºC (x); 45ºC (x); 50ºC (x); 55ºC (x).

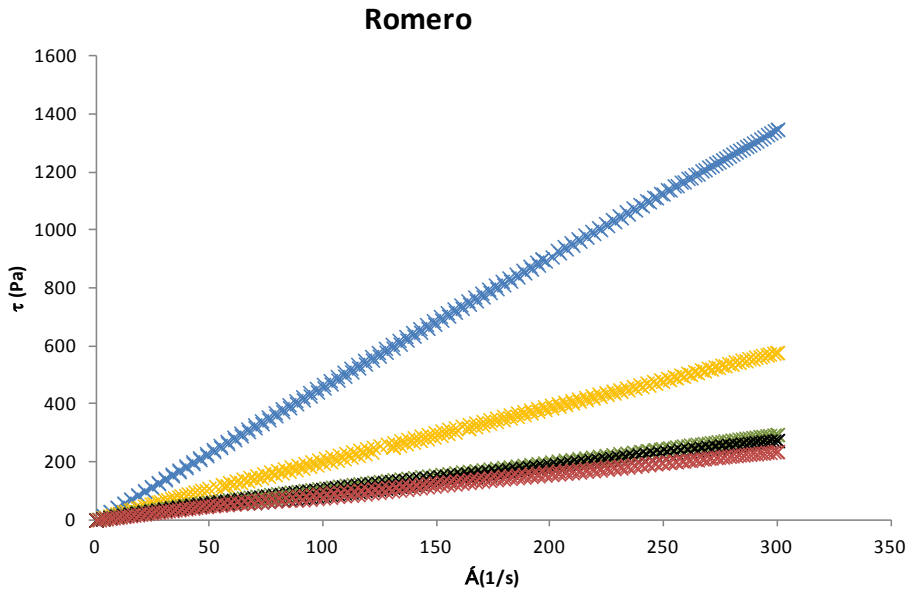


Figura V.25. Representación de los esfuerzos cortantes frente a los gradientes de velocidad en miel de romero a: 25ºC (x); 35ºC (x); 45ºC (x); 50ºC (x); 55ºC (x).

En todos los casos se aprecia un comportamiento newtoniano de las mieles analizadas, ya que los esfuerzos cortantes son directamente proporcionales a los gradientes de velocidad. Los valores de viscosidad mostrados en la tabla V.8, se han obtenido calculando la pendiente de los ajustes lineales.

Tabla V.8. Valores de viscosidad (Pa*s) de las mieles a las temperaturas estudiadas.

	25ºC	35ºC	45ºC	50ºC	55ºC
MIELADA	22.76 ± 0.26	7.69 ± 0.23	3.38 ± 0.19	3.84 ± 0.48	3.19 ± 0.28
EUCALIPTO	10.44 ± 0.18	3.80 ± 0.22	1.79 ± 0.14	1.91 ± 0.11	1.95 ± 0.08
MILFLORES	3.94 ± 0.21	1.79 ± 0.13	1.03 ± 0.18	1.28 ± 0.14	1.18 ± 0.11
AZAHAR	4.73 ± 0.11	1.91 ± 0.12	1.17 ± 0.16	1.12 ± 0.11	0.58 ± 0.05
ROMERO	4.53 ± 0.08	1.95 ± 0.07	0.99 ± 0.13	0.92 ± 0.10	0.80 ± 0.08

La miel más viscosa fue la de mielada seguida por la de eucalipto, presentando el resto de mieles valores similares. Estas diferencias son debidas fundamentalmente a distintos valores de humedad de las mieles; siendo las más

viscosas las que tienen menos valores de humedad (Oroian et al., 2013). Se observa en todas las mieles una disminución de la viscosidad con el incremento de la temperatura. En la Figura V.26 se observa gráficamente que las diferencias entre mieles son máximas a la temperatura de 25ºC. Estas diferencias se van reduciendo con el aumento de la temperatura, estabilizándose a partir de los 45ºC. Esto pone de manifiesto que la temperatura de 45ºC es la óptima para reducir la viscosidad, y que por lo tanto no es necesario licuar a temperaturas mayores que impliquen mayor gasto energético y pérdidas en la calidad de las mieles.

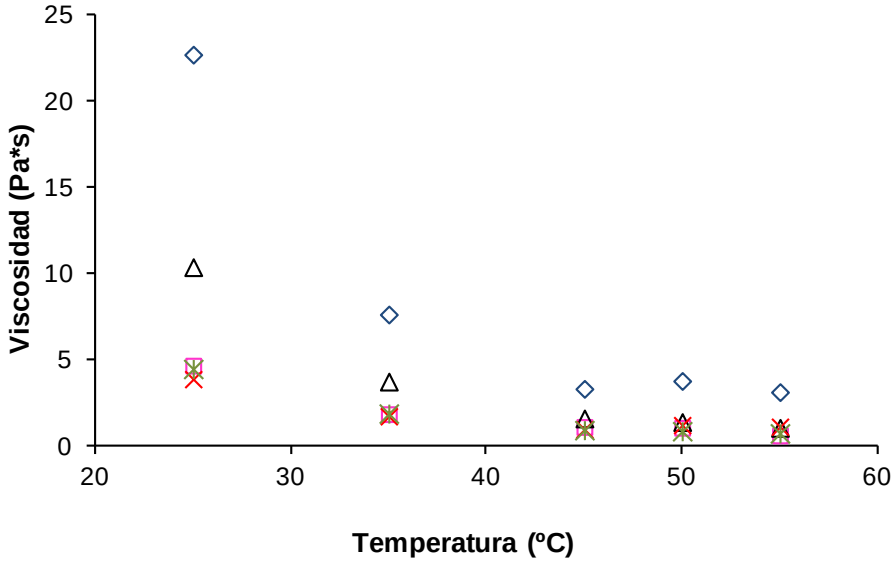


Figura V.26. Valores de viscosidad a diferentes temperaturas de las mieles de mielada (◊); eucalipto (Δ); milflores (x); azahar (□); romero (✳).

3.3. Etapa de Pasteurización

3.3.1. Caracterización fisicoquímica y color de las mieles antes de iniciar el estudio de pasteurización

La tabla V.9.muestra los valores de los parámetros fisicoquímicos de las mieles antes de comenzar el estudio de pasterización.

Tabla V.9. Valores iniciales de las mieles antes de comenzar el estudio de pasteurización.

	Conduct. (µS/cm)	Acidez total (meq/kg)	pH	Humedad (g/100g)	HMF (mg/kg)	Actividad Diastásica (ID)
MIELADA	1085 ± 21	43.5 ± 2.6	4.3 ± 0.1	15.2 ± 0.3	4.84 ± 0.53	38.23 ± 1.91
EUCALIPTO	565 ± 11	33.1 ± 2.9	4.0 ± 0.1	16.9 ± 0.3	6.92 ± 0.76	29.06 ± 1.45
MILFLORES	664 ± 13	26.2 ± 1.6	3.8 ± 0.2	18.2 ± 0.4	2.10 ± 0.23	43.60 ± 2.18
AZAHAR	254 ± 6	21.0 ± 1.5	4.0 ± 0.1	15.9 ± 0.4	4.79 ± 0.53	18.76 ± 0.94
ROMERO	113 ± 3	22.1 ± 1.6	3.8 ± 0.1	17.9 ± 0.3	3.44 ± 0.38	20.63 ± 1.03

Como se ha comentado anteriormente, los experimentos de pasterización se llevaron con lotes diferentes a los empleados en el almacenamiento y la licuación, pero de características similares. Este hecho queda demostrados en los valores iniciales de los parámetros analizados. Nuevamente, la miel de mielada fue la que presentó los valores más altos de conductividad y acidez, las mieles de azahar y romero los valores más bajos, siendo las mieles de eucalipto y milflores las que presentaron valores intermedios de ambos parámetros. Todas las mieles presentaron valores similares de pH, algo mayores como era de esperar para la de mielada. En lo que respecta a los valores de humedad, en este caso, las mieles de mielada y azahar fueron las de menor contenido en agua, y la miel de milflores la de mayor. En todos los casos los valores de humedad estaban dentro de los límites legales para su comercialización.

Los valores de HMF fueron bastante bajos, oscilando entre 2.10 mg/kg de la miel de milflores y 6.92 mg/kg de la de eucalipto. Siendo todos ellos valores característicos de mieles recién recolectadas.

En cuanto a los valores de actividad diastásica, la miel de mielada presentó el valor mayor (38.23 ID), entre las pertenecientes a un origen botánico determinado, seguida de la miel de eucalipto (29.06 ID), la miel de romero (20.63 ID) y la de azahar (18.76 ID). La miel de milflores presentó el mayor valor inicial (43.60 ID), hecho que se atribuye a su origen indeterminado.

Los valores iniciales de color de las muestras empleadas en el estudio de pasteurización se pueden observar en la tabla V.10. Entre todos los valores destaca la menor luminosidad y menor pureza de color de la miel de mielada, siendo la miel de romero la que presenta una mayor luminosidad y la miel de

azahar la de mayor pureza de color. En cuanto a la tonalidad, todas las muestras se situaron entre el amarillo y el rojo, siendo la miel de romero (h*=87.94) la que presentó una tonalidad más amarillenta y la miel de eucalipto (h*=46.68) la que mostró una tonalidad más rojiza.

Tabla V.10. Valores de luminosidad, tono y croma iniciales de las 5 mieles estudiadas, antes de ser sometidas a los tratamientos de pasteurización.

	Luminosidad (L*)	**Chroma (C*)**	**Tono (h*)**
MIELADA	24.14 ± 0.26	1.24 ± 0.15	77.66 ± 0.31
EUCALIPTO	29.18 ± 0.10	12.51 ± 0.15	48.68 ± 0.24
MILFLORES	29.56 ± 0.26	12.16 ± 0.33	53.02 ± 0.36
AZAHAR	37.64 ± 0.31	20.67 ± 0.27	76.80 ± 0.45
ROMERO	42.44 ± 0.34	14.73 ± 0.24	87.94 ± 0.52

3.3.2. Evolución del HMF con las condiciones de pasteurización

Al aplicar el tratamiento de pasteurización las temperaturas fueron relativamente altas, pero los tiempos de residencia eran mucho menores que los empleados en las etapas anteriores. En este caso, los incrementos en los valores de HMF obtenidos en las diferentes mieles no fueron tan elevados como en un principio podíamos esperar, tal y como se aprecia en la figura V.27.

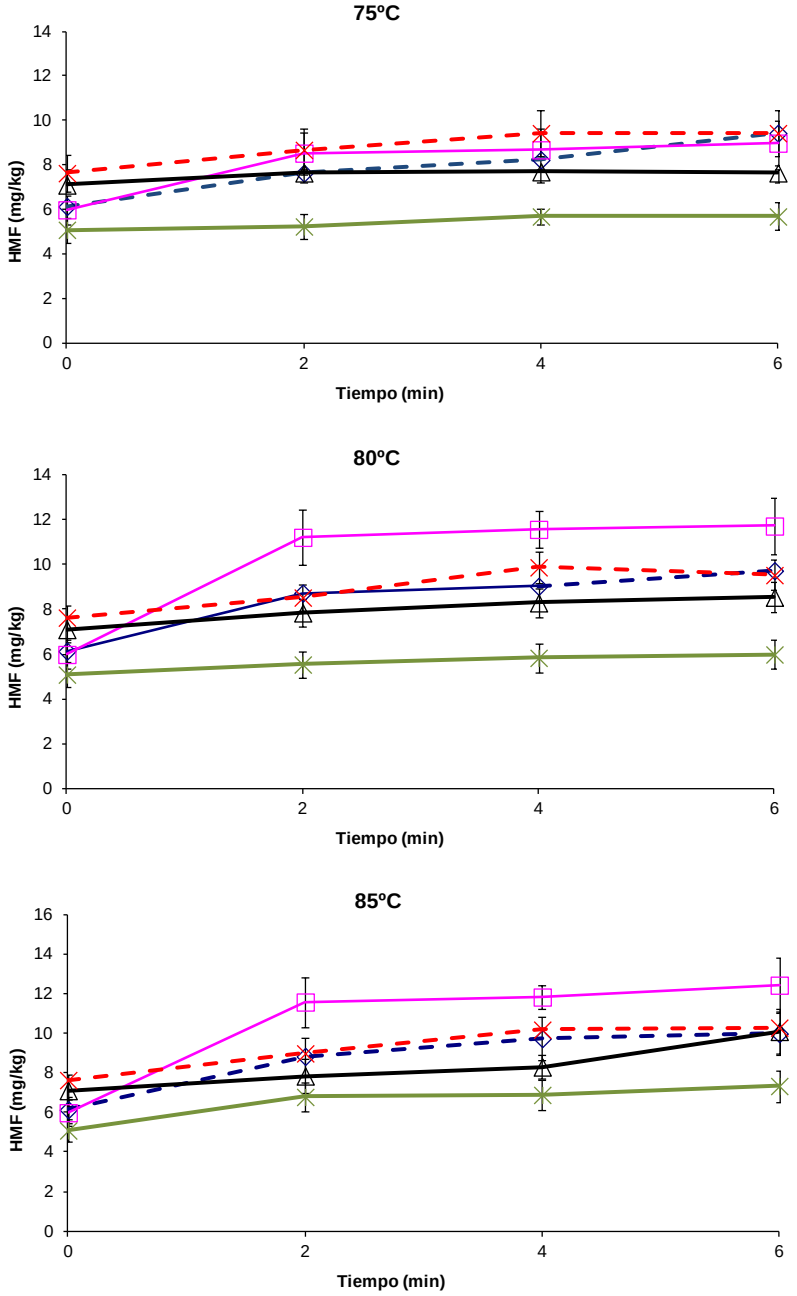


Figura V.27. Evolución del contenido de HMF a las diferentes temperaturas de pasteurización estudiadas en miel de mielada (-◊-); eucalipto (Δ); milflores (-x-); azahar (□); romero (x).

Se observa como en el peor de los casos, el incremento de HMF no superó los 7 mg/kg (miel de azahar a 85ºC durante 6 minutos), siendo en la mayoría de los casos inferiores a 3 mg/kg. Esto pone de manifiesto que haciendo una pasteurización controlada, el incremento de HMF no tiene porqué ser elevado. La miel de azahar sufrió un incremento de HMF superior al de las demás mieles al ser sometidas a las mismas altas temperaturas, sin embargo el incremento de 2 a 6 minutos de residencia no afectó al incremento de HMF.

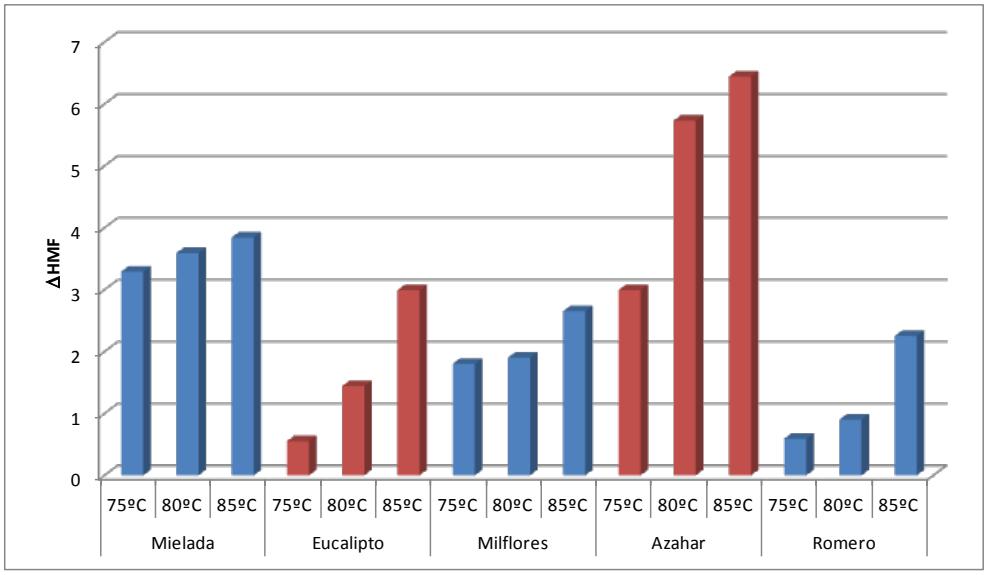


Figura V.28. Incremento del valor de HMF a los 6 minutos en cada una de las mieles a las diferentes temperaturas de estudio.

En las figura V.28 se observan los incrementos de HMF obtenidos para las cinco mieles al ser sometidas durante 6 minutos a las diferentes temperaturas de pasteurización. Los mayores incrementos los encontramos en la miel de azahar (2.99 a 6.44), seguidos de la miel de mielada (3.29 a 3.84), situándose las demás mieles con incrementos menores y similares (siempre menores a 3).

3.3.3. Evolución de la actividad diastásica con el tratamiento de pasteurización

En lo que respecta a la actividad diastásica, en la figura V.29 se observa que en todos los casos disminuyó con el incremento de la temperatura.

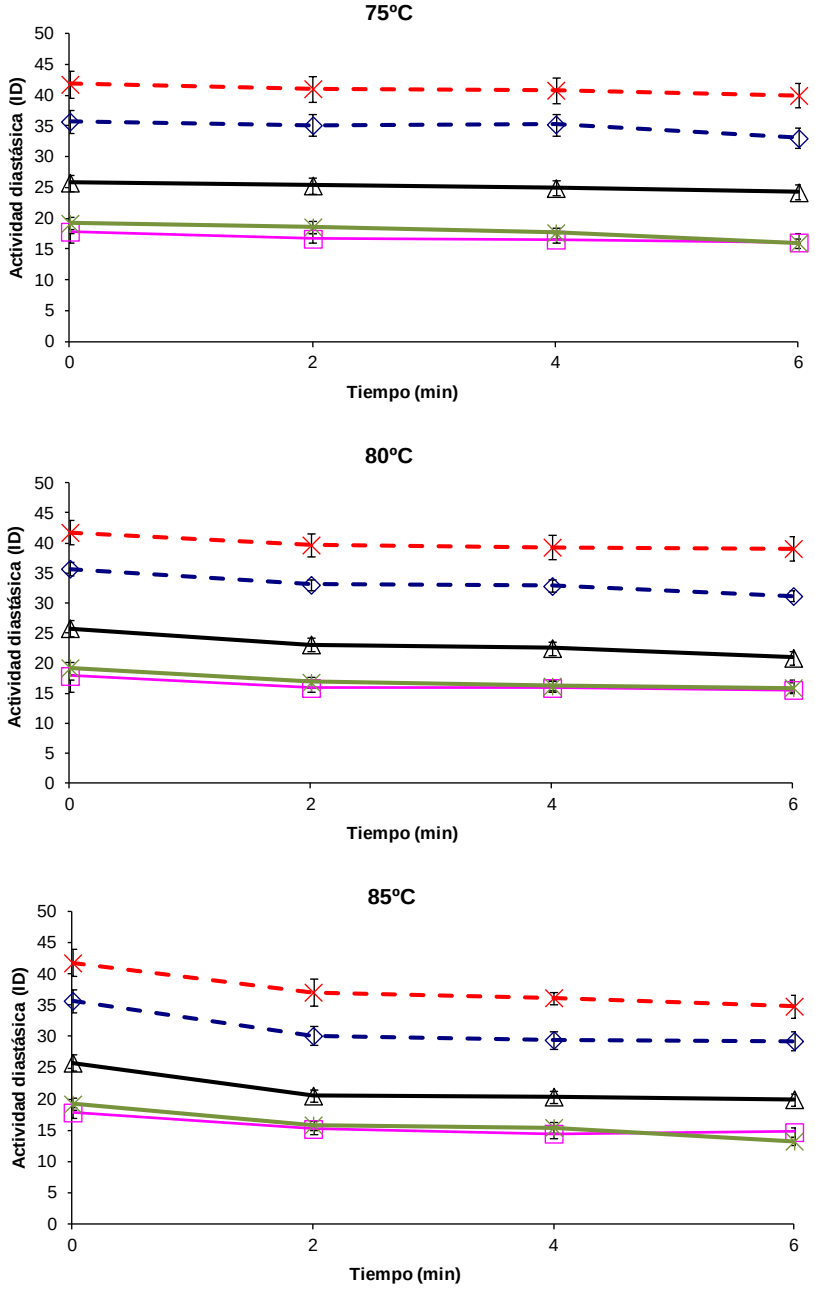


Figura V.29. Evolución de la actividad diastásica a las diferentes temperaturas de licuación estudiadas en miel de mielada (-◊-); eucalipto (Δ); milflores (-x-); azahar (□); romero (✳).

La influencia de la temperatura se aprecia de forma gráfica en la figura V.30. Cuanto más agresivo era el tratamiento, mayor disminución de la actividad diastásica tenía lugar. En el peor de los casos (85ºC y 6 minutos), la disminución de los valores de actividad diastásica variaron entre 6.93 (ID) en la miel de milflores y 3.14 (ID) en la miel de azahar. El mayor decrecimiento de la actividad diastásica tuvo lugar en la miel de mielada y la miel de milflores, que eran las que presentaban un mayor valor inicial, aunque a diferencia de lo que ocurrió en el estudio de almacenamiento previo, las diferencias iniciales entre mieles no eran tan acusadas. Es evidente que las temperaturas de pasteurización eran mucho mayores a las de almacenamiento o licuación, pero también los tiempos eran mucho menores.

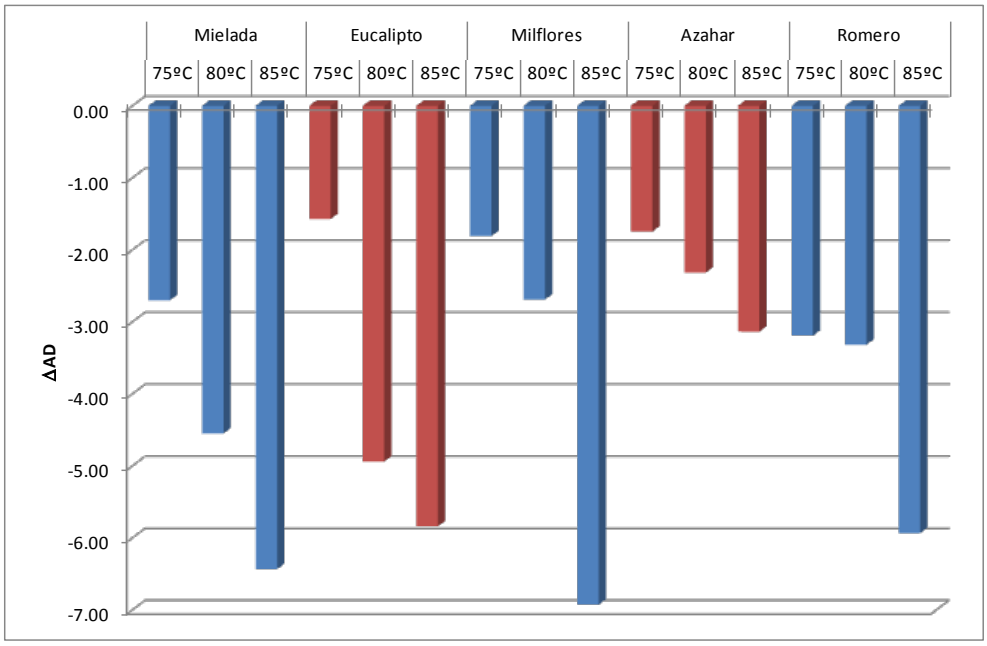


Figura V.30. Variación del índice de actividad diastásica a los 6 minutos en cada una de las mieles a las diferentes temperaturas de estudio.

3.3.4. Evolución del color con el tratamiento de pasteurización

Para mostrar de forma más sintetizada los cambios de color, en las figuras V.31 y V.32 se muestran las variaciones de los parámetros CIE L*a*b* de sólo 2 de las 5 mieles (romero y mielada). Las gráficas de variación de parámetros de color durante la pasteurización para el resto de mieles se muestran en los anexos (ANEXO III).

Se puede observar como las variaciones de color sufridas por las mieles son mínimas y en ningún caso son apreciables por el ojo humano.

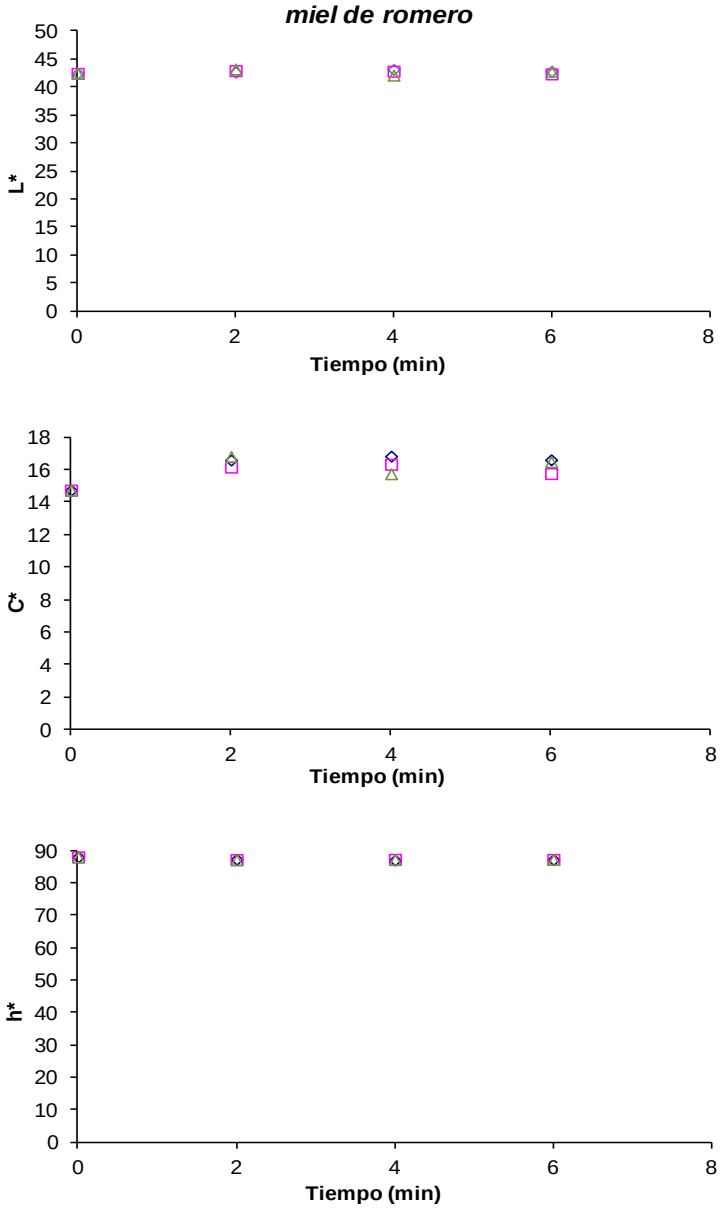


Figura V.31. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de romero con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 75ºC (◊); 80ºC (□); 85ºC (Δ).

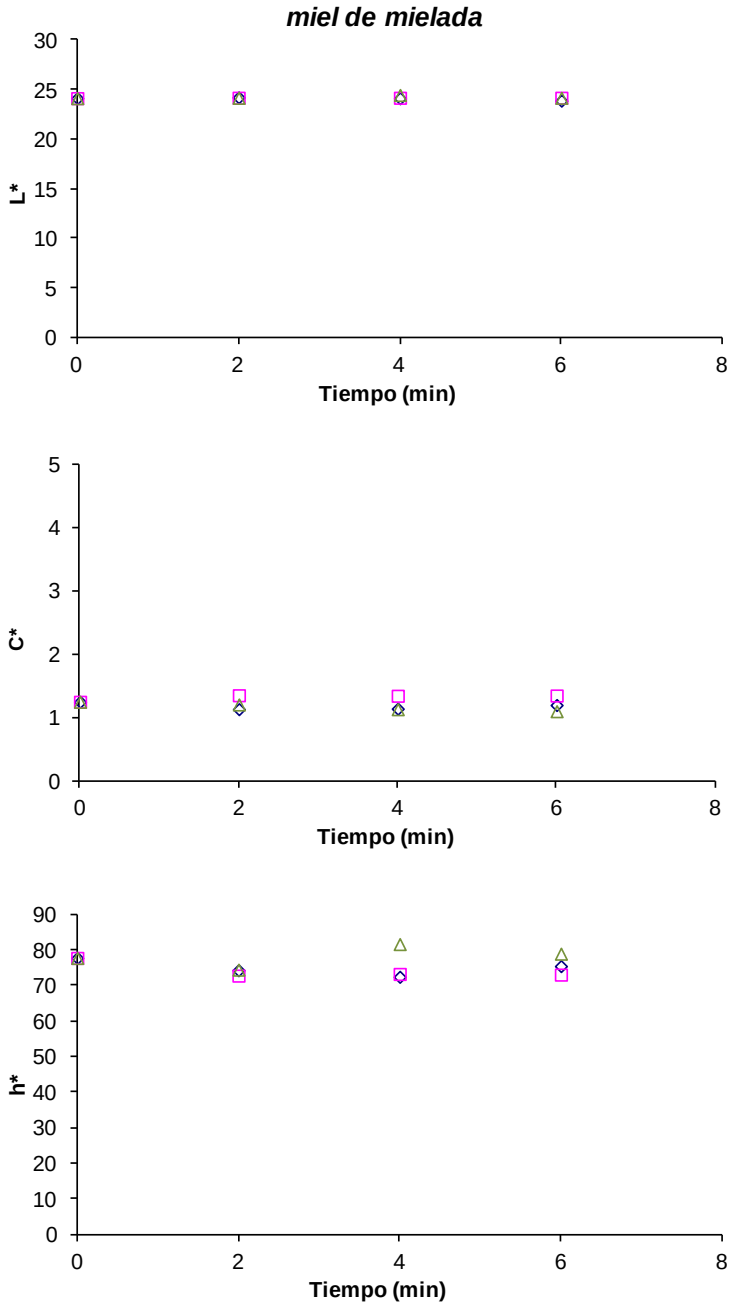


Figura V.32. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de mielada con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 75ºC (◊); 80ºC (□); 85ºC (Δ).

Con los datos iniciales de color obtenidos, se han calculado los valores de K/S de las diferentes mieles en el momento inicial, los cuales se muestran en la figura V.33. Se aprecia como la miel de mielada presentó una mayor translucidez, ya que en todo el rango de longitudes de onda presentó valores superiores a las demás mieles. Por el contrario, la miel de romero es la que presentó una menor translucidez en todo el rango de longitudes de onda, seguida de la miel de azahar, obteniéndose valores casi idénticos para la miel de eucalipto y la de milflores a lo largo de todo el rango de longitudes de onda.

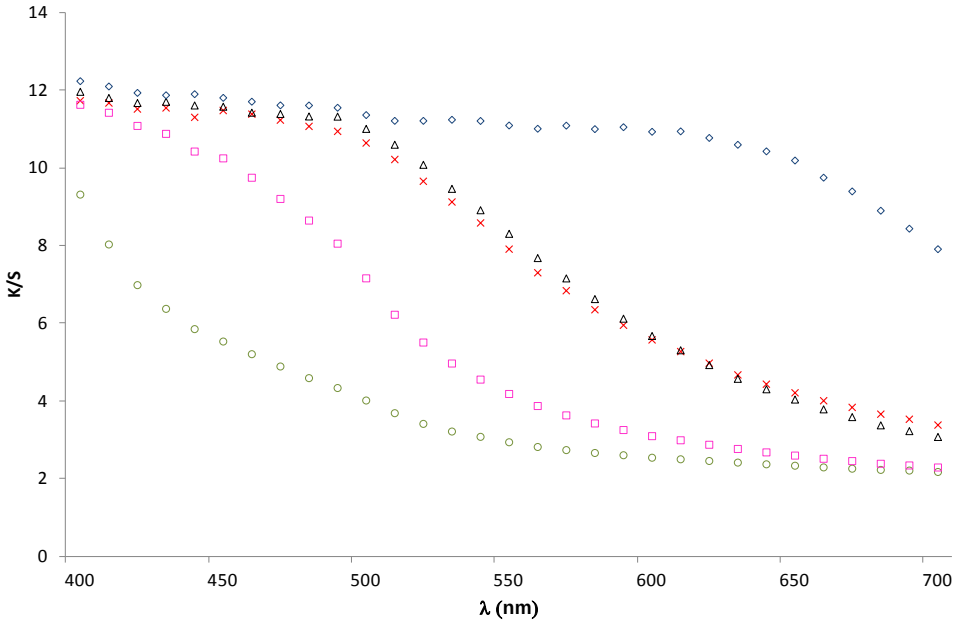


Figura V.33. Valores iniciales de K/S (antes de pasteurizar) en miel de mielada (◊);eucalipto (Δ); milflores (x); azahar (□); romero (O).

En la figura V.34 se representa los valores de K/S después de someter a las mieles al tratamiento de pasteurización más extremo (6 min a 85ºC). Si se observa detenidamente esta figura, y se compara con la figura V.33, se aprecia que las variaciones por causa de los tratamientos térmicos de pasteurización son mínimos, poniendo de manifiesto que el tratamiento de pasteurización no produce cambios apreciables en la translucidez de las mieles.

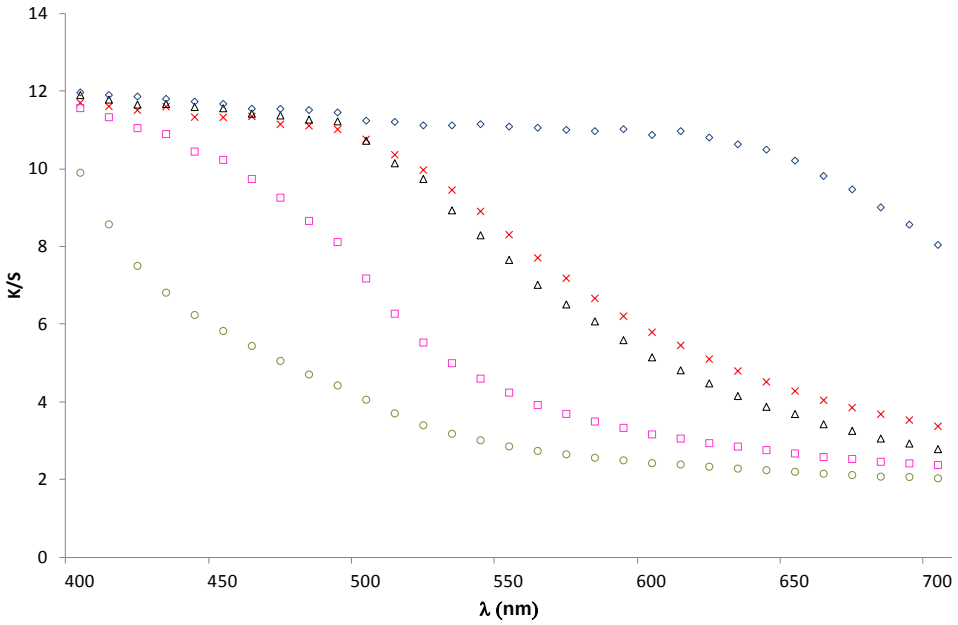


Figura V.34. Valores de K/S en miel de mielada (◊);eucalipto (Δ); milflores (x); azahar (□); romero (O), al ser sometidas a 85ºC durante 6 minutos.

Con todo esto podemos concluir que los tratamientos de pasteurización no afectan de forma apreciable al color de las mieles.

3.3.5. Estudio microbiológico, variación de la carga microbiana con la pasteurización.

Teniendo en cuenta la Norma de Calidad de la miel de 1983 (España, BOE núm 244, 1983), se realizaron para las distintas mieles los análisis de los siguientes microorganismos: Enterobacterias totales, Escherichia coli y Salmonella-Shigella. En todos los casos los resultados obtenidos indicaron la ausencia de este tipo de microorganismos, lo cual confirma que estas mieles eran adecuadas para el consumo desde el punto de vista microbiológico.

Después de la comprobación de la ausencia de los microorganismos citados anteriormente, se realizó el recuento de colonias de mohos y levaduras y el de bacterias aerobias mesófilas en las cinco mieles, antes y después de realizar los diferentes tratamientos de pasteurización. En el caso de mohos y levaduras, en las muestras iniciales sin pasteurizar se observó un número de colonias inferior a 30 en la dilución 10-1, por lo que no se realizo el recuento después del tratamiento

de pasteurización por el bajo número de colonias por placa. En cuanto a los resultados obtenidos para las colonias aerobias mesófilas, en la tabla V.11 se puede apreciar la reducción del número de colonias contabilizadas al realizar los diferentes tratamientos.

Tabla V.11. Número de colonias aerobias mesófilas (col/g) contabilizadas para cada uno de los tratamientos térmicos de pasteurización estudiados. El primer número indica la temperatura y el segundo el tiempo de residencia.

	Inicial	**75-2**	**75-4**	**75-6**	**80-2**	**80-4**	**80-6**	**85-2**	**85-4**	**85-6**
MIELADA	1040	610	0	0	575	0	0	565	0	0
EUCALIPTO	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MILFLORES	395	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AZAHAR	635	420	0	0	0	0	0	0	0	0
ROMERO	980	495	0	0	450	0	0	420	0	0

A partir de los resultados se aprecia que las mieles que presentaban una mayor carga microbiana inicial eran las de romero y de mielada, cuyo contenido microbiano era muy superior al del resto de mieles. Esto fue debido probablemente a una peor manipulación del producto en el origen por parte del apicultor. También se aprecia de una forma clara la influencia de los tratamientos térmicos sobre la carga microbiana, ya que el número de colonias disminuyó notablemente al realizar los diferentes tratamientos de pasteurización. En todas las mieles un tratamiento de 4 minutos, a cualquiera de las temperaturas estudiadas, fue suficiente para reducir la cantidad de unidades formadoras de colonias a 0. A su vez, se puede apreciar la influencia de la temperatura, ya que a mayor temperatura, mayor fue la reducción de la carga microbiana, aunque las diferencias no fueron demasiado grandes. Por tanto se aconseja el uso de la temperatura más baja con efecto en la carga microbiana, con el fin de alterar lo menos posibles las mieles.

4. Conclusiones

En las tres etapas estudiadas (almacenamiento, licuación y pasteurización), la evolución del HMF y de la actividad diastásica han reflejado la pérdida de calidad de las mieles, aumentando y disminuyendo respectivamente. La etapa de almacenamiento fue la que mayores variaciones de estos parámetros presentó.

El HMF se puede considerar como el mejor indicador de la pérdida de frescura de cualquier miel, ya que su valor en todas las mieles recién recolectadas es cero, al contrario de lo que sucede para la actividad diastásica ya que ésta difiere considerablemente en función del origen botánico del que proceden los néctares o las secreciones de las plantas que visitan las abejas. Por ello, el desconocimiento del valor de la actividad diastásica de una miel en el momento de su recolección, hace imposible evaluar la frescura de una miel en cualquier momento posterior.

El color de las mieles, se ve influido por las condiciones de tiempo/temperatura, especialmente en mieles claras (azahar y romero) y en menor medida en las mieles oscuras, como la de mielada. Se ha observado que en mieles claras sometidas a ciertas condiciones de almacenamiento, que se pueden considerar extremas, los cambios de color llegan a ser apreciables por el ojo humano. Por el contrario los tratamientos de licuación y pasteurización realizados en el presente estudio no han provocado cambios de color apreciables en las mieles.

En la etapa de almacenamiento, los tiempos de residencia prolongados (a temperaturas entre 25 y 40ºC) pueden afectar considerablemente a los parámetros de calidad de la miel (HMF, actividad diastásica y color), incluso en mayor medida que en las condiciones de licuación y pasteurización.

Con respecto a la licuación y la pasterización, las condiciones de trabajo recomendables serían: 45ºC durante un periodo no superior a las 72 horas (en función del tipo de miel) y 75ºC durante 4 minutos, respectivamente. De esta manera, se consiguen los objetivos propios de cada etapa (sin alterar en gran medida la calidad en las mieles): con la licuación, hacer la miel más manejable disminuyendo la viscosidad (a valores similares a los conseguidos a 50 y 55ºC), y con la pasteurización, reducir la carga microbiana y los núcleos de cristalización.

VI. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE DIFERENTES TIPOS DE MIEL. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS DE LICUACIÓN Y PASTEURIZACIÓN

VI. Análisis de la fracción volátil de diferentes tipos de miel. Influencia de los tratamientos de licuación y pasteurización.

1. Introducción

Todas las mieles tienen un flavor/aroma base característico a este alimento. Además, las mieles monoflorales y las de mielada presentan ciertas peculiaridades aromáticas como consecuencia del origen botánico del néctar o de las secreciones de las plantas que liban las abejas. De hecho, algunas mieles poseen ciertos componentes específicos, que son considerados como verdaderas huellas dactilares de las mismas (Radovic et al., 2001; Verzera et al., 2001; Serra-Bonvehí y Ventura-Coll, 2003; Kadar et al., 2011; Juan-Borrás et al., 2015).

Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en los últimos años en relación al estudio de la composición en compuestos volátiles de mieles de diferentes procedencias botánicas y geográficas. Sin embargo, son muy escasos los trabajos en los que se ha analizado el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos en la fracción volátil de la miel, y de ellos en ninguno se estudió el efecto de las condiciones térmicas reales del proceso industrial. Muchos autores coinciden en que durante los tratamientos térmicos, pueden haber tanto pérdidas de algunos compuestos volátiles, como generación de otros, tales como son los derivados del furano (furfural, metilfurfural, furfuryl alcohol, etc.) (Castro-Vazquez et al., 2006). Por ello, es de gran importancia conocer el efecto del procesado industrial en el flavor/aroma de las mieles, especialmente de las monoflorales por su mayor valor comercial. En este sentido, el objetivo de este capítulo ha sido analizar y evaluar en la fracción volátil de la miel la influencia de los tratamientos térmicos industriales (simulando las condiciones de licuación y pasteurización). Las mieles crudas fueron caracterizadas inicialmente desde el punto de vista palinológico, físico químico y de su fracción volátil.

2. Materiales y métodos

2.1. Materia Prima

En este estudio se utilizaron 10 lotes de cada uno de los siguientes tipos de miel: azahar, romero, mielada y milflores.

Se simularon a nivel de laboratorio los tratamientos de licuación y pasteurización que generalmente se hacen en la industria de envasado de miel, tal y como se ha descrito en el Capítulo V.

Cada lote se dividía en 3 partes: una se dejaba sin calentar (cruda), otra se licuaba (a 45ºC durante 48 horas), y la última se licuaba y posteriormente se pasteurizaba (a 80º durante 4 minutos).

2.2. Determinaciones analíticas

Los análisis de HMF, actividad diastásica, pH, acidez total, conductividad eléctrica, humedad, color, así como de la fracción volátil se llevaron a cabo tal y como se ha descrito en el Capítulo III.

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA) para estudiar la influencia de los tratamientos en la fracción volátil de las mieles con el programa Statgraphics plus 5.1 (Manugistics INC., USA). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con ayuda del programa Unscrambler versión 10.0 (CAMO A/S, Noruega).

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización palinológica y físico-química de las mieles.

La primera etapa de este estudio fue la caracterización polínica de los 40 lotes de mieles frescas que se utilizaron. La tabla VI.1 muestra, para cada tipo de miel, el rango de los porcentajes de polen correspondiente a la especie mayoritaria, así como la presencia de otros pólenes acompañantes

Tabla VI.1. Caracterización melisopalinológica de las mieles utilizadas

	MIELADA	**MILFLORES**	**AZAHAR**	**ROMERO**
Polen Mayoritario (Porcentaje)	*HDE* (1-2.3%)	*Citrus sp.* (5-7.4%)	*Citrus sp.* (21-37.9%)	*Rosmarinus officinalis* (26-37%)
Otros pólenes presentes	*Erica sp.* *Helianthus annus* *Rubus sp.*	*Rosaceae* *Brassicaceae* *Quercus sp.*	*Oxalis sp.* *Quercus sp.* *Helianthus annus* *Carduus sp.*	*Prunus dulcis* *Cistaceae* *Leguminosae*

Las mieles de azahar presentaron un porcentaje de polen de *citrus sp.* que osciló entre el 21 y el 37.9%. El reglamento de la Marca de Calidad CV para la miel de azahar y romero de la Comunidad Valenciana (Comunidad Valenciana, DOGV núm. 3273, 1998) establece que una miel para ser considerada miel de azahar debe contener un 10% de polen *Citrus sp.* En este sentido, los 10 lotes clasificados en este trabajo como "azahar" cumplieron con este criterio.

Las mieles de milflores llegaron a presentar valores de hasta 7.4% de polen *citrus sp.*, lo que refleja que las colmenas procedían de una zona en la que este cultivo tenía una presencia importante, como es el caso del Mediterráneo español, aunque no llegaron a un nivel suficiente para considerarlas como mieles de azahar, según la CV. Con relación a las mieles de romero, los valores de polen (*Rosemarinus officianlis)* variaron entre 26 y 37%, sobrepasando el valor mínimo exigido por la norma de calidad CV, situado en un 15%. Finalmente, en lo que respecta a la miel de mielada se observa que los elementos de mielada (HDE: esporas de hongos, hifas y algas) eran muy bajos, lo que indica que estas mieles podrían proceder de una zona seca como puede ser el mediterráneo español, donde los mielatos son muy escasos o inexistentes (Gómez-Pajuelo, 2004).

En la Tabla VI.2 muestra la caracterización físico-química (valores máximos y mínimos) de las mieles frescas estudiadas.

Tabla VI.2. Caracterización fisicoquímica de las mieles antes de ser sometidas a los tratamientos térmicos.

	Conduct. (µS/cm)	**Acidez total (meq/kg)**	**pH**	**Humedad (g/100g)**	**HMF (mg/kg)**	**Actividad Diastásica (ID)**
MIELADA	913-1085	45.6-53.5	4.02-4.25	15.2-16.3	4.36-5.35	34.41-42.05
MILFLORES	464-684	26.3-30.2	3.67-3.89	17.2-18.7	1.89-2.31	39.24-47.96
AZAHAR	254-356	18.2-21.4	3.88-4.00	15.9-16.2	4.31-5.27	16.89-20.64
ROMERO	113-296	17.2-20.5	3.74-3.99	16.5-18.1	3.10-3.79	18.57-22.70

La conductividad eléctrica, la acidez total y el pH pueden ser parámetros útiles en la diferenciación de mieles florales y mieles de mielada. Como era de esperar, las mieles de mielada presentaron los valores mayores de conductividad, pH, acidez total y actividad diastásica. Por el contrario, las mieles de azahar y romero mostraron los menores valores de acidez total y actividad diastásica. La miel de milflores tenía valores intermedios en todos los parámetros estudiados.

Los valores de humedad en todos los casos estaban dentro de los valores permitidos para la comercialización de miel, no superándose en ningún caso el 20% de humedad.

Con relación al HMF, se observa que los valores de todas las muestras oscilaron entre 1.89 y 5.35 mg/kg. Estos valores confirman que las mieles utilizadas eran mieles frescas y que no habían sido sometidas a tratamientos térmicos. Este hecho es corroborado por el elevado índice de actividad diastásica que presentaron las mieles, especialmente las de mielada (34.41-42.05 ID) y milflores (39.24-47.96 ID). Por su parte las mieles de azahar y romero, aunque presentaban valores menores a los de las mieles de mielada y milflores, estos eran bastante altos para lo que es habitual en estos tipos de miel.

Para caracterizar las mieles crudas desde el punto de vista del color, en la figura VI.1 (A y B) se ha representado la ubicación de las diferentes mieles en los planos cromáticos a*-b* y a*-L*del espacio de color CIE L*a*b*. En el plano a*-b*, las mieles situadas más cerca del origen, tienen una menor pureza de color, mientras que al alejarse de dicho origen la pureza de color es mayor. Se puede observar que la miel de mielada es la que tenía una menor pureza de color, seguida de la de milflores, siendo las mieles de azahar y romero las que respectivamente presentaron la mayor pureza de color. Además, en dicha figura se aprecia que las mieles de azahar y romero mostraron una mayor componente amarilla (mayor ángulo respecto al eje horizontal), siendo la miel de milflores la que presentó una mayor componente roja (menor ángulo respecto al eje horizontal). En la Figura VI.1-B se observa que las mieles de romero y azahar tenían mayor luminosidad (mayor valor de L*) que las de las otras dos mieles. Al igual que ocurría con la pureza de color, la miel de mielada es la que presentó un menor valor de L*, siendo por tanto la más oscura de todas.

Estos valores de color se corresponden con lo obtenido en el capítulo V, donde las mieles de mielada presentaban valores muy bajos de pureza de color (muy cercano al origen del plano cromático a*-b*) y valores de luminosidad menores al resto de mieles.

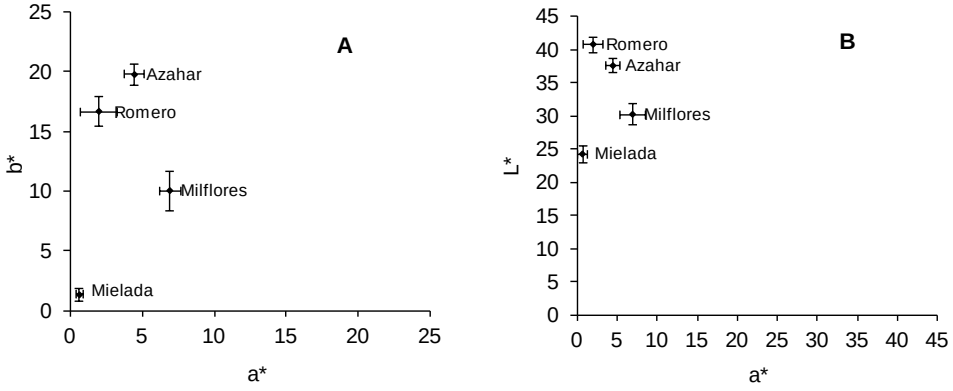


Figura VI.1. Ubicación de las mieles en los planos cromáticos de color a*-b* (A) y a*-L* (B).

3.2. Composición de la fracción volátil de las cuatro tipos de miel

La identificación de los compuestos de la fracción volátil se llevó a cabo en los cuatro tipos de miel cruda, e inmediatamente después de ser sometidas a los tratamientos térmicos de licuación y pasterización. La Tabla VI.3 muestra los 74 compuestos identificados: 38 en miel de azahar, 32 en miel de romero, 29 en miel milflores y 47 en la miel de mielada. Aunque en proporciones diferentes, 9 de estos compuestos estaban presentes en los cuatro tipos de miel (acetic acid; 2-methyl-2-propanol; 3-methyl-3-buten-1-ol; ethanol; phenyl ethyl alcohol; octane; dimethyl sulphide, D-limonene y linalool oxide), La mayoría de estos compuestos han sido identificados como componentes volátiles de la miel (Campos et al., 2000; Soria et al., 2004; Wolski et al, 2006; Juan-Borrás et al., 2014).

3.2.1. Compuestos volátiles en miel de mielada.

De los 47 compuestos identificados en la miel de mielada, 20 de ellos se encontraron únicamente en este tipo de miel: 2-methyl-propanoic acid; propanoic acid; 1,3-butanediol; 1-hexanol; 2,3-butanediol; 3-hexen-1-ol; 3-methyl-2-butanol; 3-pentanol; 1-cyclohexene-1-carboxaldehyde-5,5-dimethyl-3-oxo; 1-hydroxy-2-butanone; 2-hydroxy-3-pentanone; 2-methyl-4-hexyne-3-one; 3,5,5-trimethyl-2-ciclohexen-1-one; 1,1-bicyclopropyl-2-octanoic acid-2-hexyl-methyl ester; ethyl acetate; 2-furanmethanol; 2-furanmethanol-5-ethenyltetrahydro-α,α,5-trimethyl-trans; dihydro-2(3h)-furanone; dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone y 2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane.

En la miel de mielada, destaca la gran abundancia de compuestos derivados del furano, ya que de los 7 compuestos furanos identificados en este estudio, 5 de ellos aparecieron en esta miel, de los cuales 4 lo hicieron de forma exclusiva.

Los compuestos mayoritarios en la miel de mielada fueron: acetic acid; 2-methy-1-butanol; 3-hydroxy-2-butanone (acetoin); 3 methyl-3-buten-1-ol y ethanol, aunque ninguno de ellos resultó exclusivo de este tipo de miel. El 2-methy-1-butanol también se identificó en la miel de milflores aunque en mucha menor cantidad. El 3-hydroxy-2-butanone aunque fue considerablemente más abundante en la de mielada, apareció también en las mieles de azahar y milflores. La abundancia del acetic acid y del 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) en la miel de mielada, se ha observado también en otros estudios previos (Campos et al., 2000; Soria et al., 2005).

Algunos autores han afirmado que tanto el benzene como los compuestos fenólicos pueden ser considerados característicos de las mieles de mielada (Castro-Vazquez et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio, compuestos como el benzaldehyde, benzenacetaldehyde y el phenyl ethyl alcohol, no se han encontrado en cantidades altas en la miel de mielada, ni han resultado exclusivos de este tipo de miel. Además otros autores sugieren que los compuestos fenólicos y sus derivados, junto con los terpenos y norisoprenoides son característicos de un origen floral, hasta el punto de poder ser considerados como marcadores florales (Fisher y Scott, 1997; Serra-Bonvehí y Ventura-Coll, 2003). En este trabajo, tres de los seis compuestos terpénicos identificados, concretamente el D-limonene, hotrienol and linalooloxide se encontraron en la miel de mielada destacando especialmente la abundancia en esta miel del linalool oxide.

Soria et al. (2004) establecieron que junto a los parámetros físico-químicos: color, conductividad eléctrica, acidez, cenizas y pH, determinados compuestos volátiles como el 3-hydroxy-2-butanone, 2,3 butanediol, 1-hydroxy-2-propanone y 1-(2-furanyl)-ethanone permitían discriminar las mieles de mielada de las mieles florales. Para estos autores los tres primeros compuestos químicos se correlacionaban positivamente con las mieles de mielada, mientras que el último lo estaba con las mieles de origen floral. En nuestro caso estos 4 compuestos aparecen de forma más abundante en la miel de mielada que en las mieles procedentes de néctar, siendo el 2,3 butanediol el único que apareció solamente en esta miel.

3.2.2. Compuestos volátiles en miel de azahar

Entre los 38 compuestos identificados en la miel de azahar, siete de ellos fueron exclusivos de esta miel: lilac aldehyde A; α-4-dimethyl-3-cyclohexe-1-acetaldehyde; 6-methyl-5-hepten-2-one; antranilic acid methyl ester; isopropyl mirystate; 4,5,7a-hexahydrobenzofuran-3,6-dimethyl-2,3,3a y 8-hydroxylinalool. La miel de azahar, tal y como cabría esperar, es la única en la que se encontró antranilic acid methyl ester, ya que este compuesto es específico de este tipo de miel y por ello es considerado un marcador de la misma. Sin embargo, hay mucha variabilidad entre autores en lo que respecta a la cantidad encontrada de antranilic acid methyl ester en las mieles de azahar, e incluso en algunos casos no ha sido identificado (Overton y Manura, 1994; Pérez et al., 2002). En mieles de Florida White y Bryant (1996), reportaron valores medios de 3.5 mg/kg; sin embargo, Sesta et al. (2008) y Juan-Borrás et al. (2015), sugirieron que para mieles italianas y españolas, respectivamente, valores de 0.5 mg/kg deben ser suficientes para clasificar una miel como de azahar.

La amplia variabilidad en los niveles encontrados para este compuesto en mieles de azahar se puede atribuir al país de origen, variedad botánica de los árboles, factores ambientales e incluso a las condiciones de almacenamiento (Ferreres et al., 1994; White y Bryant, 1996; Serra Bonvehí, 1995; Castro-Vazquez et al., 2009). Castro-Vazquez et al. (2006) también concluyeron que los derivados del linalool eran también responsables del aroma floral, fresco y a naranja de la miel de azahar. El linalool es un componente principal del aceite esencial de la flor de azahar y también de la miel de esta variedad, los derivados del linalool como el 2,6-dimethyl-2,7-octadiene-1,6 (8-hydroxylinalool) y los lilac aldehydes A, B, C and D son también muy importantes en esta variedad (Kadar et al., 2011). En efecto, en este trabajo destaca el grupo de los lilac aldehydes, ya que ellos solos representan en abundancia aproximadamente el 20% del total de compuestos identificados en la miel de azahar antes de ser sometida a los tratamientos térmicos. De la misma manera otros autores encontraron en la miel de azahar los lilac aldehydes en cantidades importantes, en comparación al resto de compuestos identificados.

El α-4-dimethyl-3-cyclohexe-1-acetaldehyde, el hotrienol y los linaloxides han sido citados por algunos autores como característicos de la miel de azahar (Alissandrakis, et al., 2005; Castro-Vazquez et al., 2007). Con respecto al primero, en el presente trabajo se ha identificado únicamente en este tipo de miel, pero el hotrienol y el linalool oxide se han encontrado también en las otras mieles.

Nuestros resultados están en concordancia con otros estudios en los que éstos dos compuestos han sido observados en otras mieles como romero, brezo y eucalipto (Castro-Vazquez et al., 2003).

El benzaldehyde, componente característico del olor de los cítricos (Alissandrakis et al., 2007; Fisher y Scott, 1997), y el limonene, compuesto del aceite esencial de los cítricos (Fisher y Scott,1997), en el presente estudio se identificaron en varias mieles, pero fueron más abundantes en la miel de azahar. Este segundo compuesto también ha sido identificado en la miel de milflores. Esto es lógico teniendo en cuenta el hecho de que este último tipo de miel, tal y como anteriormente se ha comentado tiene hasta un 7.4% de polen de citrus, lo que refleja que las abejas habían libado néctar de flor de azahar, de ahí que la miel de milflores pueda tener algunos compuestos que se pueden considerar característicos de la miel de azahar.

3.2.3. Compuestos volátiles en miel de romero

En la miel de romero se identificaron 32 compuestos, aunque solo 5 de ellos fueron encontrados únicamente en esta variedad: 2-ethyl-hexanoic acid; 2-butoxy-ethanol; dodecane; 1-metoxy-2-propyl acetate y methyl salicylate. El 2-ethyl-hexanoic acid, también fue identificado por otros autores en esta misma variedad de miel (Castro-Vazquez et al., 2003). Los compuestos más abundantes en esta miel fueron: 2-methyl-2-propanol, acetic acid, 2-methyl-3-buten-2-ol y octane. Estos tres primeros compuestos han sido citados en otros trabajos llevados a cabo con esta variedad de miel (Perez et al., 2002; Serra-Bonvehí y Ventura-Coll, 2003). Otros autores encontraron en miel de romero cantidades elevadas del 2,3, butanediol (Perez et al., 2002; Castro-Vazquez et al., 2003), aunque este compuesto solo se identificó aplicando el procedimiento de extracción líquido-líquido, mientras que por extracción en fase sólida y SDE no fue identificado en las mismas muestras. De la Fuente et al. (2005) encontraron el 2,3-butanediol en niveles mucho menores a las de otros alcoholes identificados, como el 3-methyl-1-butanol, 3-methyl-3-buten-1-ol, 2-methyl-2-buten-1-ol y 3-methyl-2-buten-1-ol. De estos cuatro últimos compuestos, los dos primeros también han sido identificados en el presente estudio en la miel de romero. Con relación al 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) aunque ha sido considerado por algunos autores (Perez et al., 2002; Castro-Vazquez et al., 2003) como característico de la miel de romero, en este trabajo no se encontró.

3.2.4. Compuestos volátiles en miel de milflores

La miel de milflores es la que menor número de compuestos exclusivos presentó, concretamente: 3-methyl butanal; β-damascenone (compuesto que se caracteriza por su aroma a miel (Belitz y Grosch, 1997) y β-Linalool, citado en muchos trabajos como perteneciente a la fracción volátil de mieles florales (De la Fuente et al., 2005). Es de destacar que tres de los lilac aldehydes identificados, concretamente el B, el C y el D, además de en la miel de azahar también se han encontrado en la de milflores aunque en cantidad mucho menor a la anterior. Este hecho coincide con lo observado anteriormente para el limonene, y por lo tanto se explica nuevamente por la elevada presencia de polen de citrus en las mieles de milflores empleadas en el estudio. Esto puede demostrar la lógica presencia de compuestos típicos de la miel de azahar, si bien en la miel de milflores no se encontraban en cantidades tan elevadas.

3.3. Cambios en el perfil volátil inducidos por los tratamientos térmicos

Para estudiar la influencia de los tratamientos térmicos de licuación y pasteurización sobre la fracción volátil de las mieles, se realizó un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA), tomando en consideración dos factores: tratamiento térmico (licuación/pasteurización) y el tipo de miel (azahar/romero/milflores/mielada), así como las interacciones de estos factores. En la Tabla VI.3 se muestra el F-ratio obtenido en el análisis de los compuestos volátiles analizados. El F-ratio representa el cociente entre la variabilidad debida al efecto considerado y la varianza residual. Un alto valor de F-ratio nos indica un efecto mayor del factor en cuestión sobre la variable estudiada. De acuerdo con esto, el mayor efecto sobre las variables (compuestos volátiles) fue causado por el tipo de miel, ya que este factor fue significativo en casi la totalidad de compuestos identificados. Por el contrario, con relación al factor tratamiento se observa que fue significativo para 29 de los 74 compuestos. La interacción entre los dos factores son relevantes en aproximadamente la mitad de los compuestos, lo que indica que en esos casos la variación de los compuestos volátiles al aplicar los tratamientos térmicos fue diferente dependiendo del tipo de miel.

De los 29 compuestos afectados significativamente por los tratamientos térmicos, 20 pertenecen al grupo de los alcoholes y aldehídos. Posiblemente las condiciones de licuación y pasteurización a las que fueron sometidas las mieles en este estudio (similares a las empleadas por la industria de envasado de miel), tienen un mayor efecto sobre los alcoholes y aldehídos que sobre el resto de

compuestos. Visser et al. (1988) observaron que algunos compuestos aldehídicos como el 4-methoxybenzaldehyde aumentaban significativamente cuando la miel era calentada a 60-70 ºC (a tiempos comprendidos entre 16 y 64 horas). Sin embargo otros aldehídos como el benzaldehyde solo experimentaban incrementos significativos cuando las mieles eran tratadas a 80ºC. Estos mismos autores también observaron que determinados alcoholes como el phenyl ethyl alcohol, entre otros, incrementaban sus niveles cuando las mieles eran calentadas. El incremento de alcoholes como el pentanol, 2-methyl-1 butanol, 3-methyl-1-butanol y propanol pueden originarse a partir de los correspondientes amino ácidos: norleucine, isoleucine, leucine y α-aminobutiric acid (Wootton et al., 1978).

Especial atención merecen los compuestos derivados del furano, ya que normalmente se forman por degradación de azúcares de igual forma que ocurre en las reacciones de Maillard; por esta razón son considerados indicadores de los tratamientos térmicos y las condiciones de almacenamiento sufridas por las mieles. De esta manera se pueden formar, entre otros compuestos, el furfural (a partir de las pentosas) y el HMF (a partir de las hexosas). En este estudio se ha observado un efecto significativo del tratamiento térmico tanto para el furfural (identificado en las tres mieles florales) como para el 4,5,7a-Hexahydrobenzofuran-3,6-dimethyl-2,3,3a (identificado únicamente en la miel de azahar). Para ambos compuestos se ha apreciado un incremento más acusado como consecuencia del tratamiento de licuación, sin apenas apreciarse cambios importantes entre la miel licuada y la pasteurizada. Para los otros 5 derivados del furano identificados: 1-(2-furanyl)-ethanone; 2-furanmethanol; 2-furanmethanol,5-ethenyltetrahydro-a,a,5-trimethyl-trans; dihydro-2(3H)-furanone y dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone, aunque se ha observado un ligero aumento después de la licuación, éste no ha resultado significativo.

El 5-hidroximethyl furfural (HMF), es un buen indicador del tratamiento térmico sufrido por las mieles. Para la cuantificación de este compuesto el procedimiento más adecuado es el espectrofotométrico o el HPLC ya que no se extrae bien como parte de la fracción volátil si no se encuentra en cantidades muy elevadas. Si bien algunos autores como Visser et al. (1988) lo han identificado en la fracción volátil, este hecho puede deberse a que la propia técnica de extracción utilizada por ellos (Lickens-Nickelson), con temperaturas de ebullición y tiempos no inferiores a 60 minutos podría favorecer fácilmente su desarrollo.

Después de analizar el comportamiento de cada compuesto de forma individual, se estudió el efecto que sobre la fracción volátil tuvieron tanto los tratamientos térmicos aplicados como el tipo de miel, llevando a cabo un análisis de componentes principales (PCA). La Figura VI.2 muestra el gráfico de "scores" de las muestras, mientras que en las figura VI.3 muestra el gráfico con el "loading" de todos los compuestos obtenidos en la fracción volátil de los cuatro tipos de miel, tanto para las mieles sin tratar (C) como para las que han sido sometidas a los tratamientos térmicos de licuación (L) y pasteurización (P). En el análisis se obtuvo que 3 componentes principales (PCs) explicaban el 76% de la variación en los datos. El PC1 explicaba el 41% de la variabilidad, el PC2 el 20% y el PC3 el 15%. En el gráfico de "scores", la proximidad de las muestras indica un comportamiento similar de los perfiles aromáticos y en el de "loading" la proximidad de los compuestos indica un grado de correlación entre sus cambios de concentración (patrón de variación similar). La localización de las muestras (crudas y tratadas) en el gráfico forman dos grupos importantes claramente diferenciados, uno de ellos a la derecha el cual está relacionado con la miel de mielada y el otro localizado en la parte izquierda correspondiente a las mieles florales: azahar en la zona inferior, romero en la parte central y milflores en la parte superior. El primer componente principal permite diferenciar entre mieles florales y mieles de mielada, mientras que mediante el segundo componente principal podemos diferenciar las tres mieles florales. Este resultado pone de manifiesto que el origen de las mieles (floral o mielada) tiene una gran influencia en las diferencias entre muestras. También es fácilmente observable que los diferentes tratamientos térmicos aplicados no tuvieron una gran influencia en la variación de la fracción volátil ya que las agrupaciones se deben fundamentalmente al tipo de miel, independientemente de se habían sufrido tratamiento térmico o no. Escriche et al. (2011) demostraron también para otros compuestos presentes en la miel como flavonoides y fenoles, que los tratamientos térmicos convencionales aplicados por la industria envasadora de miel, no provocan cambios significativos en dichos compuestos, siempre y cuando estos tratamientos no sean extremos.

El gráfico de "loading" muestra que ciertos compuestos son los responsables principales del agrupamiento de los diferentes tipos de miel. Por ejemplo compuestos que únicamente están presentes en la miel de azahar como el antranilic acid methyl ester, así como los lilac aldehydes y el hydroxylinalool entre otros, son en gran medida responsables de la diferenciación entre esta miel y las demás. Lo mismo ocurre con el 1-metoxy-2-propy acetate, 2-ethyl-hexanoic acid y

dodecane en el caso del romero. Por otra parte los furanos (excepto el furfural), los sulphur compounds y una gran cantidad de ácidos y alcoholes condicionan el agrupamiento de la miel de mielada. La gran diferencia en cuanto a constituyentes aromáticos de la miel procedente de mielatos, de las procedentes del néctar de flores, concuerda con las grandes diferencias físico-químicas encontradas para estas mieles tanto en este estudio como por otros autores (Mateo y Bosch-Reig, 1998).

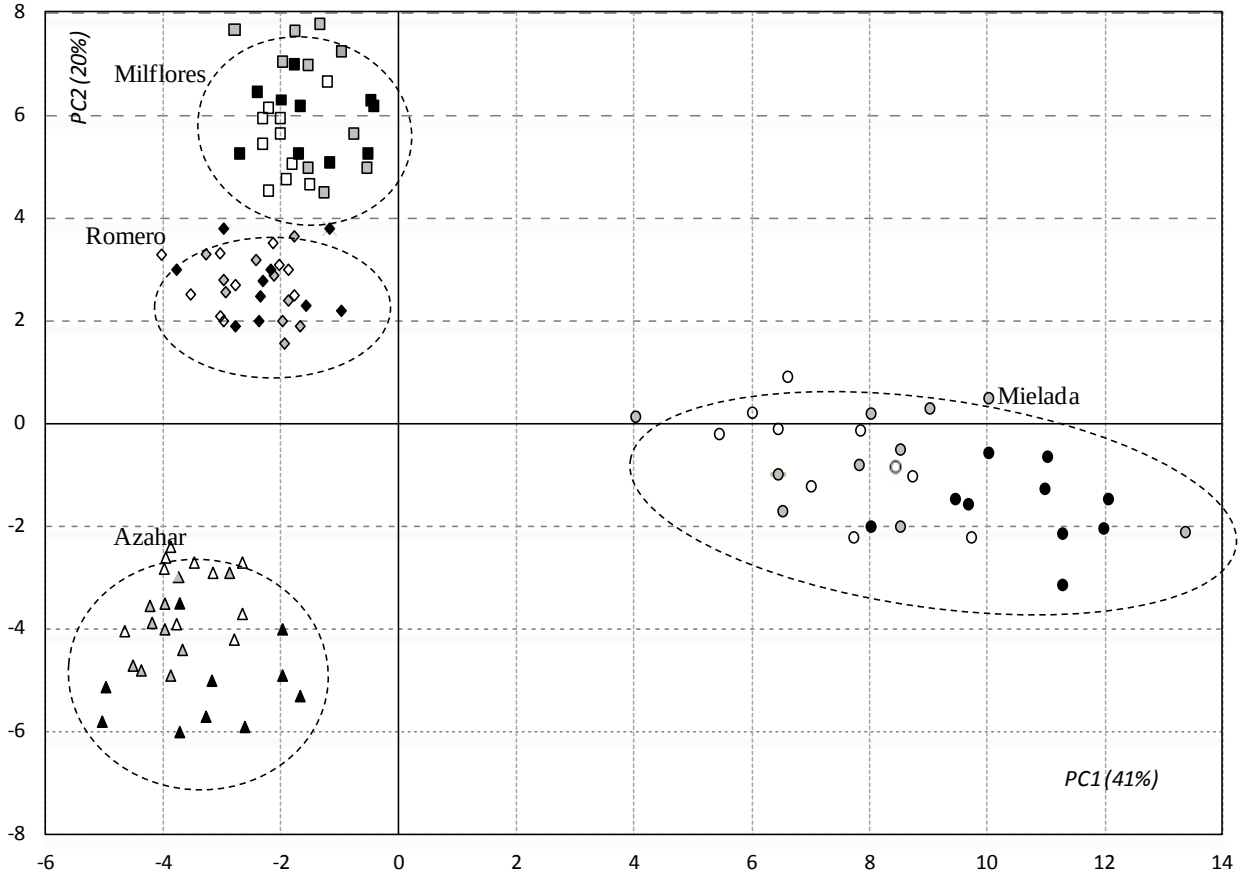


Figura VI.2. Análisis de componentes principales (PCA) de compuestos volátiles. Gráfico de "scores" de los dos componentes principales (símbolos blancos: muestras crudas; símbolos grises: muestras licuadas; símbolos negros: muestras pasteurizadas).

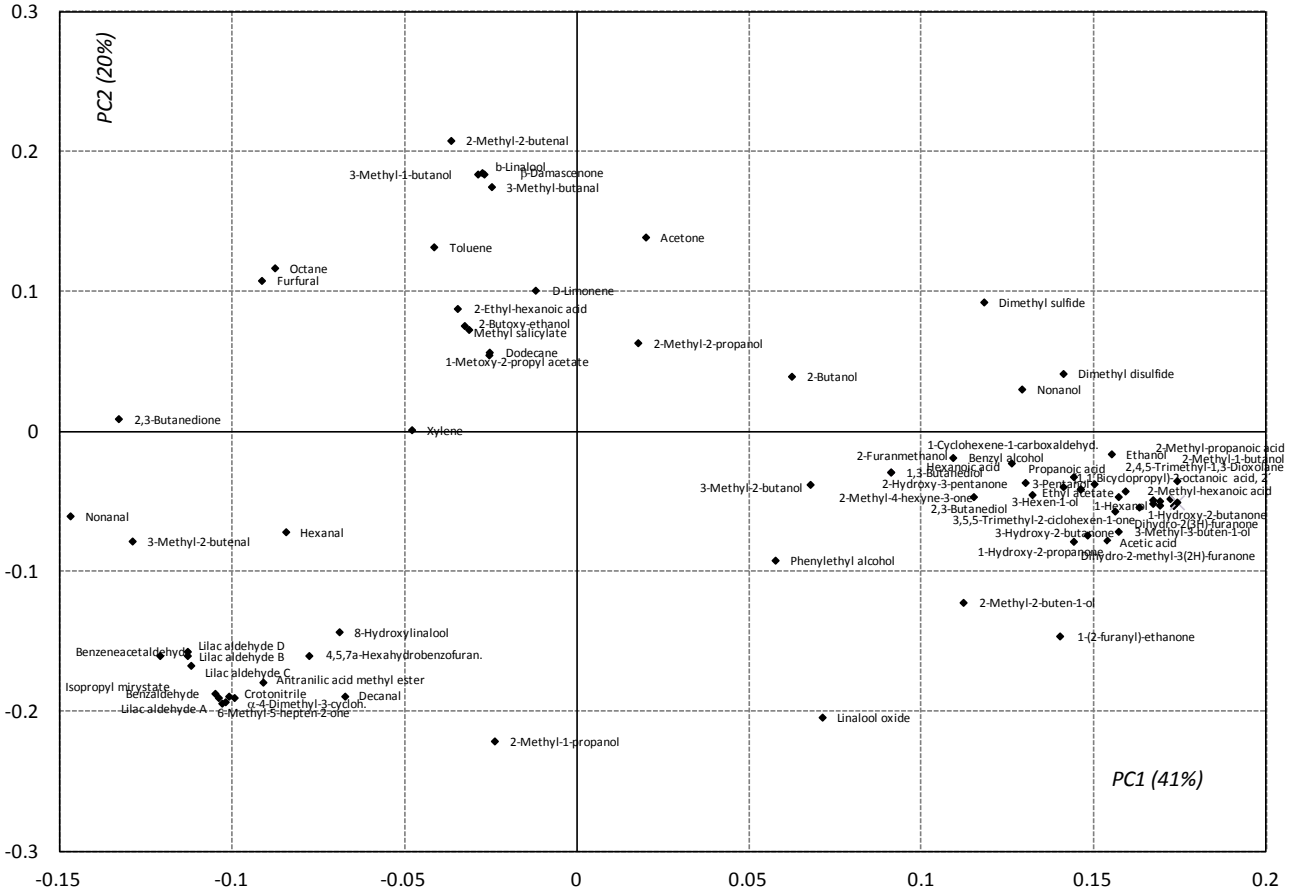


Figura VI.3. Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos volátiles. Gráfico de "loadings" de los dos componentes principales para los compuestos identificados en la fracción volátil en los cuatro tipos de miel.

Tabla VI.3. Valores de la áreas medias relativas (con respecto al patrón interno) de los compuestos volátiles identificados antes (C) y después de los tratamientos térmicos (L, licuación; P, pasteurización) en las diferentes mieles; y ANOVA F-ratio para cada unos de los dos factores (T, tratamiento y H, tipo de miel) y la interacción entre ambas variables (T x H).

Compuestos volátiles	Azahar			Romero			Milflores			Mielada			ANOVA F-ratio		
	C	L	P	C	L	P	C	L	P	C	L	P	T	H	T x H
Acids															
2-Ethyl-hexanoic acid	-	-	-	0.08	0.09	0.08	-	-	-	-	-	-	0.24ns	400.46***	0.24ns
2-Methyl-hexanoic acid	-	-	-	0.27	-	-	-	-	-	1.18	1.74	1.68	0.21ns	63.08***	1.41ns
2-Methyl-propanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.55	0.89	0.47	1.12ns	28.03***	1.12ns
Acetic acid	2.00	0.99	2.16	1.10	1.10	0.88	0.18	1.15	0.08	6.42	9.40	13.9	1.78ns	31.79***	2.11ns
Hexanoic acid	-	-	-	0.05	0.75	0.06	-	-	-	0.49	0.47	0.76	2.15ns	16.76***	3.90**
Propanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	0.30	0.37	2.35ns	46.54***	1.58ns
Alcohols															
1,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20	0.25	0.25	1.65ns	791.13***	1.84ns
1-Hexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	1.12	1.00	1.48ns	256.83***	1.48ns
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33	0.26	0.44	0.10ns	4.16*	0.1ns
2-Butanol	-	-	-	0.23	0.36	0.35	-	-	-	0.16	0.28	0.14	0.62ns	11.56***	0.37ns
2-Butoxy-ethanol	-	-	-	0.31	0.66	0.60	-	-	-	-	-	-	8.94**	216.62***	8.94***
2-Methyl-1-butanol	-	-	-	-	-	-	0.28	0.47	0.74	3.71	4.28	5.51	3.24ns	140.07***	1.86ns
2-Methyl-1-propanol	4.35	3.70	6.30	-	-	-	0.39	0.68	0.60	1.93	2.24	2.99	11.15***	189.49***	5.55***
2-Methyl-2-buten-1-ol	0.40	0.73	0.70	-	-	-	-	-	-	1.70	0.47	1.99	8.11**	74.04***	10.28***
2-Methyl-2-propanol	0.96	0.55	1.27	1.66	1.06	2.81	1.49	1.04	1.37	0.92	1.82	1.06	1.89ns	2.54ns	0.08ns
2-Methyl-3-buten-2-ol	0.43	0.44	0.59	1.05	0.94	0.93	-	-	-	0.58	0.60	0.85	0.56ns	27.36***	0.45ns

3-Hexen-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.53	0.18	0.67	18.09***	175.09***	18.09***
3-Methyl-1-butanol	-	-	-	0.08	-	-	0.31	0.41	0.48	-	-	-	8.28**	133.65***	7.68***
3-Methyl-2-butanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90	1.00	1.10	0.73ns	638.17***	0.97ns
3-Methyl-3-buten-1-ol	0.91	1.03	1.21	0.20	0.54	0.43	0.88	1.30	0.90	2.45	2.43	3.06	3.07ns	94.33***	1.66ns
3-Pentanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.14	0.20	0.26	1.64ns	222.39***	1.83ns
Benzyl alcohol	-	-	-	0.05	0.76	0.04	-	-	-	0.36	0.50	0.55	2.88ns	4.18***	2.47ns
Ethanol	0.21	0.26	1.08	0.39	0.27	0.26	0.98	1.22	1.32	2.36	3.00	3.50	2.35ns	39.26***	1.31ns
Nonanol	-	-	-	0.03	-	-	0.11	0.14	0.11	0.41	0.45	0.11	5.57**	34.9***	4.38*
Phenyl ethyl alcohol	0.32	0.45	0.49	0.05	0.77	0.70	0.08	0.14	0.12	0.36	0.53	0.53	3.98*	3.14*	1.58ns
Aldehydes															
1-Cyclohexene-1-carboxaldehyde-5,5-dimethyl-3-oxo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.63	1.51	1.00	5.88*	1.64.84***	6.65***
2-Methyl-2-butenal	-	-	-	0.26	0.59	0.39	0.86	1.52	1.61	-	-	-	5.14*	82.54***	2.82*
3-Methyl-2-butenal	0.71	0.51	0.77	0.13	0.49	0.53	0.39	-	0.51	-	-	-	5.34*	27.37***	3.85**
3-Methyl-butanal	-	-	-	-	-	-	0.87	2.01	1.68	-	-	-	3.04ns	60.79***	3.04*
Benzaldehyde	1.38	1.20	1.77	0.37	0.87	0.77	-	-	-	0.12	0.25	0.20	16.68***	378.89***	11.39***
Benzeneacetaldehyde	0.82	0.99	1.15	0.24	0.85	0.51	-	-	-	-	-	-	7.53**	140***	4.41**
Decanal	0.29	0.27	0.44	0.07	0.24	0.26	-	-	-	0.15	0.18	0.12	6.20**	48.11***	3.77*
Hexanal	0.08	0.11	0.16	0.16	0.28	-	-	-	-	-	-	-	8.02**	41.81***	15.19***
Lilac aldehyde A	1.89	1.64	2.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48.69***	1727.3***	48.69***
Lilac aldehyde C	1.81	1.51	2.67	-	-	-	0.33	0.49	0.44	-	-	-	38.81***	1115.61***	39.00***
Lilac aldehyde B	1.16	1.01	1.76	-	-	-	0.36	0.30	0.38	-	-	-	25.21***	593.27***	20.57***
Lilac aldehyde D	1.47	1.36	2.49	-	-	-	0.35	0.61	0.52	-	-	-	38.58***	743.54***	36.62***
Nonanal	0.74	0.85	1.00	0.74	0.39	1.05	0.31	0.50	0.38	-	-	-	7.87**	95.66***	7.07***

α-4-Dimethyl-3-cyclohexe-1-acetaldehyde	0.92	1.48	1.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.31***	879.07***	16.35***
Hydrocarbons															
Octane	0.46	0.39	0.52	1.19	0.64	1.06	0.54	0.77	0.56	0.18	0.16	0.16	1.03ns	26.61***	2.46ns
Dodecane	-	-	-	0.10	0.22	0.08	-	-	-	-	-	-	2.77ns	23.44***	2.77*
Toluene	0.21	0.12	0.18	-	-	-	0.62	0.84	0.61	-	0.05	0.14	0.33ns	49.51***	1.24ns
m-Xylene o p-Xylene	-	0.08	0.08	0.27	-	-	-	-	-	-	-	-	23.34***	15.40***	15.24***
Ketones															
1-Hydroxy-2-butanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	1.66	1.54	0.94ns	43.86***	0.94ns
1-Hydroxy-2-propanone	0.32	0.21	0.27	0.07	-	-	-	-	-	0.80	2.39	1.92	1.22ns	18.05***	1.64ns
2,3-Butanedione	0.52	0.45	0.75	0.14	0.24	0.24	0.64	0.69	0.58	-	-	-	1.21ns	79.17***	2.57*
2-Hydroxy-3-pentanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	0.33	0.15	0.67ns	8.28***	0.67ns
2-Methyl-4-hexyne-3-one	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.44	3.01	2.39	0.25ns	42.29***	0.25ns
3,5,5-Trimethyl-2-ciclohexen-1-one	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	0.29	0.53	1.57ns	44.52***	1.57ns
3-Hydroxy-2-butanone	1.06	1.34	1.38	-	-	-	0.80	1.22	1.21	3.32	5.24	6.98	1.88ns	23.45***	1,12ns
6-Methyl-5-hepten-2-one	0.09	0.09	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.77*	366.83***	3.77**
Acetone	0.21	0.28	0.36	-	-	-	1.42	1.82	2.17	0.47	0.66	0.64	2.11ns	56.73***	0.85ns
Esters															
(1,1-Bicyclopropyl)-2-octanoic acid, 2-hexyl-methyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	0.53	-	1.80ns	20.60***	1.80ns
1-Metoxy-2-propyl acetate	-	-	-	0.08	0.38	0.18	-	-	-	-	-	-	5.9**	32.52***	5.9***
Antranilic acid methyl ester	0.71	0.66	0.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.43ns	45.83***	4.43**
Ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.81	1.64	1.24	19.74***	527.11***	19.74***

Isopropyl mirystate	0.30	0.29	0.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.84ns	414***	1.00ns
Methyl salicylate	-	-	-	0.49	1.02	0.61	-	-	-	-	-	-	6.68**	128.70***	6.68***
Furanes															
1-(2-furanyl)-ethanone	0.13	0.16	0.18	-	-	-	-	-	-	0.27	0.41	0.38	2.62ns	78.51***	1.39^{ns}
2-Furanmethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.16	2.33	1.96	2.67ns	20.83***	2.67*
2-Furanmethanol-5-ethenyltetrahydro-α,α,5-trimethyl-trans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.52	2.09	1.95	1.49ns	173.91***	1.49
4,5,7a-Hexahydrobenzofuran-3,6-dimethyl-2,3,3a	0.20	0.45	0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42.76***	1003.77***	54.93***
Dihydro-2(3H)-furanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.39	0.40	0.50	0.77ns	123.77***	0.77ns
Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.34	0.46	0.54	2.54ns	143.07***	2.54ns
Furfural	1.48	1.98	2.15	0.25	1.04	1.02	2.72	5.23	4.31	-	-	-	8.97**	82.27***	2.66*
Sulphur compounds															
Dimethyldisulphide	-	0.11	0.10	-	-	-	0.22	0.41	0.30	0.38	0.45	0.48	3.71ns	50.18***	0.86ns
Dimethylsulphide	0.09	0.12	0.15	0.20	0.17	0.11	0.42	0.65	0.71	0.70	0.47	0.69	0.42ns	20.43***	11.9ns
Terpenes															
β–Damascenone	-	-	-	-	-	-	0.22	0.34	0.33	-	-	-	3.23ns	192.57***	b-3.23*
β–Linalool	-	-	-	-	-	-	1.84	2.00	2.23	-	-	-	0.88ns	280.24***	0.88ns
D-Limonene	0.57	0.39	0.37	0.11	0.03	0.07	0.40	0.36	0.36	0.12	0.25	0.21	0.33ns	5.82**	2.18ns
Hotrienol	0.97	1.33	1.30	-	-	-	2.18	3.82	2.93	0.10	1.86	-	5.23*	27.20***	1.58ns
8-Hydroxylinalool	0.26	0.32	0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.10ns	480.6***	0.88ns

Linalool oxide	1.01	1.20	1.35	0.04	0.50	0.48	0.30	0.53	0.47	1.11	1.30	1.48	10.05***	106.32***	2.38ns
Miscellaneous															
2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.94	0.91	1.85	3.0ns	48.45***	3.0*

Ns: no significantivo *p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001

4. Conclusiones

El perfil de compuestos volátiles identificados ha permitido clasificar las mieles según su origen botánico, con una diferenciación más evidente entre la miel procedente del néctar de las flores y la de mielada. Aunque la observación individual de cada compuesto volátil refleja que los tratamientos térmicos modifican significativamente los niveles de algunos de ellos, el análisis general de la fracción volátil de cada tipo de miel pone de manifiesto que estos tratamientos apenas modifican globalmente el perfil volátil intrínseco de cada miel. En definitiva, este perfil varía más entre los diferentes tipos de mieles: monoflorales (azahar y romero), milflores y de mielada, que por causa de los tratamientos térmicos industriales (licuación y pasterización) llevados a cabo en condiciones moderadas. Debido a todo esto, si el tratamiento industrial se lleva de forma cuidadosa y bajo condiciones controladas, las alteraciones de flavor/aroma intrínseco de las mieles no deben suponer un problema. Esto es especialmente relevante para mieles de un alto valor comercial, como pueden ser ciertas mieles monoflorales y de mielada.

VII. OBTENCIÓN DE UN MODELO PREDICTIVO PARA EL HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) EN MIEL

VII. Obtención de un modelo predictivo para el hidroximetilfurfural (HMF) en miel

1. Introducción

Preservar las características intrínsecas de la miel es un reto para el sector apícola. En este sentido, es interesante poder llegar a conocer a qué nivel las condiciones de tiempo y temperatura, a las que se someta desde su recolección hasta su envasado, pueden afectar el grado de frescura de la miel. Como se ha demostrado en capítulos anteriores, el HMF es el parámetro idóneo para poder evaluar dicho grado de frescura.

Por esta razón la obtención de un modelo predictivo del contenido de HMF en función de las variables tiempo y temperatura proporcionaría una herramienta a la industria envasadora de miel; por una parte permitiría conocer las condiciones idóneas de proceso que minimicen la perdida de frescura de la miel y por otra podría predecir el valor de este parámetro en función de las condiciones de proceso a las que fuera sometida.

Diferentes trabajos han sido publicados en relación a la cinética del HMF en mieles (Tosi et al., 2004; Fallico et al., 2004; Turham et al., 2008). Sin embargo, estos estudios aportan poca información sobre las condiciones reales a las que se somete la miel desde su recolección hasta su envasado, ya que se centran en condiciones de tiempo y temperatura superiores.

Por lo tanto, la finalidad del presente capítulo ha sido obtener un modelo predictivo del contenido de HMF en miel para las condiciones habituales en el procesado de esta.

2. Materiales y métodos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron los valores de HMF obtenidos en el capítulo V, en el que se estudiaba la evolución de este parámetro en las etapas de almacenamiento, licuación y pasteurización. Con estos valores se ajustaron dos modelos matemáticos para relacionar el contenido de HMF de las mieles en función del tiempo y la temperatura: orden 0 (ecuación VII.1) y orden 1 (ecuación VII.2).

$$[HMF]_t = [HMF]_0 + k_0 t \qquad \text{orden 0} \qquad (VII.1)$$

$$[HMF]_t = [HMF]_0 \cdot e^{k1t} \qquad \text{orden 1} \qquad (VII.2)$$

donde:

$[HMF]_t$ = Contenido de HMF a tiempo t

$[HMF]_0$= Contenido de HMF inicial (t=0)

k_0= Constante cinética de orden 0

k_1= Constante cinética de orden 1

t = tiempo

Se aplicó el modelo de Arrhenius para relacionar ambas constantes (k_0 y k_1) con la temperatura (ecuación VII.3).

$$k(T) = A \cdot e^{-\left(\frac{E_a}{R \cdot T}\right)} \qquad \text{(VII.3)}$$

donde:

k(T): constante cinética (dependiente de la temperatura)

A: factor de frecuencia.

E_a: energía de activación.

R: constante universal de los gases

T: temperatura

3. Resultados y discusión

Las tablas VII.1 a VII.5 muestran los resultados obtenidos para los ajustes de las constantes cinéticas tanto de orden 0 como de orden 1, para cada una de las mieles, considerando las diferentes temperaturas de estudio (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 75, 80 y 85ºC). Se observa que los valores de los ajustes son en general mejores para la cinética de orden 0.

Tabla VII.1. Valores de las constantes cinéticas (k_0 y k_1) para los ajustes de orden 0 y orden 1 obtenidas en la miel de mielada para cada temperatura.

Miel de mielada				
Orden cinético	**T (ºC)**	**k_0**	**k_1**	**R^2**
n=0	25	0.0072		0.9648
	30	0.0114		0.9575
	35	0.0304		0.9406
	40	0.0384		0.9598
	45	0.0131		0.5927
	50	0.0403		0.8958
	55	0.1021		0.9984
	75	33.341		0.9702
	80	41.044		0.7585
	85	45.865		0.7636

n=1	25	0.0007	0.9119
	30	0.0009	0.8987
	35	0.0019	0.9261
	40	0.0022	0.8398
	45	0.0027	0.5621
	50	0.0071	0.8149
	55	0.0136	0.9437
	75	4.4856	0.9470
	80	5.3717	0.7092
	85	5.8792	0.7146

Tabla VII.2. Valores de las constantes cinéticas (k_0 y k_1) para los ajustes de orden 0 y orden 1 obtenidas en la miel de eucalipto para cada temperatura.

Miel de eucalipto				
Orden cinético	**T (ºC)**	**k_0**	**k_1**	**R^2**
n=0	25	0.0079		0.9558
	30	0.0111		0.9580
	35	0.0280		0.9453
	40	0.0364		0.9932
	45	0.0211		0.8815
	50	0.0417		0.9479
	55	0.1102		0.9886
	75	7.2227		0.4280
	80	15.993		0.9296
	85	25.919		0.9053
n=1	25		0.0011	0.6258
	30		0.0013	0.5639
	35		0.0024	0.5858
	40		0.0028	0.3721
	45		0.0040	0.8725
	50		0.0069	0.9452
	55		0.0138	0.9714
	75		0.9790	0.4281
	80		2.0697	0.9136
	85		3.1374	0.9338

Tabla VII.3. Valores de las constantes cinéticas (k_0 y k_1) para los ajustes de orden 0 y orden 1 obtenidas en la miel de milflores para cada temperatura.

Miel de milflores				
Orden cinético	**T (ºC)**	**k_0**	**k_1**	**R^2**
n=0	25	0.0064		0.9756
	30	0.0105		0.9462
	35	0.0196		0.8854
	40	0.0269		0.9756
	45	0.0164		0.7860
	50	0.0400		0.9612
	55	0.1029		0.9445
	75	21.482		0.8323
	80	23.745		0.7817
	85	30.808		0.8845
n=1	25		0.0007	0.8201
	30		0.0010	0.7347
	35		0.0016	0.9294
	40		0.0019	0.8837
	45		0.0029	0.7801
	50		0.0064	0.9194
	55		0.0128	0.7884
	75		2.5385	0.8165
	80		2.7700	0.7865
	85		3.4945	0.8654

Tabla VII.4. Valores de las constantes cinéticas (k_0 y k_1) para los ajustes de orden 0 y orden 1 obtenidas en la miel de azahar para cada temperatura.

Miel de azahar				
Orden cinético	**T (ºC)**	**k_0**	**k_1**	**R^2**
n=0	25	0.0034		0.8870
	30	0.0068		0.8882
	35	0.0148		0.9378
	40	0.0204		0.9546
	45	0.0084		0.8142
	50	0.0383		0.9646
	55	0.1025		0.9705
	75	36.249		0.6069
	80	72.032		0.5307
	85	78.374		0.5853

n=1	25	0.0005	0.8377
	30	0.0007	0.9373
	35	0.0014	0.9375
	40	0.0016	0.9374
	45	0.0017	0.8035
	50	0.0064	0.9771
	55	0.0129	0.9979
	75	4.9579	0.5784
	80	8.4897	0.5044
	85	9.0216	0.5430

Tabla VII.5. Valores de las constantes cinéticas (k_0 y k_1) para los ajustes de orden 0 y orden 1 obtenidas en la miel de romero para cada temperatura.

Miel de romero				
Orden cinético	**T (ºC)**	**k_0**	**k_1**	**R^2**
n=0	25	0.0029		0.8843
	30	0.0059		0.8755
	35	0.0123		0.8917
	40	0.0209		0.9669
	45	0.0400		0.5669
	50	0.0600		0.7605
	55	0.1192		0.980
	75	6.7369		0.8829
	80	9.9418		0.9354
	85	25.763		0.7206
n=1	25		0.0002	0.9154
	30		0.0004	0.9307
	35		0.0008	0.9649
	40		0.0012	0.8772
	45		0.0063	0.4359
	50		0.0086	0.6017
	55		0.0137	0.8674
	75		1.2542	0.8852
	80		1.8135	0.9224
	85		4.2602	0.6837

El valor de las constantes en ambos modelos (k_0 y k_1) fue mayor al aumentar la temperatura, dándose este mismo comportamiento para todas las mieles. Esto indica que ambas constantes eran dependientes de ella y que por lo tanto era factible aplicar el modelo de Arrhenius, permitiéndonos relacionar el valor dichas constantes con la temperatura.

Con la finalidad de intentar obtener un modelo único que fuera válido para todo el periodo de exposición de la miel, desde su recolección hasta su envasado, y para todas las mieles estudiadas, se realizó un único ajuste del modelo de Arrhenius, considerando todos los valores de las constantes obtenidas para todas las temperaturas. Esto se hizo para la cinética de orden cero y para la de orden 1. (tabla VII.6).

Tabla VII.6. Valores obtenidos para la energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia (A) del modelo de Arrhenius considerando todos los valores obtenidos de las diferentes constantes para cada uno de los dos modelos cinéticos.

Tipo de cinética	E_a(kJ/mol)	A (h^{-1})
Orden 0	141.86	1.37E+22
Orden 1	148.20	1.68E+22

Sustituyendo en la ecuación de Arrhenius los valores de la energía de activación (E_a) y del factor de frecuencia (A) obtenidos, se calcularon los valores de las constantes cinéticas en función de la temperatura, tanto para orden 0 (k_0) como para orden 1 (k_1). Posteriormente se obtuvieron los valores de HMF, predichos por cada uno de los modelos a los diferentes tiempos y temperaturas, considerando estas constantes y los valores iniciales de HMF (HMF_0) de cada una de las mieles.

Con la finalidad de analizar la bondad de cada uno de los modelos se han representado para ambas cinéticas, los valores predichos por el modelo frente a los obtenidos experimentalmente (figura VII.1).

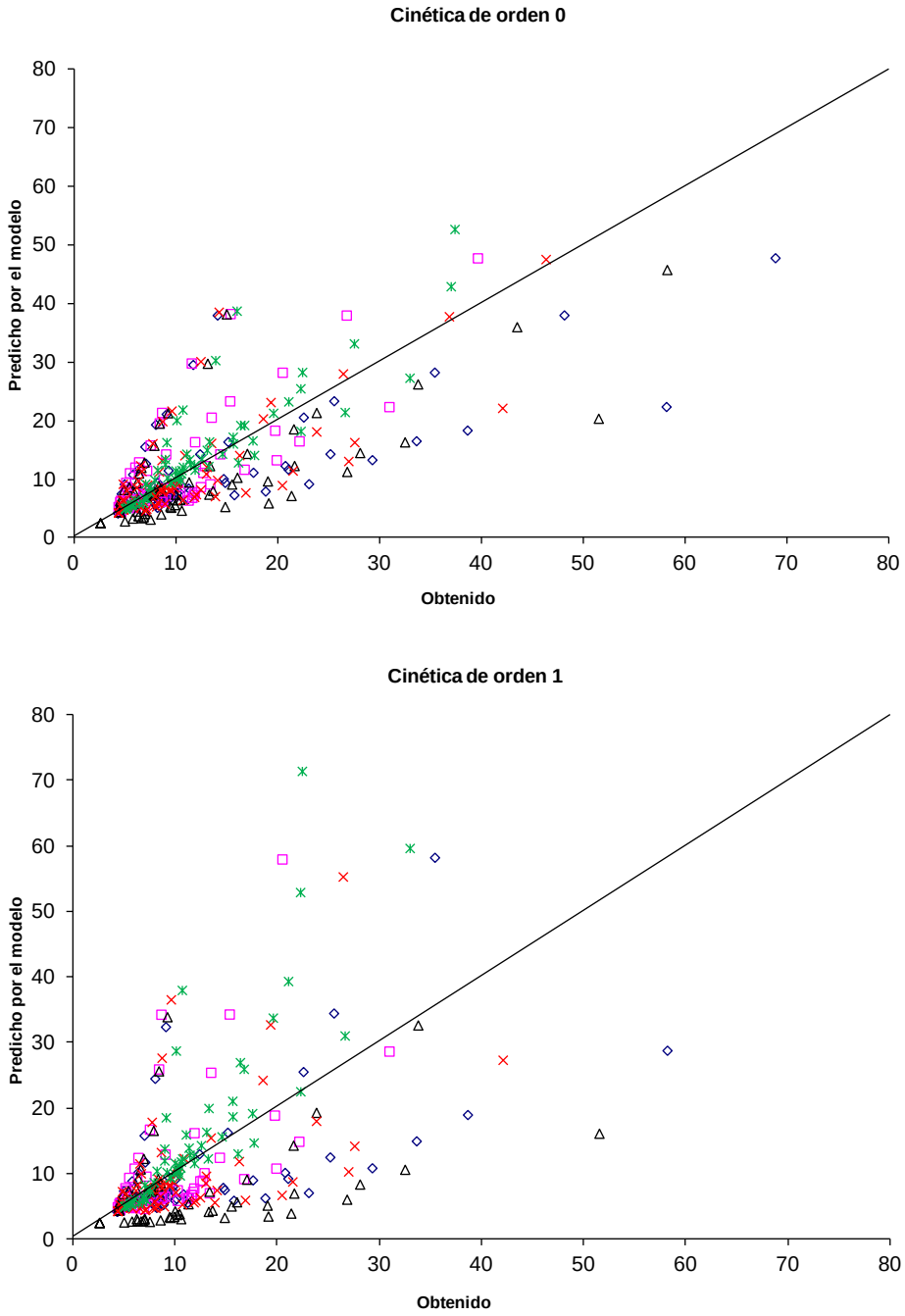


Figura VII.1. Valores de HMF (mg/kg) obtenidos experimentalmente frente a los valores predichos por cada uno de los dos modelos cinéticos utilizados: mielada (◊); azahar (□); eucalipto (Δ); milflores (x); romero (✳).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que ninguno de los dos modelos propuestos es válido para realizar una predicción fiable, ya que la dispersión de los valores con la diagonal es muy grande. Comparando ambas gráficas se aprecia que las predicciones utilizando una cinética de orden 1 son peores que si se utiliza una de orden 0, especialmente a valores altos de HMF.

Este comportamiento puede ser debido al amplio rango de temperaturas (entre 25 y 85ºC) y tiempos, asociados a ellas (desde 2 min hasta más de 60 días), que se han incluido en la obtención de los modelos de predicción del HMF. Con la finalidad de mejorar este resultado, se modelizaron de forma independiente los valores de HMF correspondientes a las condiciones de cada una de las tres etapas consideradas en este trabajo: almacenamiento, licuación y pasteurización.

De forma análoga a lo realizado anteriormente, para cada etapa se ajustó el modelo de Arrhenius tanto la cinética de orden cero y para la de orden 1. Las temperaturas consideradas fueron: 25, 30, 35 y 40ºC (almacenamiento); 45, 50 y 55ºC (licuación) y 75,80 y 85ºC (pasteurización). En la tabla VII.7 se muestran los valores obtenidos para la energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia (A) correspondientes a los modelos cinéticos de orden 0 y orden 1, en cada una de las etapas.

Tabla VII.7. Valores obtenidos para la energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia (A) del modelo de Arrhenius en cada una de las etapas para los modelos cinéticos de orden 0 y orden 1.

Etapa	Tipo de cinética	E_a(kJ/mol)	A (h^{-1})
Almacenamiento	Orden 0	90.83	4.32E+13
	Orden 1	66.19	2.22E+08
Licuación	Orden 0	15.86	1.92E+24
	Orden 1	123.95	7.49E+17
Pasteurización	Orden 0	84.33	7.62E+13
	Orden 1	74.11	3.13E+11

A partir de los valores de E_a y A obtenidos, se calcularon los valores de las constantes cinéticas en función de la temperatura, tanto para orden 0 (k_0) como para orden 1 (k_1). Posteriormente se obtuvieron los valores de HMF, predichos por cada uno de los modelos a los diferentes tiempos y temperaturas, considerando estas constantes y los valores iniciales de HMF (HMF_0) de cada una de las mieles.

En las figura VII.2, VII.3 y VII.4 se han representado los valores predichos por los modelos cinéticos frente a los obtenidos experimentalmente en las tres etapas.

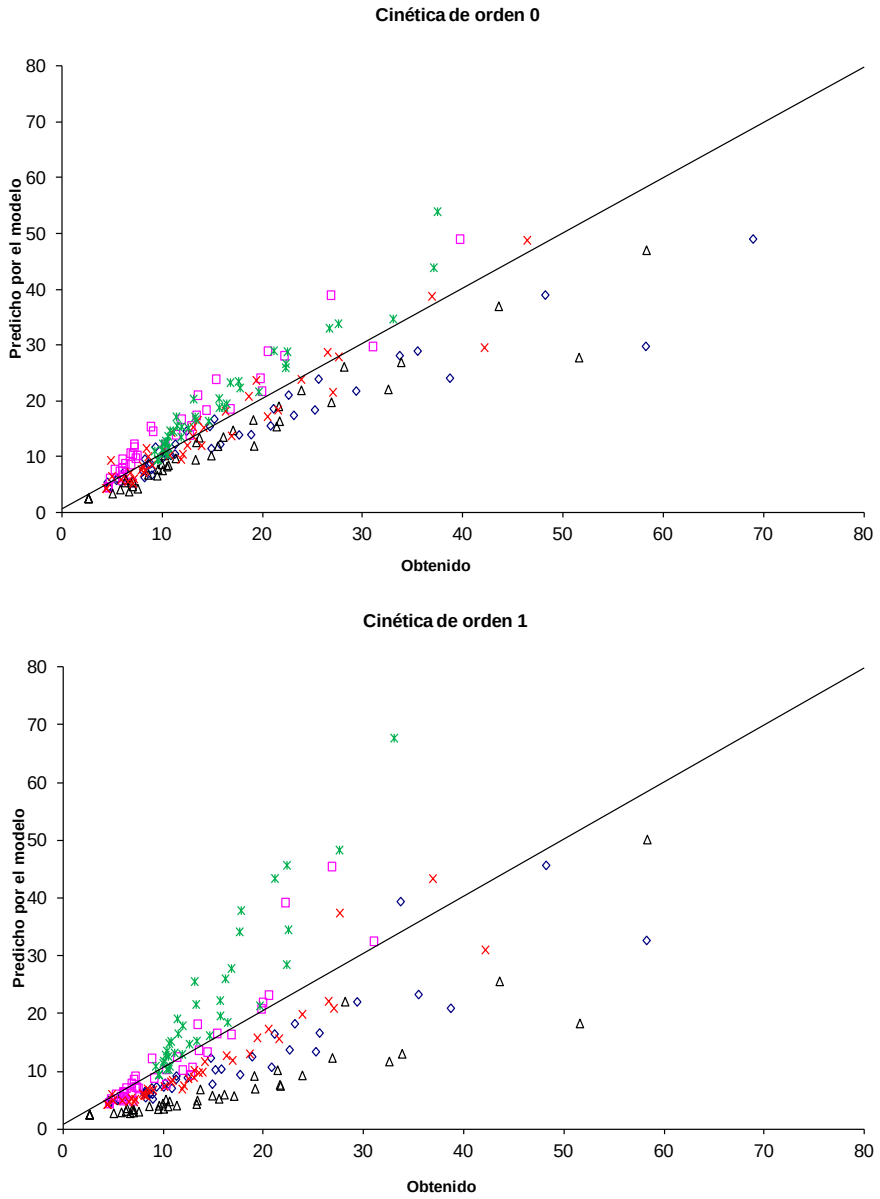


Figura VII.2. Valores de HMF (mg/kg) obtenidos experimentalmente frente a los valores predichos por cada uno de los dos modelos cinéticos para la etapa de almacenamiento. Miel de mielada (◊); azahar (□); eucalipto (Δ); milflores (x); romero (x).

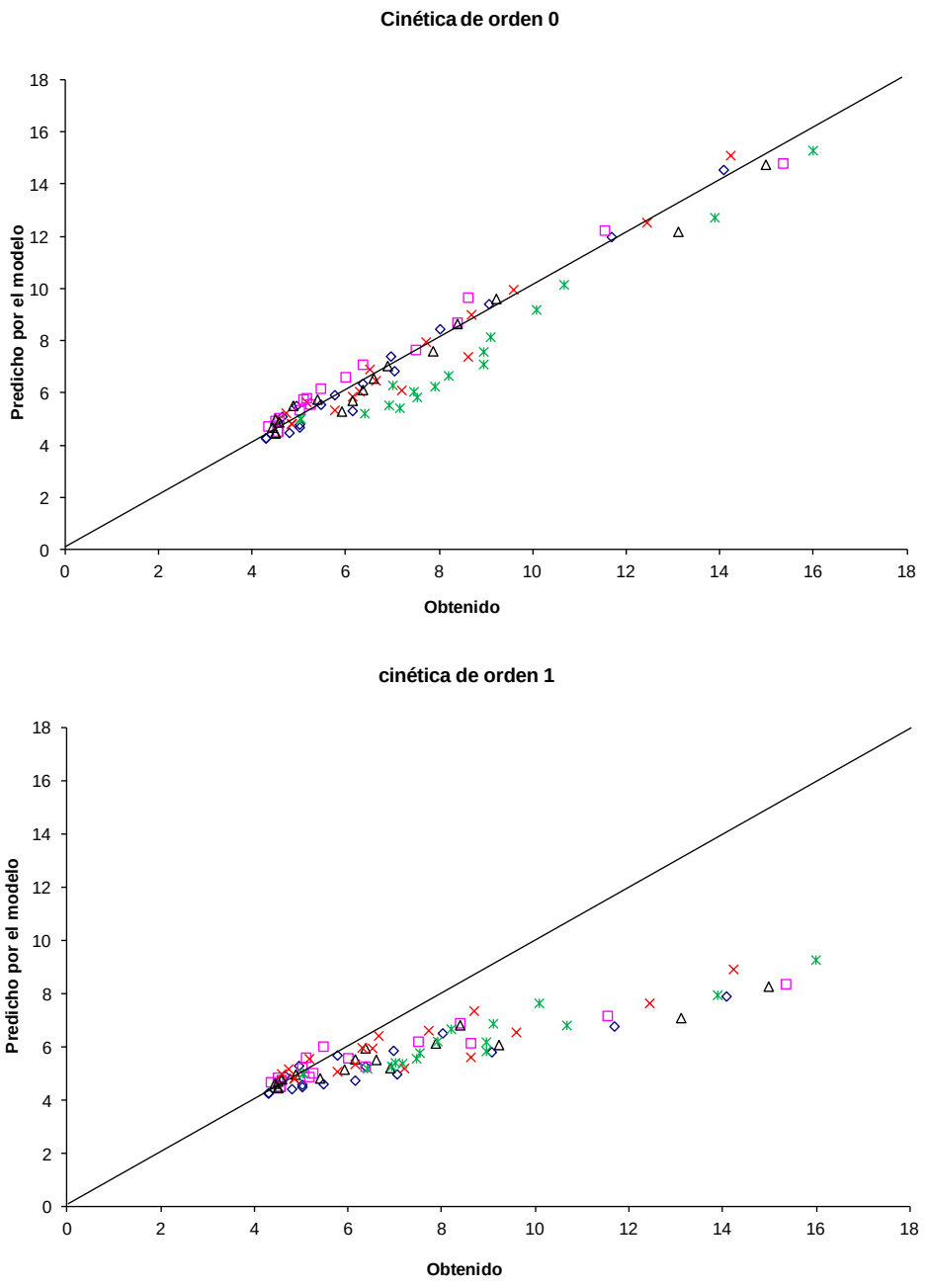


Figura VII.3 Valores de HMF (mg/kg) obtenidos experimentalmente frente a los valores predichos por cada uno de los dos modelos cinéticos para la etapa de licuación. Miel de mielada (◊); azahar (□); eucalipto (Δ); milflores (x); romero (✳).

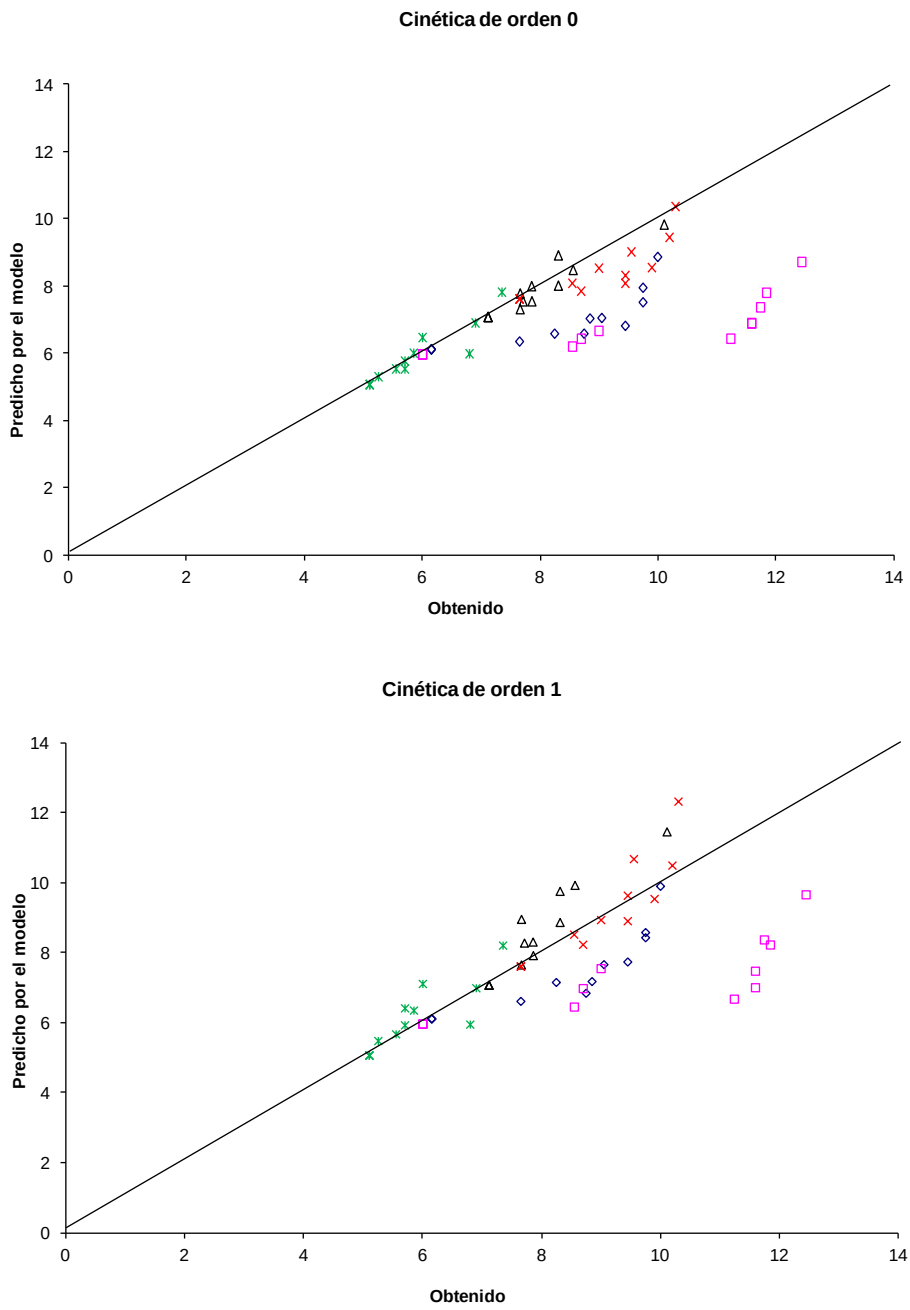


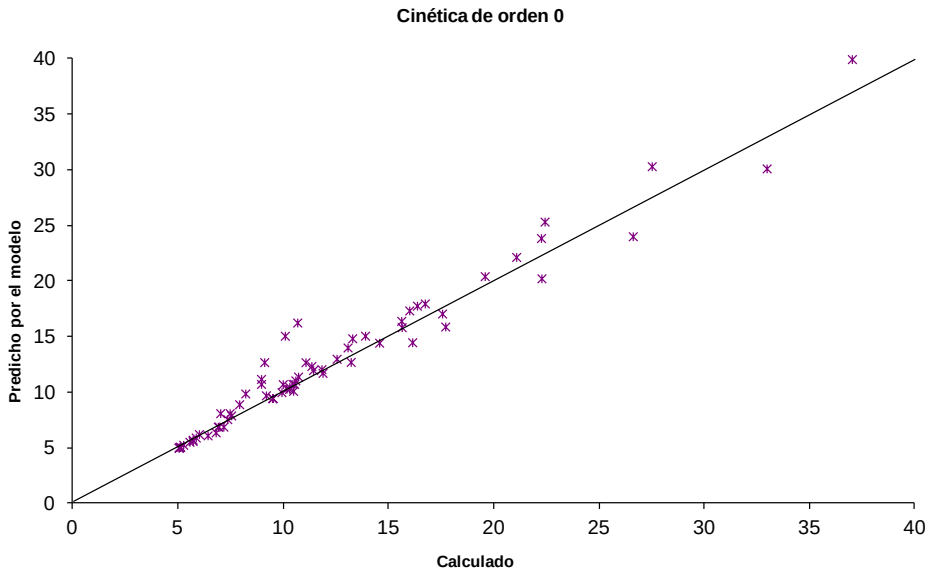
Figura VII.4. Valores de HMF (mg/kg) obtenidos experimentalmente frente a los valores predichos por cada uno de los dos modelos cinéticos para la etapa de pasteurización. Mielada (◊); azahar (□); eucalipto (Δ); milflores (x); romero (✳).

En las tres etapas la cinética de orden 0 predice mejor los valores de HMF, que la cinética de orden 1, ya que la dispersión de los puntos respecto a la diagonal es menor. Se observa que en las condiciones correspondientes a las temperaturas intermedias (45, 50 y 55ºC), el modelos de orden 0 podría servir para predecir el valor de HMF, aunque siguen habiendo valores que distan bastante de la diagonal. Observando las diferentes gráficas, se aprecia una agrupación de los valores por tipo de miel, lo que hace pensar en que cada miel tiene una tendencia diferente en la evolución del HMF. Por ello, aunque el objetivo inicial era obtener un modelo único para cualquier tipo de miel, se decidió modelizar cada tipo de miel de forma individual, teniendo siempre en cuenta que al reducir el número de valores la fiabilidad del modelo obtenido se reduce. Como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos para la miel de romero. En la tabla VII.8 se detallan los valores obtenidos al ajustar las constantes k_0 (cinética de orden 0) y k_1 (cinética de orden 1) aplicando Arrhenius.

Tabla VII.8. Valores obtenidos para la energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia (A) del modelo de Arrhenius considerando todos los valores obtenidos de las diferentes constantes para cada uno de los dos modelos cinéticos en miel de romero.

Tipo de cinética	E_a(kJ/mol)	A (h^{-1})
Orden 0	136.02	1.20E+21
Orden 1	152.87	9.26E+21

A partir de estos valores de la energía de activación y del factor de frecuencia (A), se calcularon los valores de HMF que predicen los modelos propuestos. En la Figura VII.5 se han representado los valores predichos por estos modelos frente a los valores obtenidos experimentalmente.



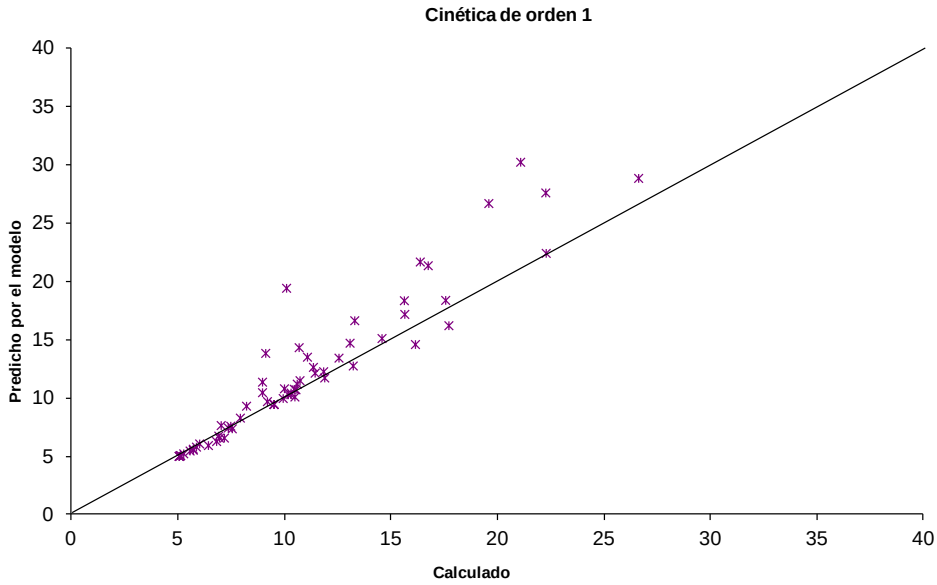


Figura VII.5. Valores de HMF (mg/kg) obtenidos experimentalmente frente a los valores predichos por cada uno de los dos modelos cinéticos para la miel de romero.

En este caso, se observa que la predicción mejora considerablemente, especialmente en la cinética de orden cero, ya que los valores se sitúan sobre la diagonal o muy cercanos a ella, incluso en los valores de HMF más altos.

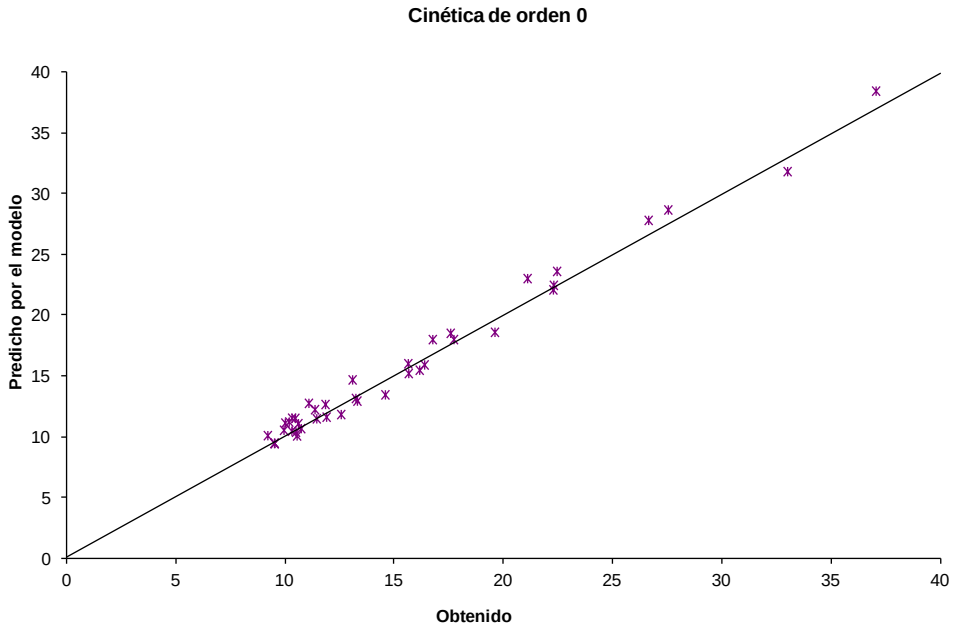
Si comparamos este resultado con el obtenido considerando todas las mieles juntas, se pone de manifiesto que es muy difícil obtener un modelo único para todas ellas, ya que la variable "tipo de miel" influye de forma considerable en el incremento del HMF.

De igual manera a lo que se hizo con todas las mieles, se planteó para esta miel modelizar el HMF en cada una de las etapas (almacenamiento, licuación y pasteurización). Sin embargo, para obtener resultados fiables, el número de datos era escaso. Por lo tanto, y a modo orientativo, se decidió modelizar únicamente los valores de la etapa de almacenamiento puesto que se disponía de ella de los valores de 4 temperaturas. Los resultados obtenidos al ajustar las constantes k_0 (cinética de orden 0) y k_1 (cinética de orden 1), tanto para una cinética de orden 0 como para una de orden 1 se muestran en la tabla VI.9.

Tabla VII.9 . Valores obtenidos para la energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia (A) del modelo de Arrhenius en la etapa de almacenamiento para los modelos cinéticos de orden 0 y orden 1 en miel de romero.

Etapa	Tipo de cinética	E_a(kJ/mol)	A (h^{-1})
Almacenamiento	Orden 0	103.37	2.34E+15
	Orden 1	84.11	3.16E+12

Con estos valores de energía de activación y factor de frecuencia (A), se calcularon los valores de HMF que predicen cada uno de los modelos propuestos. En la Figura VII.6 se han representado los valores predichos por estos modelos (orden 0 y orden 1) frente a los valores obtenidos experimentalmente en la etapa de almacenamiento.



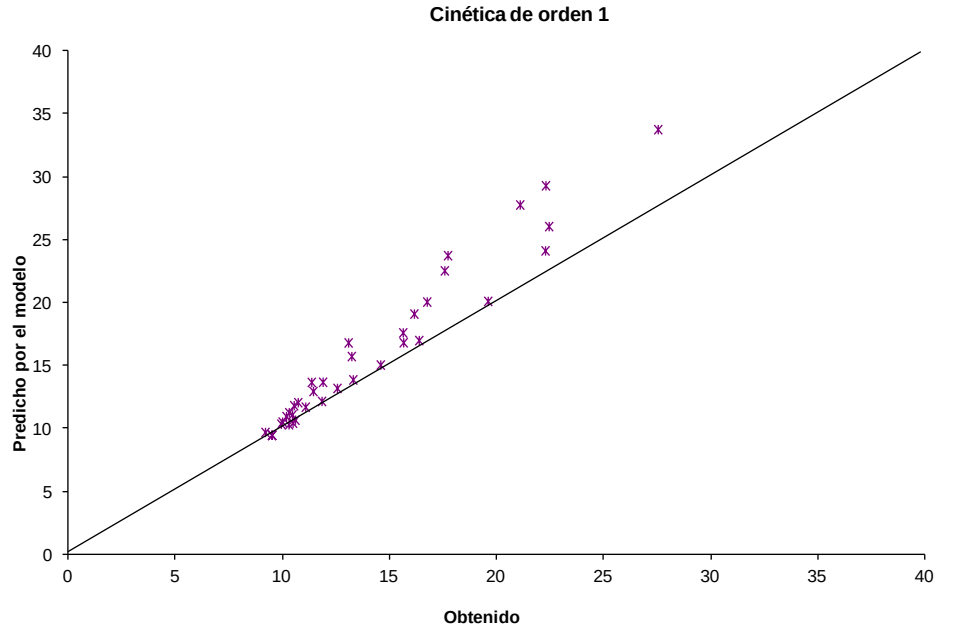


Figura VII.6. Valores de HMF (mg/kg) obtenidos experimentalmente frente a los valores predichos por cada uno de los dos modelos cinéticos para la etapa de almacenamiento en la miel de romero.

Al igual que ocurría anteriormente, el modelo de orden 0 predice mucho mejor los valores de HMF que el modelo de orden 1. Se observa la mejoría de la predicción respecto al modelo que engloba todas las etapas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este modelo se ha obtenido con un número de puntos muy bajo, y que por tanto habría que realizar un estudio más detallado, planificando un diseño experimental con la finalidad de obtener un modelo para cada tipo de miel y para cada una de las etapas por separado.

4. Conclusiones

No ha sido posible obtener un modelo único para predecir el HMF con suficientemente fiabilidad para ser aplicado a cualquier tipo de miel y en cualquier condición de tiempo y temperatura a la que ésta pueda estar expuesta (desde su recolección hasta su envasado).

La utilización de un modelo diferenciado para cada una de las etapas estudiadas (almacenamiento, licuación y pasteurización) mejora la capacidad predictiva del modelo, especialmente cuando se considera una cinética de orden cero, aunque de esta manera todavía no se logra conseguir la precisión necesaria.

La modelización del HMF en cada etapa y de forma individual para cada miel parece ser la solución en la obtención de un modelo útil y suficientemente preciso. Sin embargo, para ser concluyentes en esta afirmación sería necesario disponer de un mayor número de medidas en todas las condiciones y para aquellas mieles de interés.

VIII. COCLUSIONES

VIII. Conclusiones

1. Conclusiones del objetivo general 1. **(Aportaciones: Food Science and Techlology International, 14: 29-35 (2008).**

Al someter mieles a diferentes condiciones de tiempo/temperatura, en un rango comprendido entre 1 hora y 28 días, y entre 35 y 85ºC, el HMF varía significativamente, al contrario de la acidez, la conductividad y la humedad, que no experimentan cambios apreciables.

El HMF no evoluciona del mismo modo en los diferentes tipos de mieles estudiadas (limón, milflores y mielada), puesto que se han observado diferencias significativas entre ellas.

En la evolución del HMF de las mieles, se ha demostrado que no existe una influencia significativa de la acidez, conductividad y humedad.

Parece posible obtener un modelo de predicción del contenido de HMF en mieles en función del tiempo y la temperatura a las que puedan estar expuestas. Sin embargo, para que el modelo sea fiable, y aplicable a las condiciones reales de la industria, es necesario estudiar el comportamiento del HMF considerando de forma independiente las diferentes etapas del procesado industrial.

2. Conclusiones del objetivo general 2. **(Aportaciones: Food Chemistry, 112: 329-338 (2009); International Journal of Food Science and Technology, 49: 181-187 (2014).**

En las tres etapas estudiadas (almacenamiento, licuación y pasteurización), la evolución del HMF y de la actividad diastásica ha reflejado la pérdida de calidad de las mieles, aumentando y disminuyendo respectivamente; siendo la etapa de almacenamiento la que mayores variaciones de estos parámetros presentó.

El HMF se puede considerar como el mejor indicador de la pérdida de frescura de cualquier miel, ya que su valor en todas las mieles recién recolectadas es cero, al contrario de lo que sucede para la actividad diastásica que difiere considerablemente en función del origen botánico del que proceden los néctares o las secreciones de las plantas que visitan las abejas. Por ello, el desconocimiento del valor de la actividad diastásica de una miel en el momento de su recolección,

hace inapropiado este parámetro para evaluar la frescura de una miel en cualquier momento posterior.

En la etapa de almacenamiento, los tiempos de residencia prolongados (a temperaturas entre 25 y 40ºC) pueden afectar considerablemente a los parámetros de calidad de la miel (HMF, actividad diastásica y color), incluso en mayor medida que en las condiciones de licuación y pasteurización.

El color de las mieles, se ve influido por las condiciones de tiempo/temperatura, especialmente en mieles claras como azahar y romero, y en menor medida en las mieles oscuras, como la de mielada. Se ha observado que en mieles claras almacenadas en condiciones similares a las del periodo previo a su industrialización, pueden sufrir cambios de color apreciables por el ojo humano. Por el contrario, los tratamientos de licuación y pasteurización realizados en el presente estudio no han provocado cambios de color apreciables por el ojo humano en las mieles.

Con respecto a la licuación y la pasterización, las condiciones de trabajo recomendables serían: 45ºC durante un periodo no superior a las 72 horas (en función del tipo de miel) y 75ºC durante 4 minutos, respectivamente. De esta manera, se consiguen los objetivos propios de cada etapa (sin alterar en gran medida la calidad de las mieles): con la licuación, hacer la miel más manejable disminuyendo la viscosidad (a valores similares a los conseguidos a 50 y 55ºC), y con la pasteurización, reducir la carga microbiana y los núcleos de cristalización.

El perfil de compuestos volátiles identificados ha permitido clasificar las mieles según su origen botánico, con una diferenciación más evidente entre la miel procedente del néctar de las flores y la de mielada. Aunque la observación individual de cada compuesto volátil refleja que los tratamientos térmicos modifican significativamente los niveles de algunos de ellos, el análisis general de la fracción volátil de cada tipo de miel pone de manifiesto que estos tratamientos apenas modifican globalmente el perfil volátil intrínseco de cada miel. En definitiva, este perfil varía más entre los diferentes tipos de mieles: monoflorales (azahar y romero), milflores y de mielada, que por causa de los tratamientos térmicos industriales (licuación y pasterización) llevados a cabo en condiciones moderadas. Debido a todo esto, si el tratamiento industrial se lleva de forma cuidadosa y bajo condiciones controladas, las alteraciones de flavor/aroma intrínseco de las mieles no deben suponer un problema. Esto es especialmente relevante para mieles de un alto valor comercial, como pueden ser ciertas mieles monoflorales y de mielada.

3. Conclusiones del objetivo general 3.

Una vez seleccionado el HMF como mejor parámetro indicador de la pérdida de frescura de la miel, se modelizó su comportamiento en función del tiempo y la temperatura, abarcando un amplio rango de condiciones de exposición (desde su recolección hasta su envasado). Sin embargo, no fue posible obtener un modelo único para predecir el HMF con suficientemente fiabilidad para ser aplicado a cualquier tipo de miel y en cualquier condición de tratamiento (almacenamiento, licuación y pasterización).

La capacidad predictiva del modelo mejoró (especialmente cuando se consideró una cinética de orden cero) modelizando individualmente cada una de las etapas estudiadas (almacenamiento, licuación y pasteurización). Sin embargo, aun así, no se consiguió obtener la precisión necesaria para que el modelo fuera útil.

La modelización del HMF en cada etapa y de forma individual para cada miel parece ser la solución en la obtención de un modelo útil y suficientemente preciso. No obstante, para ser concluyentes en esta afirmación sería necesario disponer de un mayor número de medidas en todas las condiciones y para aquellas mieles de interés.

Conclusión general de la tesis

La presente tesis doctoral pone en evidencia la importancia del control de las condiciones (tiempo/temperatura) de exposición de la miel, desde que es recolectada hasta que llega al consumidor, como medida fundamental para preservar sus características intrínsecas y poder cumplir con los requisitos legales y comerciales.

Las etapas de licuación y pasterización, que tienen lugar en el proceso industrial de envasado de la miel, no tienen por qué entrañar un riesgo en la pérdida de calidad de la miel; siempre y cuando las empresas las controlen adecuadamente. Este control suele ser habitual como parte de su sistema de autocontrol, ya que son etapas diseñadas para aplicar en ellas un tratamiento térmico específico.

Sin embargo, es la etapa previa al proceso industrial la más problemática en relación a la pérdida de calidad de la miel; no solo por la dificultad de controlar las condiciones ambientales a las que pueden están expuestas las mieles durante este periodo (especialmente durante los meses estivales en los que las temperaturas pueden llegar a ser elevadas durante tiempos prolongados); sino también por el desconocimiento en sí de este problema. Todo esto debería hacer reflexionar al sector apícola sobre la importancia del control (tiempo/temperatura) antes del procesado industrial, incluyendo la manipulación por parte de los apicultores.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. Bibliografía

Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., y Polissiou, M. (2005). "Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds". *Journal of Science and Food Agricultural*, 85(1), 91-97

Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C. y Polissiou, M. (2007). "Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis". Food Chemistry, 100, 396-404.

Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997). Química de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Benedetti, L. y Pieralli, L. (1990). Apicultura. Editorial Omega. Barcelona.

Bueno, F., Guillem, J. V. y Hernández, E. (2005). Jornada técnica de la miel. Fundación Valenciana de estudios avanzados. Valencia.

Calatayud, F. (2002). "Les abelles de mel i els humans, una llarga coexistència amb un futur incert". Mètode science studies journal, 33, 34-72.

Campos, G., Nappi, U., Raslan, D., y Augusti, R. (2000). "Substâncias voláteis em mel floral e mel de melato". Ciencia y Tecnología Alimentaria, 20, 18-22.

Castro-Vazquez, L., Diaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A. y Pérez-Coello, M.S. (2009). "Differentiation on monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis". *Food Chemistry*, 112, 1022-1030.

Castro-Vazquez, L., Diaz-Maroto, M.C. y Pérez-Coello, M.S. (2006). "Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4809–4813.

Castro-Vazquez, L., Diaz-Maroto, M.C., y Pérez-Coello, M.S. (2007). "Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys". *Food Chemistry*, 103, 601–606.

Castro-Vazquez, L., Pérez-Coello, M.S., y Cabezudo, M.D. (2003). "Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques". *Chromatographia*, 57, 227–233.

CODEX STANDARD 12-1981. Norma del Codex para la miel, revisión 2 (2001). Dirección web: http://www.codexalimentarius.org/standards/list-standards/es (Consulta realizada el 16-06-2015).

Comunidad Valenciana. Decreto de 16 de junio de 1998 por el que se aprueba el Reglamento de la Marca de Calidad CV para productos agrarios y agroalimentarios. DOGV, 19 de Diciembre de 1998, núm. 3273.

Comunidad Valenciana. Resolución de 19 de diciembre de 2001 para las Marcas de Calidad "CV" de las mieles de azahar y romero de la Comunidad Valenciana. DOGV, 14 de Enero de 2002, núm. 4167.

De la Fuente, E., Martinez-Castro, I. y Sanz, J. (2005). "Characterization of Spanish unifloral honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Separation Science*, 28, 1093–1100.

De Lorenzo, C. y Guadalix, M. (2002). *La miel de Madrid*. Editorial de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de Madrid. Madrid.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M. y Domenech, E. (2011). "Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys". *Food Research International,* 44, 1504–1513.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M. y Domenech, E. (2014). "Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of Spanish honey. Impact of industrial thermal treatment". *Food Chemistry,* 142, 135–143.

España. Orden ministerial RCL 1986/1975 del 12 de Junio de 1986. Métodos oficiales para el análisis de la miel. BOE, 18 de Junio de 1986, núm. 145, p. 22195-22202.

España. Orden ministerial RCL 1983/1775 del de Agosto de 1983. Norma de calidad para la miel destinada al mercado interior. BOE, 12 de Octubre de 1983, núm. 244, p. 22384-22392.

España. Real Decreto 1049/2003 del 1 de Agosto de 2003. Norma de calidad relativa a la miel. BOE, 5 de Agosto de 2003, núm. 186, p. 30181-30183.

Estupiñán, S., Sanjuán, E., Millán, R. y González, M.A. (1998). "Parámetros de Calidad de la miel I. Microbiología, caracteres fisico-quimicos y de envejecimiento. Revisión". *Alimentaria*, 296, 89-93.

European Food Safety Authority. (2013). Report for 2011 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2013, EN-363. Dirección web: http://www.efsa.europa.eu/publications (consulta realizada 16-04-2014).

Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E. y Verzera, A. (2004). "Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys". *Food Chemistry, 85*(2), 305-313.

FAO (2014). Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Dirección web: http://faostat3.fao.org/home/S (consulta realizada el 18-12-2014).

Ferreres, F., Giner, J. M. y Tomas-Barberán, F. A. (1994). "A comparative study of hesperetin and methyl antranilate as markers of the floral origin of citrus honey". *Journal of Science and Food Agricultural*, 65, 371–372.

Fisher, C. y Scott, T.R. (1997). Food Flovours. Biology and Chemistry. The Royal Society of Chemistry Publisher - Thomas Graham House. Cambridge, UK.

Gilabert, E.J. (1992). *Medida de Color*. Editorial servicio de publicaciones Universidad Politécnica de Valencia. Valencia

Giovanni-Tuberoso, C. I., Jerković, I., Sarais, G., Congiu, F., Marijanović, Z. y Kuś, P. M. (2014). "Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE chromaticity coordinates". *Food Chemistry*, 145, 284-291.

Gómez-Pajuelo, G.A. (2004). "Medida digital del color de la miel y su equivalencia en mm Pfund". *Vida Apícola*, 125, 43-45.

Gómez Pajuelo, A. (1995). "Calidad de las mieles, el contenido de hidroximetilfurfural". *Vida Apícola*, 71, 47-51.

González-Miret, M.L., Ayala, F., Terrab, A., Echávarri, J.F., Negueruela, A.I. y Heredia, F.J. (2007). "Simplified method for calculating colour of honey by application of the characteristic vector method". *Food Research International*, 40(8), 1080-1086

Hammel, Y.A., Mohamed, R., Gremaud, E., LeBreton, M. H. y Guy, P. (2008). "Multiscreening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1177(1), 58-76.

Hutchings, J.B. (1999). *Food color and appearance*. Editorial Aspen publication. Maryland, USA.

INE (2014). Instituto Nacional de Estadística - Anuario estadístico de España 2014. Dirección web: http://www.ine.es/prodyser/pubweb/anuario14/anu14_12agric.pdf (consulta realizada el 26-12-2014).

Juan-Borrás, M., Domenech, E., Conchado, A. y Escriche, I. (2015). "Physicochemical quality parameters at the reception of the honey packaging process: Influence of type of honey, year of harvest and beekeeper". *Journal of Chemistry*, 2015, 1–6.

Juan-Borrás, M., Domenech, E., Hellebrandova, M., Escriche, I. (2014). "Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys". *Food Research International,* 60, 86–94.

Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E. y Escriche, I. (2015). "Correlation between methyl anthranilate level and percentage of pollen in Spanish citrus honey". *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 1690–1696.

Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E. y Escriche, I. (2015). "Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS". *Food Control*, 50, 243-249.

Kadar, M., Juan-Borrás, M., Domenech, E. y Escriche, I. (2011). "Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and Orange blossom honey". *Journal Science of Food Agriculture*. 91, 2768-2776. (2011).

Kondjoyan, N. y Berdagué, J. L. (1996). *A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatics compounds*. Laboratoire Flaveur, France.

Mateo, R. y Bosch-Reig, F. (1998). "Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 46, 393-400.

Mateu Andrés, I., Burgaz Moreno, M. E. y Roselló Caselles, J. (1996). *La apicultura valenciana: Tradición y aprovechamiento*. Ed. Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente. Valencia.

Ororian, M., Amariei, S., Excriche, I. y Gutt, G. (2013). "Rheological aspects of Spanish honeys". *Food and bioprocess technology*, 6(1), 228–241.

Oroian, M. y Escriche, I. (2015). "Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis". *Food Research International.* 74, 10–36.

Overton, S. y Manura, J. (1994). "Flavor and aroma in commercial bee honey. A purge-and-trap thermal desorption technique for the identification and quantification of volatiles and semivolatiles in honey". *American Laboratory* 45, 45-53.

Pérez, R. A., Sanchez-Brunete, R., Calvo, R. M. y Tadeo, J. L. (2002). "Analysis of Volatiles from Spanish Honeys by Solid- phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2633–2637.

Piana, G., Ricciardelli, G. e Isola, A. (1988). *La miel*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid

Radovic, B. S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., y Anklam, E. (2001). "Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey". *Food Chemistry*, 72, 511–520.

Sancho, M. T., Muniategui, S., Huidobro, J. F. y Simal Lozano, J. (1992). "Aging of honey". *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*(1), 134-138.

Serra-Bonvehí, J. (1995). "Characterization of citrus honey (Citrus spp.) produced in Spain". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2053–2057.

Serra-Bonvehí, J., Soliva, M. y Muntané, J. (2000). "Invertase activity in fresh and processed honeys". *Journal of the Science of Food Agriculture*, 80, 507–512.

Serra-Bonvehí, J. y Ventura-Coll, F. (2003). "Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys". *Journal of the Science of Food Agriculture*, 83, 275–282.

Sesta, G., Piana, M.L., Persano-Oddo, L., Lusco, L. y Belligoli, P. (2008). "Methyl anthranilate in Citrus honey. Analytical method and suitability as a chemical marker". *Apidologie*, 39, 334–342.

Soria, A.C., Gonzalez, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I., y Sanz, J. (2004). "Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data". *Food Chemistry*, 85, 121–130.

Soria, A. C., Gonzalez, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I., y Sanz, J. (2005). "Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC–MS". *Journal Science and Food Agriculture*, 85, 817–824.

Terrab, A., González-Miret, L. y Heredia, F. (2004). "Colour characterisation of thyme and avocado honeys by diffuse reflectance spectrophotometry and spectroradiometry". *European Food Research and Technology*, 218(5), 488–492.

Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H. y Ré, E. (2007). "Honey diastase activity modified by heating". *Food Chemistry,* 106, 883–887.

Turhan, I., Tetik, N., Karhan, M., Gurel, F. y Reyhan Tavukcuoglu, H. (2008). "Quality of honeys influenced by thermal treatment". *LWT - Food Science and Technology, 41*(8), 1396–1399.

Verzera, A., Campisi, S., Zappala, M. y Bonaccorsi, I. (2001). "SPME-GC–MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin". *Am lab*, July, 18–21.

Visser, F.R., Allen, J.M. y Shaw, G.J. (1988). "The effect of heat on the volatile fraction from a unifloral honey". Journal of Apicultural Research, 27, 175–181.

Von Der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M. y Martin, P. (2004). "Harmonized methods of melissopalynology". *Apidologie*, 35(1), S18–S25.

White, J. W. y Bryant, V. M. (1996). "Assessing citrus honey quality: Pollen and methyl anthranilate". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 3423–3425.

Wolski, T., Tambor, K., Rybak-Chmielewska, H. y Kędzia. B. (2006). "Identification of honey volatile components by solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)". *Journal of Apicultural Science*, 50(2), 115-126

Wootton, M., Edwards, R. A., y Faraji-Haremi, R. (1978). "Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys". *Journal of Apicultural Research*, 17(3), 167–172.

X. ANEXOS

X. Anexos

1. Anexo I

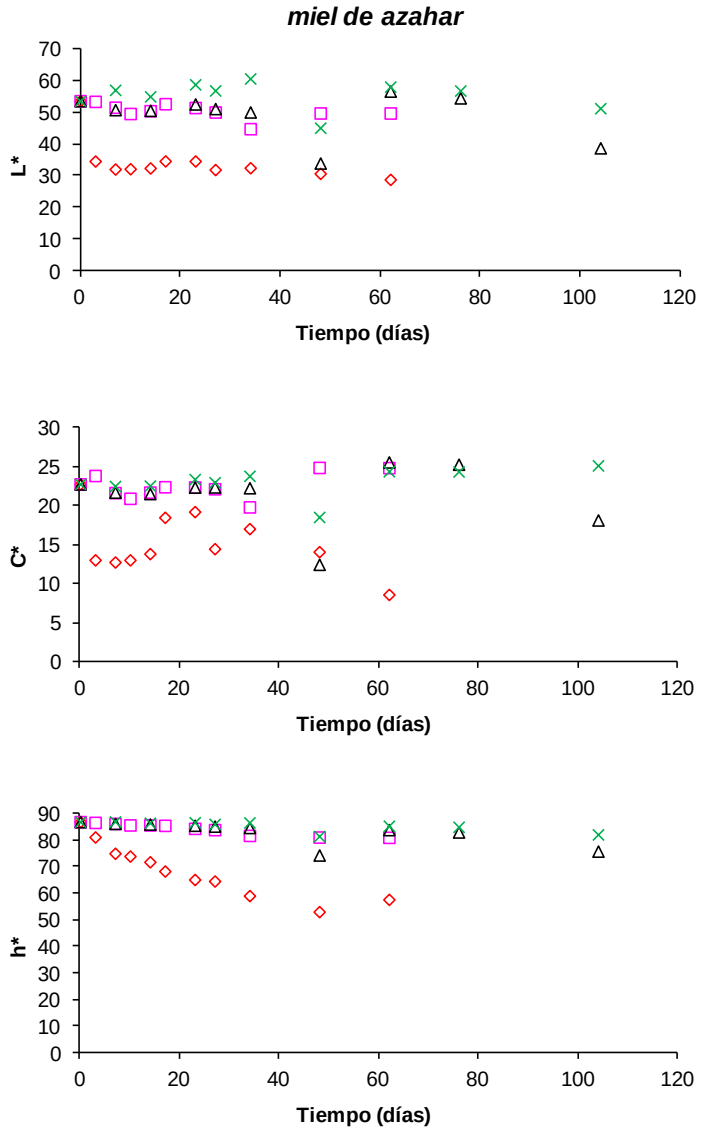


Figura X.1. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de azahar con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 25ºC (x); 30ºC (Δ);35ºC (□);40ºC (◊).

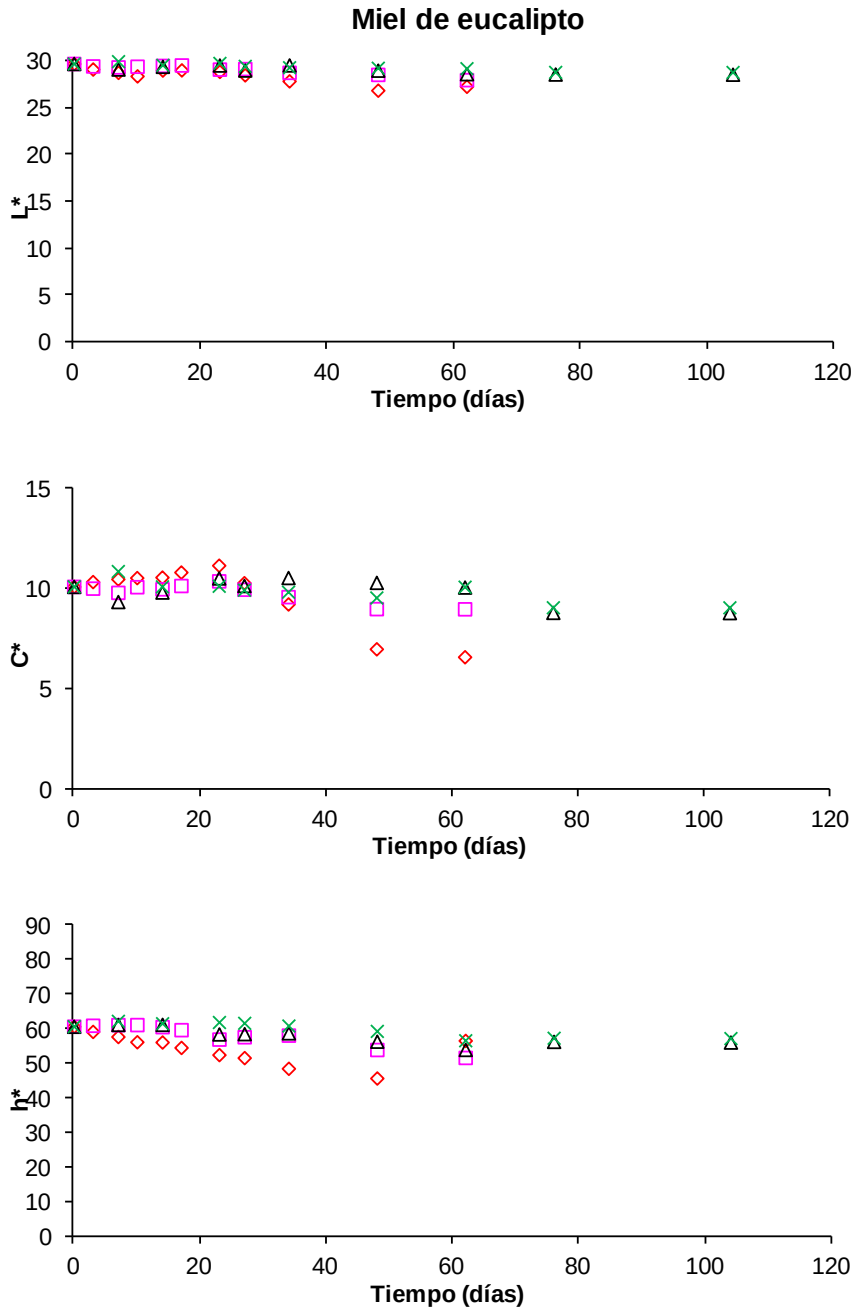


Figura X.2. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de eucalipto con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 25ºC (x); 30ºC (Δ); 35ºC (□); 40ºC (◊).

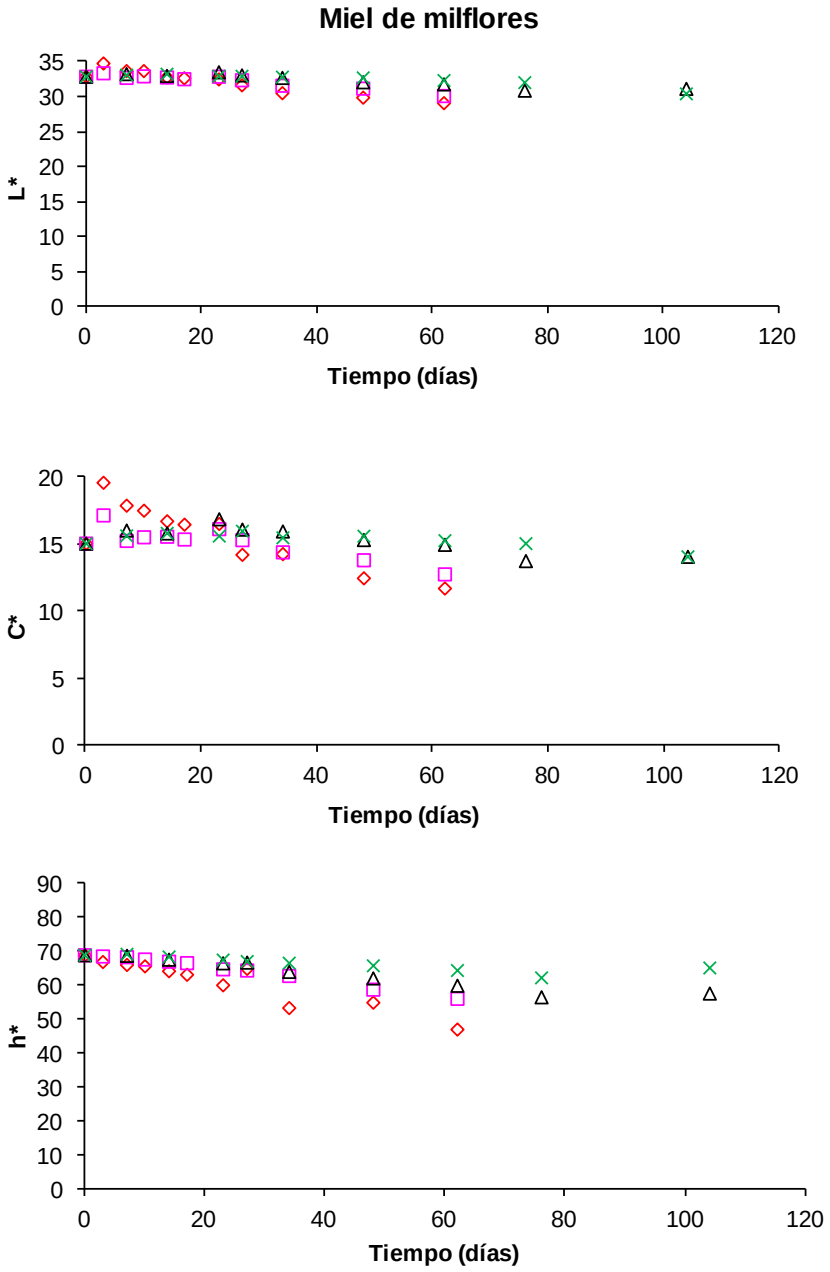


Figura X.3. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de milflores con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 25ºC (x);30ºC (Δ);35ºC (□);40ºC (◊).

2. Anexo II

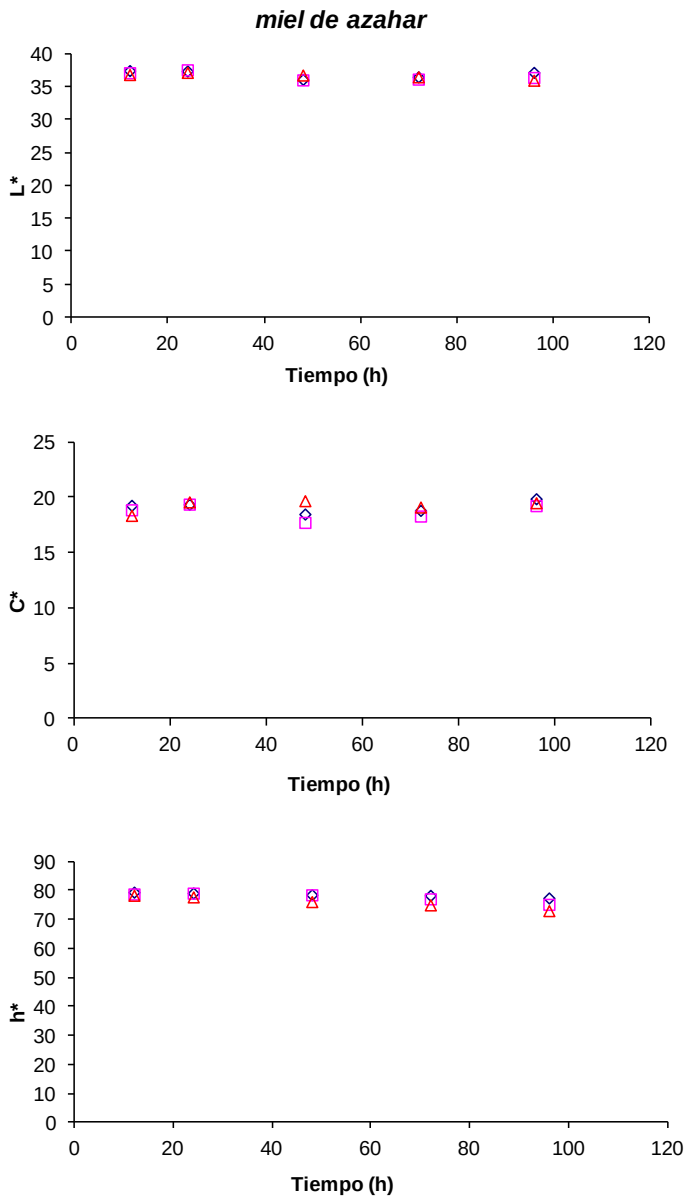


Figura X.4. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de azahar con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 45ºC (◊); 50ºC (□); 55ºC (Δ).

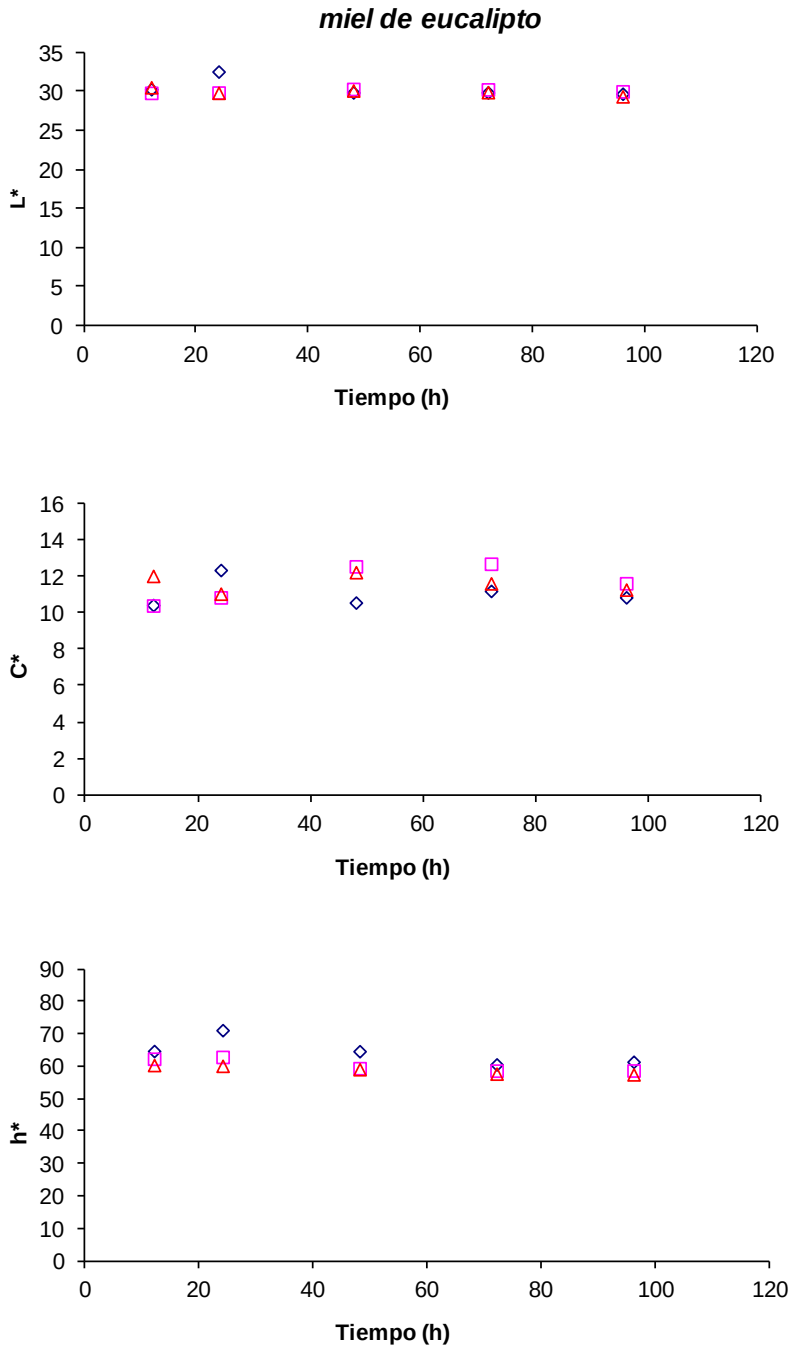


Figura X.5. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de eucalipto con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 45ºC (◊); 50ºC (□); 55ºC (Δ).

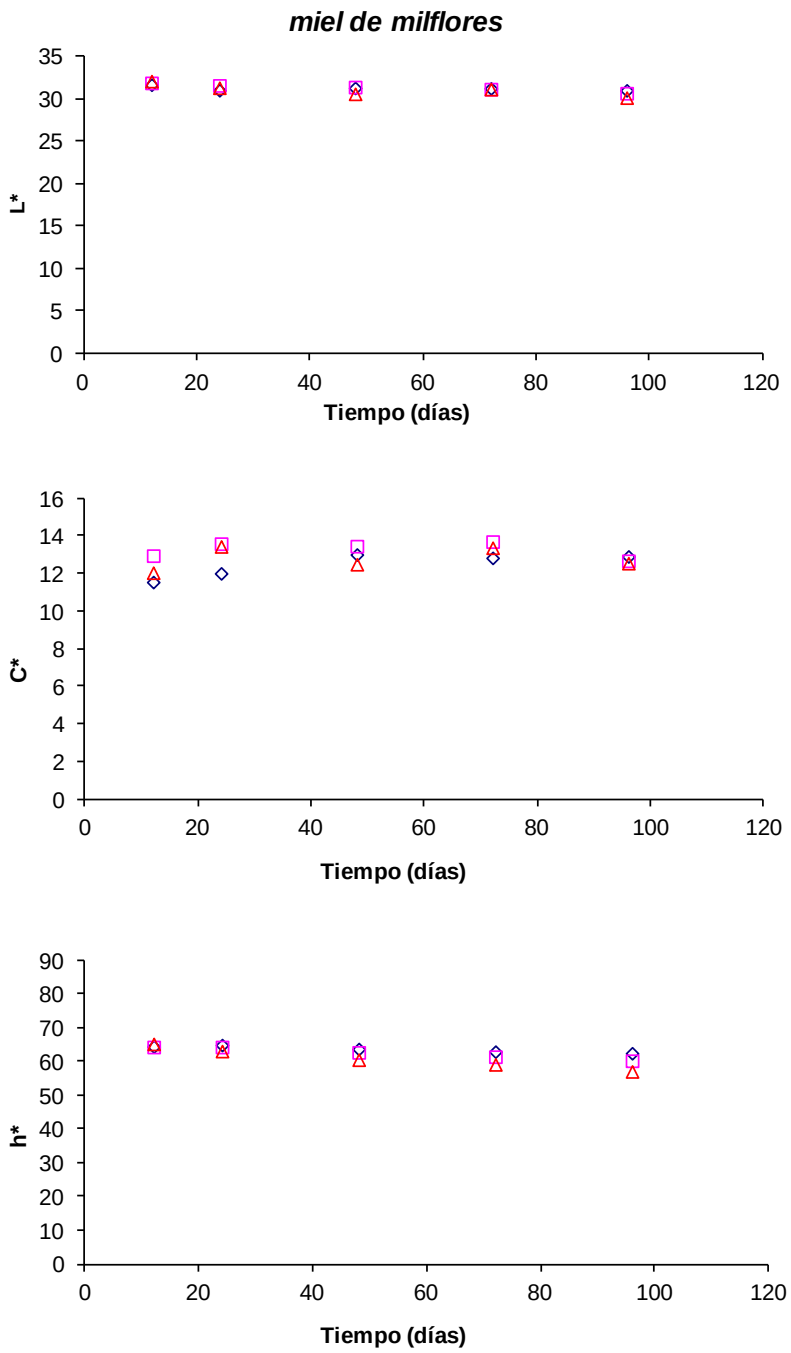


Figura X.6. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de milflores con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 45ºC (◊); 50ºC (□); 55ºC (Δ).

3. Anexo III

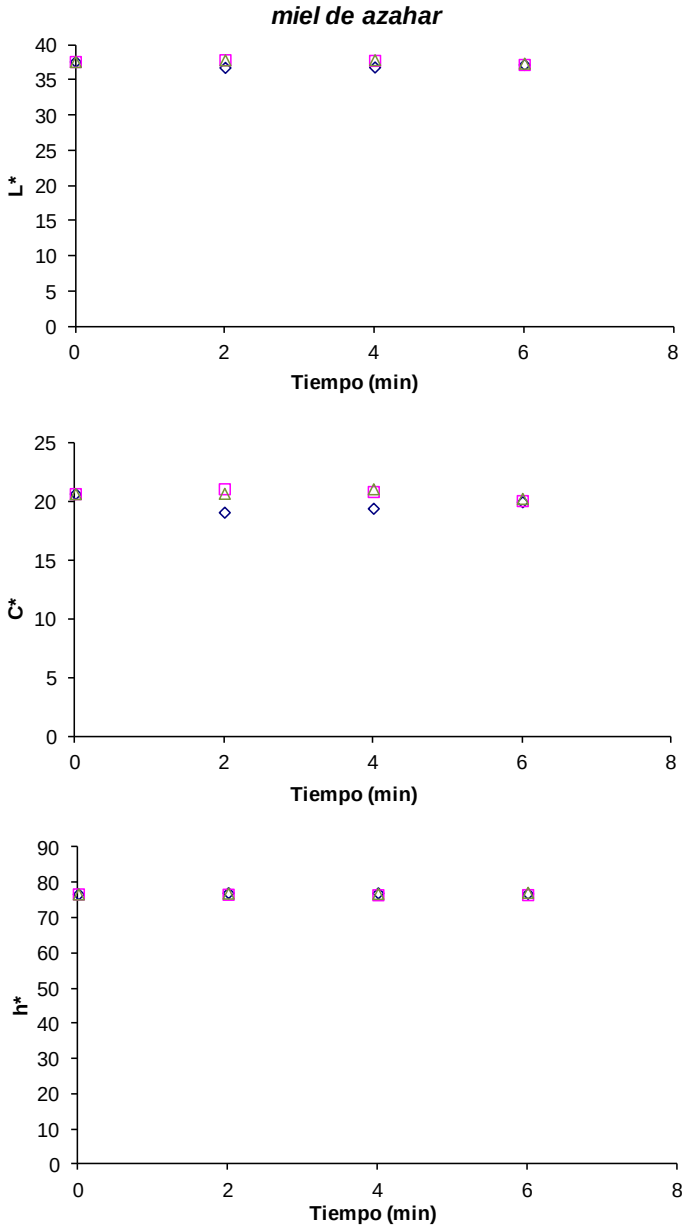


Figura X.7. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de azahar con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 75ºC (◊); 80ºC (□); 85ºC (Δ).

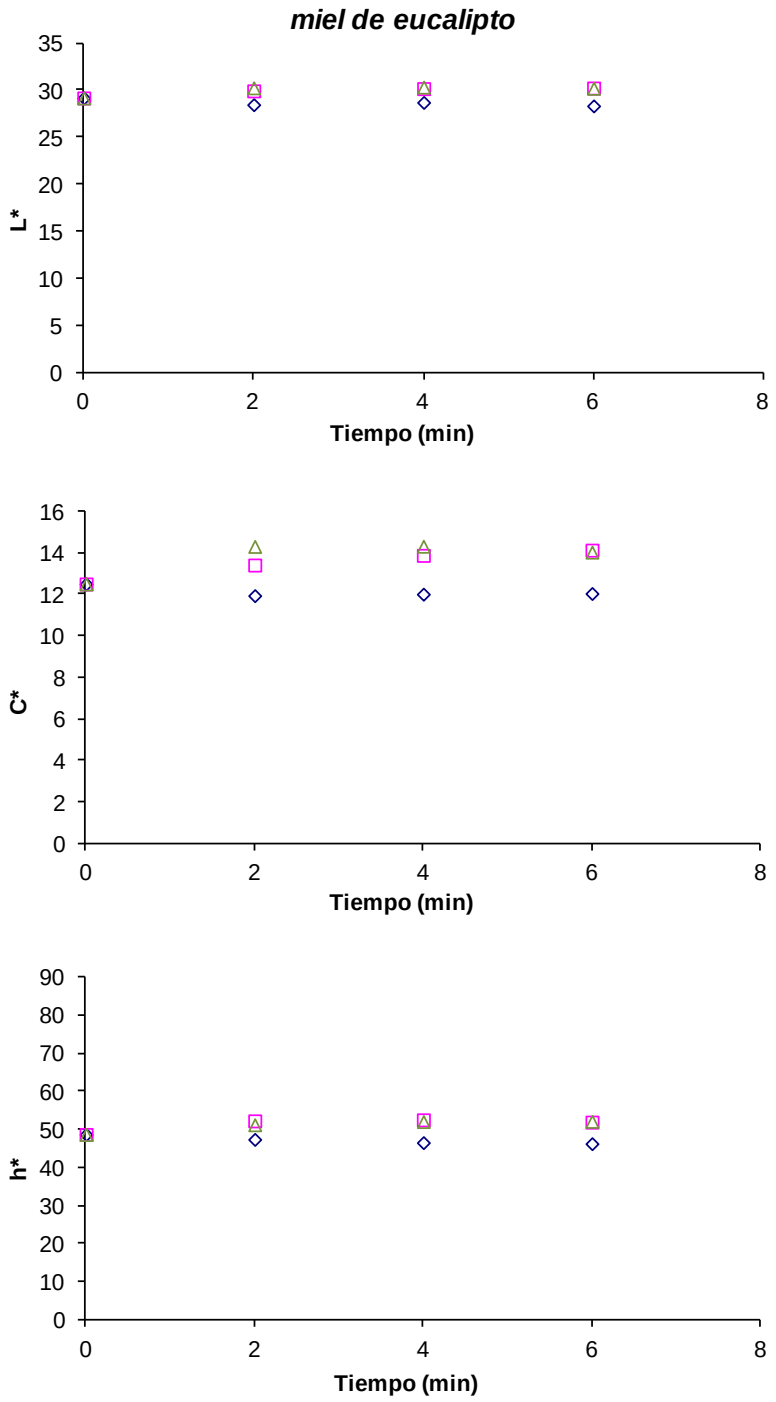


Figura X.8. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de eucalipto con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 75ºC (◊); 80ºC (□); 85ºC (Δ).

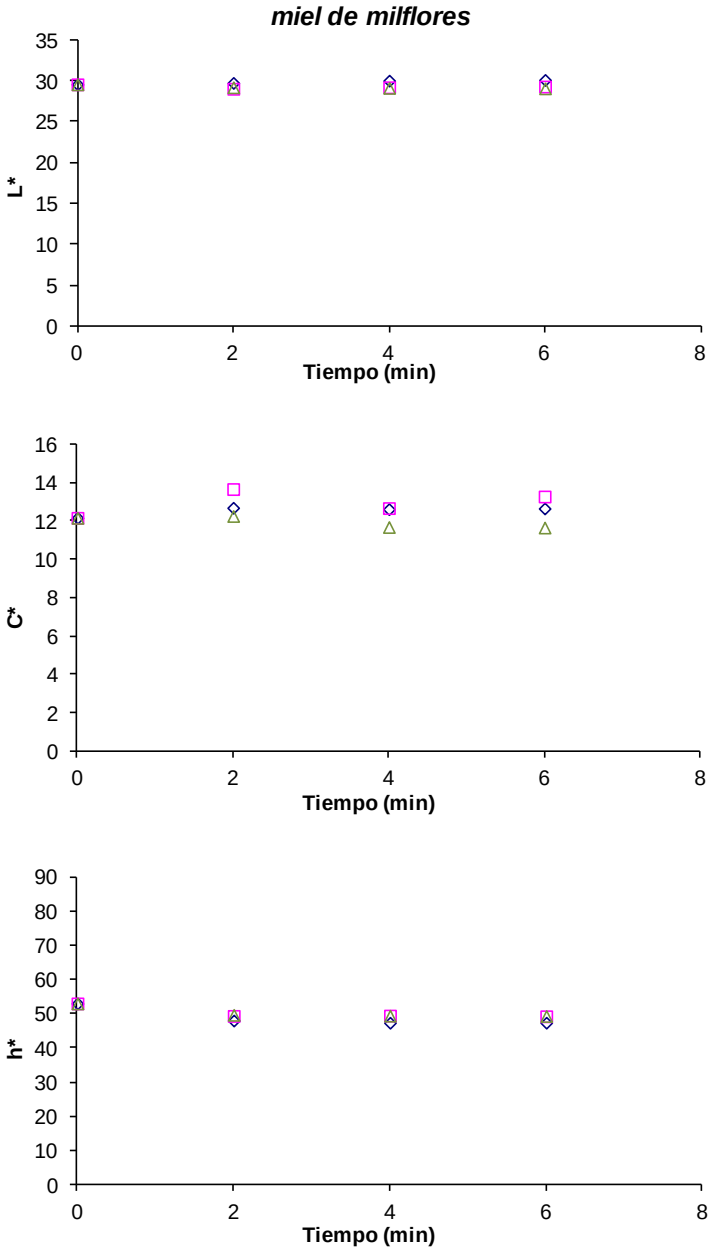


Figura X.9. Evolución de los valores CIE L*a*b* en miel de milflores con el paso del tiempo al ser sometida a temperaturas de 75ºC (◊); 80ºC (□); 85ºC (Δ).