

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA**



**AVANCES METODOLÓGICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DE LA MIEL  
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTHER DE LA FUENTE GARCÍA**



**DPTO. DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL Y QUÍMICA AMBIENTAL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL (C.S.I.C.)**

**Madrid, 2006**

## INDICE

### • INTRODUCCIÓN

0.1. LA MIEL.....	1
0.1.1. Generalidades.....	1
0.1.1.1. Definición.....	1
0.1.1.2. Obtención.....	1
0.1.1.3. Procesado.....	2
0.1.1.4. Características y propiedades de la miel.....	3
0.1.2. Composición química de la miel.....	4
0.1.2.1. Azúcares .....	5
0.1.2.2. Humedad .....	8
0.1.2.3. Compuestos volátiles.....	9
0.1.2.4. Compuestos fenólicos .....	10
0.1.2.5. Compuestos nitrogenados .....	12
0.1.2.6. Ácidos orgánicos.....	13
0.1.2.7. Otros compuestos minoritarios .....	13
0.1.3. Caracterización de la miel según su origen botánico .....	14
0.1.3.1. Clasificación de las mieles.....	14
0.1.3.2. Caracterización de mieles uniflorales .....	14
0.1.4. Evolución de las mieles con el tiempo y la temperatura .....	16
0.1.4.1. Cristalización .....	16
0.1.4.2. Fermentación .....	17
0.1.4.3. Cambios con el tiempo de almacenamiento .....	17
0.1.4.4. Acción del calor .....	18
0.2. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LA MIEL .....	19
0.2.1. Determinación de compuestos volátiles por GC-MS.....	19
0.2.1.1. Preparación de la muestra: fraccionamiento de compuestos volátiles.....	19
0.2.1.1.1. Extracción con disolventes: extracción líquido-líquido y extracción soxhlet.....	20
0.2.1.1.2. Extracción-destilación simultáneas (SDE).....	21
0.2.1.1.3. Análisis del espacio de cabeza: vapor confinado y arrastre con gas inerte.....	21

0.2.1.1.4.	Extracción en fase sólida (SPE).....	23
0.2.1.1.5.	Microextracción en fase sólida (SPME).....	23
0.2.1.2.	Análisis de compuestos volátiles por GC-MS.....	26
0.2.1.2.1.	Condiciones cromatográficas.....	26
0.2.1.2.2.	Identificación de compuestos.....	26
0.2.1.2.3.	Análisis cuantitativo.....	26
0.2.2.	Determinación de carbohidratos en miel por GC.....	29
0.2.2.1.	Preparación de la muestra: derivatización de carbohidratos.....	29
0.2.2.2.	Análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos por GC y GC-MS...31	
0.2.2.2.1.	Condiciones cromatográficas.....	31
0.2.2.2.2.	Identificación de carbohidratos.....	32
0.2.2.2.3.	Análisis cuantitativo de carbohidratos.....	32

**• PRIMERA PARTE: MEJORAS METODOLÓGICAS Y DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE MIELES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

**1. DESARROLLO DE UN MÉTODO ROBUSTO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE CARBOHIDRATOS EN MIEL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

1.1.	INTRODUCCIÓN.....	35
1.1.1.	Problemática de la determinación de disacáridos en miel.....	35
1.1.2.	Modelos matemáticos para el análisis cuantitativo.....	36
1.1.3.	Muestras de referencia para la validación de un método.....	38
1.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.2.1.	Determinación de tiempos de retención y proporciones relativas de los isómeros de TMS-oximas de disacáridos de miel.....	39
1.2.1.1.	Patrones.....	39
1.2.1.2.	Derivatización de disacáridos.....	40
1.2.1.3.	Análisis GC.....	40
1.2.2.	Simulación del perfil cromatográfico de disacáridos de mieles a partir de su composición.....	41

1.2.2.1.	Simulación de una miel típica: intervalos de integración.....	41
1.2.2.2.	Simulación de interferencias.....	42
1.2.3.	Método de cálculo: proceso iterativo.....	42
1.2.3.1.	Gestión de entrada / salida de datos.....	43
1.2.3.2.	Estimación numérica.....	43
1.2.3.3.	Representación gráfica.....	43
1.2.3.4.	Intervalo inicial de concentraciones.....	44
1.2.3.5.	Programa de cálculo.....	44
1.2.4.	Métodos de regresión múltiple.....	44
1.3.	RESULTADOS.....	45
1.3.1.	Contribución de cada disacárido al perfil cromatográfico de la miel.....	45
1.3.2.	Comparación de tres métodos de cálculo en la determinación de disacáridos en muestras de miel simuladas.....	48
1.4.	CONCLUSIONES.....	56
<b>2.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE MONO-, DI- Y TRISACÁRIDOS EN MIELES UNIFLORALES ESPAÑOLAS</b>	
2.1.	INTRODUCCIÓN.....	57
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
2.2.1.	Determinación de carbohidratos en mieles .....	60
2.2.1.1.	Muestras .....	60
2.2.1.2.	Derivatización de las muestras de miel .....	61
2.2.1.3.	Análisis GC-FID .....	61
2.2.1.4.	Análisis GC-MS .....	61
2.2.1.5.	Análisis cuantitativo .....	62
2.2.2.	Detección de interferencias en el perfil de disacáridos .....	63
2.2.3.	Clasificación de mieles uniflorales .....	64
2.3.	RESULTADOS .....	65
2.3.1.	Determinación de carbohidratos en mieles .....	65
2.3.1.1.	Cálculo de los factores de respuesta relativos ( $f_R$ ).....	65



2.3.1.2.	Determinación de monosacáridos y trisacáridos.....	65
2.3.1.3.	Determinación de disacáridos.....	69
2.3.2.	Identificación de interferencias en el perfil de disacáridos en mieles.....	73
2.3.3.	Clasificación de mieles uniflorales.....	76
2.3.3.1.	Coeficientes de correlación.....	76
2.3.3.2.	Regresión lineal múltiple.....	78
2.3.3.3.	Análisis discriminante por pasos.....	79
2.3.3.4.	Aplicación de Análisis discriminante seguido de regresión en la caracterización de compuestos relevantes de un tipo de miel.....	82

### **3. EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS AZÚCARES DE LA MIEL CON EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA**

3.1.	INTRODUCCIÓN.....	87
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
3.2.1.	Muestras.....	88
3.2.2.	Análisis GC.....	88
3.3.	RESULTADOS.....	89
3.3.1.	Almacenamiento.....	89
3.3.2.	Calentamiento.....	91
3.3.3.	Discusión.....	91

- **SEGUNDA PARTE: MEJORAS METODOLÓGICAS Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MIELES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

### **4. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MIEL PARA SU DETERMINACIÓN POR GC-MS**

4.1.	INTRODUCCIÓN.....	95
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	97

4.2.1. Muestras.....	97
4.2.2. Fraccionamiento de compuestos volátiles.....	97
4.2.2.1. Destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido.....	97
4.2.2.2. Microextracción en fase sólida (SPME).....	98
4.2.3. Análisis GC-MS.....	98
4.3. RESULTADOS.....	99
4.4. CONCLUSIONES.....	105

## **5. EMPLEO DE DATOS CUALITATIVOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA MIEL FRACCIONADOS POR SPME**

5.1. INTRODUCCIÓN.....	107
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
5.2.1. Patrones.....	109
5.2.2. Preparación de disoluciones.....	109
5.2.3. Cálculo de la recuperación de los patrones.....	110
5.2.3.1. Preparación de los sistemas modelo.....	110
5.2.3.2. Fraccionamiento de compuestos volátiles por SPME.....	110
5.2.3.3. Análisis GC-MS.....	110
5.2.3.4. Cálculo de los índices de retención de los compuestos.....	110
5.2.4. Modelos que relacionan la recuperación con la estructura molecular mediante parámetros cualitativos.....	110
5.2.5. Métodos de cálculo.....	112
5.3. RESULTADOS.....	113
5.3.1. Determinación de la recuperación de compuestos volátiles.....	113
5.3.2. Estimación de la recuperación mediante los modelos MR1, MR2 y MR3.....	115
5.3.3. Relación entre parámetros cualitativos y recuperación.....	122
5.3.4. Estimación de la recuperación.....	124
5.4. CONCLUSIONES.....	126

## **6. CARACTERIZACIÓN DE MIELES UNIFLORALES ESPAÑOLAS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE SUS COMPUESTOS VOLÁTILES POR SPME-GC-MS.**

6.1. INTRODUCCIÓN.....	127
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	129
6.2.1. Muestras.....	129
6.2.2. Fraccionamiento de compuestos volátiles por SPME.....	129
6.2.3. Análisis GC-MS.....	129
6.2.4. Clasificación de mieles según su origen floral.....	130
6.3. RESULTADOS.....	130
6.3.1. Determinación cualitativa de la composición volátil de mieles de azahar, brezo, romero y eucalipto.....	130
6.3.2. Análisis cuantitativo.....	136
6.3.3. Clasificación de mieles según su origen: análisis estadístico multivariante.....	138
6.3.3.1. Análisis de componentes principales.....	138
6.3.3.2. Regresión lineal múltiple.....	140
6.3.3.3. Análisis discriminante.....	142
6.3.3.4. Aplicación de Análisis discriminante seguido de regresión en la caracterización de compuestos relevantes de un tipo de miel.....	144
6.4. CONCLUSIONES.....	147

## **7. DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE MIELES DE ORIGEN POCO COMÚN**

7.1 INTRODUCCIÓN.....	149
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	150
7.2.1. Muestras.....	150
7.2.2. Fraccionamiento de compuestos volátiles.....	151
7.2.3. Análisis GC-MS.....	151
7.3. RESULTADOS.....	151

7.3.1. Determinación cualitativa de la composición volátil de mieles de origen poco común.....	151
7.3.2. Composición cuantitativa de las mieles estudiadas.....	157
7.4. CONCLUSIONES.....	162

## **8. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LOS COMPONENTES VOLATILES DE LA MIEL**

8.1. INTRODUCCIÓN.....	165
8.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	167
8.2.1. Muestras.....	167
8.2.2. Fraccionamiento de las mieles por SPME.....	167
8.2.3. Análisis GC-MS.....	167
8.3. RESULTADOS.....	168
8.3.1. Almacenamiento.....	168
8.3.2. Calentamiento.....	171
8.4. CONCLUSIONES.....	175

## **9. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS INDICADORES DE EUCALIPTO: 2-HIDROXI-5-METIL-3-HEXANONA Y 3-HIDROXI-5-METIL-2-HEXANONA.**

9.1. INTRODUCCIÓN.....	177
9.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	179
9.2.1. Muestras.....	179
9.2.2. Análisis melisopalinológico.....	179
9.2.3. Análisis SPME-GC-MS.....	179
9.2.4. Síntesis de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona.....	180
9.3. RESULTADOS.....	181
9.3.1. Identificación de compuestos en miel de eucalipto.....	181
9.3.2. Presencia de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona en muestras de miel.....	185
9.4. CONCLUSIONES.....	187

## INTRODUCCIÓN

### 0.1. LA MIEL

#### 0.1.1. GENERALIDADES

##### 0.1.1.1. Definición

Según la Directiva Europea 2001/110/CE, la miel se define como “la sustancia dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmena para que madure”.

##### 0.1.1.2. Obtención

El néctar de las flores, así como las secreciones azucaradas que pueden dar lugar a la miel, están compuestos principalmente por sacarosa y agua. La elaboración de miel consiste esencialmente en una deshidratación del néctar hasta la obtención de un grado de humedad adecuado (inferior al 20%) y en la transformación enzimática de la sacarosa para dar otros azúcares, principalmente glucosa y fructosa (Belitz *et al.*, 1997).

Las abejas melíferas recogen el néctar y lo almacenan en el buche melario, donde es enriquecido con **enzimas** segregadas por distintas glándulas de las abejas (Siddiqui, 1970). Estas enzimas (invertasa, diastasa, glucosa oxidasa etc.) serán las encargadas de la transformación de la sacarosa en los azúcares presentes finalmente en la miel. En este proceso, además, comienza la deshidratación del néctar con la absorción de una parte del agua por las células de la pared del buche.

Al llegar a la colmena las abejas regurgitan las gotas de néctar, que se deslizarán a través de su lengua. El néctar entra en contacto con el aire caliente de la colmena, lo que permite la **evaporación** del exceso de agua que aún contiene. Las enzimas incorporadas al néctar, junto con otras presentes en las glándulas salivales de la abeja, actúan en la

**hidrólisis de la sacarosa** para la obtención de glucosa y fructosa (azúcar invertido). La invertasa participa directamente en esta hidrólisis, si bien es favorecida por la formación de ácidos y peróxido de hidrógeno por la glucosa oxidasa y catalasa, respectivamente. La abeja vuelve a absorber las gotas de “néctar transformado” o “miel en formación” y esta operación se repite sucesivas veces de forma muy rápida hasta alcanzar un contenido en agua del 30-40% (Mauricio, 1975). La miel formada es depositada en las celdillas de la colmena y continúa el proceso de deshidratación gracias a la **aireación** provocada por las abejas (Luis de Villota, 1999).

La **maduración** de la miel seguirá en los días sucesivos, continuando la pérdida de agua hasta alcanzar una humedad inferior al 20% y produciéndose la transformación de los azúcares ya que, además de en la obtención de glucosa y fructosa por hidrólisis de la sacarosa, las enzimas participan en la formación de nuevos enlaces glicosídicos, dando lugar a una variada serie de oligosacáridos (Belitz y Grosch, 1997).

La última etapa consiste en el sellado de las celdillas con cera por parte de las abejas, lo que se conoce como **operculación**, con el fin de proteger la miel del aire y evitar su rehidratación.

### **0.1.1.3. Procesado de la miel**

El procesado de la miel comienza con la **desoperculación** de los panales para la extracción de la miel. La **extracción** puede realizarse por decantación, prensado o centrifugación, y va en ocasiones acompañada de un calentamiento moderado para facilitar el proceso. La miel obtenida, sobresaturada en glucosa, puede ser **filtrada** a presión y **decantada** para eliminar las impurezas. A continuación se procede al **envasado y etiquetado** de acuerdo con lo establecido en la legislación vigente (BOE 186 05/08/2003) y los panales son devueltos vacíos a las colmenas.

El procesado de la miel debe llevarse a cabo de forma cuidadosa, evitando tratamientos como calentamientos excesivos, que provocarían una pérdida en la calidad de la miel.

#### 0.1.1.4. Características y propiedades de la miel

La miel es un producto muy apreciado por el consumidor debido a su valor nutritivo, a sus particulares características organolépticas, al creciente interés por los productos naturales, y a su asociación con el concepto de alimento saludable.

El **valor nutritivo** de la miel es principalmente debido a los azúcares, responsables de su elevado contenido calórico (aproximadamente 300 Kcal/100g).

Sus **características organolépticas**, entre las que destacan su aroma y sabor, están determinadas por su composición química.

Los azúcares, componentes mayoritarios de la miel, son los responsables de su sabor dulce, aunque los ácidos presentes contribuyen también a su sabor, y otros compuestos proporcionan ciertos matices amargos y salados.

Sus particulares aromas son producidos por los compuestos volátiles de la miel. Se trata de un grupo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que se vaporizan fácilmente y alcanzan la mucosa nasal, provocando una intensa sensación olfativa a pesar de encontrarse en concentraciones muy bajas. Aunque algunos compuestos como la (*E*)- $\beta$ -damascenona o el fenilacetaldehído se han asociado con el olor genérico “a miel” (Belitz & Grosch, 1997), lo cierto es que el aroma de la miel viene determinado por una complejísima mezcla de compuestos volátiles, con distinto umbral de detección y presentes en diferentes concentraciones.

Además, a la miel se le han atribuido tradicionalmente propiedades beneficiosas para la salud. Aunque muchas de las propiedades atribuidas no han sido comprobadas científicamente, estos aspectos han despertado un gran interés y numerosos estudios científicos se han centrado en el estudio de la capacidad **antioxidante** de la miel (Ghedolf *et al.*, 2002), de sus propiedades **antibacterianas** (Russell *et al.*, 1990; Weston *et al.*, 1999,2000), o de su posible uso como **prebiótico** (Han-Seung *et al.*, 2005), entre otros.

La capacidad antioxidante se atribuye a distintas sustancias, entre ellas los compuestos fenólicos. Ghedolf (Ghedolf *et al.*, 2002) mostró la existencia de una fuerte correlación ( $R^2=0.963$ ,  $p<0.0001$ ) entre éstos y la capacidad antioxidante de la miel.

Sus propiedades antibacterianas parecen ser debida a dos tipos de agentes antibacterianos; el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la glucosa oxidasa, y el efecto osmótico que ejercen los azúcares (Bogdanov *et al.*, 1997).

El efecto de los oligosacáridos presentes en la miel en el crecimiento de algunas bacterias ha sido estudiado también en los últimos años con el fin de evaluar su posible uso como prebiótico, comparándose con los fructooligosacáridos (FOS) o los galactooligosacáridos (GOS) (Kakiwara, 2001).

Los grupos de compuestos que se estudian en esta memoria (carbohidratos y compuestos volátiles) están muy relacionados con los principales aspectos de calidad de la miel. Su composición en las distintas mieles condicionarán sus características y propiedades, su estabilidad, su comportamiento y, en definitiva, la calidad del producto.

#### 0.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La miel, como producto natural procedente del néctar de las plantas, presenta una composición muy variable, debido a la contribución de la planta, al clima y condiciones ambientales, a las prácticas apícolas y al tipo de procesado al que es sometida (White, 1978).

**Tabla 1.** Composición química de la miel (White, 1978)

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL		
COMPONENTES	Valor medio	Intervalo
Agua (%)	17.2	13.4-22.9
<b>Azúcares</b>		
Fructosa (%)	38.2	27.3-44.3
Glucosa (%)	31.3	22.0-40.8
Oligosacáridos (%)	10.1	3.1-17.7
<b>Nitrógeno (%)</b>	0.04	0-0.13
<b>Minerales (%)</b>	0.17	0.02-1-03
<b>Ácidos</b>		
Acidez libre (mval/kg)	22	6.8-47.2
Lactona (mval/kg)	7.1	0-18.8
Acidez total (mval/kg)	29.1	8.7-59.5
pH	3.9	3.4-6-1
<b>Índice de Diastasas</b>	20.8	2.1-61.2
<b>Otros (%)</b>	3.1	0-13.2



Como se observa en la tabla 1, la miel está compuesta mayoritariamente por **azúcares**, que suponen en torno al 75% de su peso total, y en menor proporción por **agua** (menos del 20%). Los componentes minoritarios son **compuestos nitrogenados, minerales, vitaminas, ácidos, compuestos fenólicos** y otros **compuestos orgánicos**, entre los que destacan los **compuestos volátiles** responsables del aroma de la miel .

#### 0.1.2.1. Azúcares

La miel es el producto natural que contiene una mayor variedad de azúcares. Los mayoritarios son los monosacáridos glucosa y fructosa, debido a la hidrólisis enzimática de la sacarosa del néctar. Sin embargo, las enzimas también originan la formación de nuevos enlaces glicosídicos, obteniéndose una variada serie de disacáridos, trisacáridos y otros oligosacáridos constituidos principalmente por unidades de glucosa y fructosa (White, 1978).

- **Monosacáridos**

Los monosacáridos fructosa y glucosa suponen aproximadamente un 69% del peso total de la miel (White, 1978) y un 85% de los sólidos totales (Doner, 1977). Salvo raras excepciones, las concentraciones de fructosa son superiores a las de glucosa (Tabla 1) (White, 1978), aunque la relación entre ambas es variable y parece relacionada con el origen de la miel (Mateo *et al.*, 1996)

Además se han encontrado trazas de otros monosacáridos como galactosa (Val *et al.*, 1998) y xilosa (Terrab *et al.*, 2001), polialcoholes (tabla 2), y carbohidratos ácidos formados por oxidación, como el ácido glucónico (Siddiqui, 1970).

**Tabla 2.** Azúcares alcoholes identificados en la miel.

ALDITOLES	CITAS
<b>Perseitol (Aguacate)</b>	Dvash (2002)
<b>Quercitol</b>	Sanz (2003)
<b>1-metil-muco-inositol</b>	Sanz (2003)
<b>Pinitol</b>	Sanz (2003)
<b>Muco-inositol</b>	Sanz (2003)
<b>Myo-inositol</b>	Horváth (1998), Sanz (2003)

- **Oligosacáridos.**

Durante mucho tiempo la miel se consideró como una mezcla de D-glucosa, D-fructosa y sacarosa. El desarrollo de las técnicas cromatográficas evidenció la presencia de otros azúcares, entre los que destaca una variada serie de disacáridos y trisacáridos formados por las enzimas tras hidrolizar la sacarosa. Hasta el momento se han identificado en miel un total de 16 disacáridos, 13 trisacáridos y otros oligosacáridos de más de 3 unidades, como se muestra en la siguiente tabla (tabla 3).

**Tabla 3.** Oligosacáridos identificados en miel por distintos autores.

CARBOHIDRATOS	ESTRUCTURA	CITA*
<b>DISACÁRIDOS</b>		
Sacarosa	$\alpha$ -glc (1-2) $\beta$ -fru	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15
$\alpha,\alpha$ -trehalosa	$\alpha$ -glc (1-1) $\alpha$ -glc	2, 3, 11, 15
$\alpha,\beta$ -trehalosa	$\alpha$ -glc (1-1) $\beta$ -glc	1, 2, 4, 6, 8, 9, 13, 14, 15, 16
Trehalulosa	$\alpha$ -glc (1-1) fru	15
Celobiosa	$\beta$ -glc (1-4) glc	3, 9, 11, 15
Maltulosa	$\alpha$ -glc (1-4) fru	1, 2, 3, 4, 8, 11, 13, 14, 15
Laminaribiosa	$\alpha$ -glc (1-3) glc	1, 2, 3, 4, 14, 15
Leucrosa	$\alpha$ -glc (1-5) fru	1
Nigerosa	$\alpha$ -glc (1-3) glc	1, 2, 3, 4, 8, 10, 12, 15, 16
Turanosa	$\alpha$ -glc (1-3) fru	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16
Maltosa	$\alpha$ -glc (1-4) glc	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
Kojibiosa	$\alpha$ -glc (1-2) glc	1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13, 15
Palatinosa	$\alpha$ -glc (1-6) fru	1, 3, 4, 8, 9, 11, 14, 15
Gentiobiosa	$\beta$ -glc (1-6) glc	1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16
Melibiosa	$\alpha$ -gal (1-6) glc	1, 6, 8, 9, 12, 14, 15
Isomaltosa	$\alpha$ -glc (1-6) glc	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
<b>TRISACÁRIDOS</b>		
1-Kestosa	$\alpha$ -glc (1-2) $\beta$ -fru (1-2) $\beta$ -fru	1, 2, 3, 4, 14, 15
3- $\alpha$ -Isomaltosilglucosa	$\alpha$ -glc (1-6) $\alpha$ -glc (1-3) glc	1, 2
Centosa	$\alpha$ -glc (1-4) $\alpha$ -glc (1-2) glc	1, 2
Erlosa	$\alpha$ -glc (1-4) $\alpha$ -glc- $\beta$ -fru	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16
Isomaltotriosa	$\alpha$ -glc (1-6) $\alpha$ -glc (1-6) glc	1, 2, 3, 4, 9, 15, 16
Isopanosa	$\alpha$ -glc (1-4) $\alpha$ -glc (1-6) glc	1, 2, 3, 4
Maltotriosa	$\alpha$ -glc (1-4) $\alpha$ -glc (1-4) glc	1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 14, 15, 16
Melecitosa	$\alpha$ -glc (1-3) $\beta$ -fru (2-1)- $\alpha$ -glc	2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
Panosa	$\alpha$ -glc (1-6) $\alpha$ -glc (1-4) glc	1, 2, 3, 4, 9, 10, 12, 14, 15, 16
6-kestosa	glc (1-2) $\beta$ -fru (6-2) $\beta$ -fru	15
Neokestosa	$\beta$ -fru (2-6) $\alpha$ -glc (1-2) $\beta$ -fru	14, 15
Rafinosa	$\alpha$ -gal (1-6) $\beta$ -glc (1-2) $\beta$ -fru	1, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 14
Teanderosa	$\alpha$ -glc (1-6) $\alpha$ -glc- $\beta$ -fru	1, 2, 3, 4, 10

CARBOHIDRATOS	ESTRUCTURA	CITA*
<b>OLIGOSACÁRIDOS</b>		
Isomaltotetraosa	$\alpha$ -glc (1-6) [ $\alpha$ -glc (1-6)] <sub>2</sub> glc	1, 2
Isomaltopentaosa	$\alpha$ -glc (1-6) [ $\alpha$ -glc (1-6)] <sub>3</sub> glc	1, 2

* CITA	AUTOR	AÑO
(1)	Siddiqui	1970
(2)	Doner	1977
(3)	Low	1988
(4)	Swallow <i>et al.</i>	1990
(5)	Földházi <i>et al.</i>	1994
(6)	Serra-Bonhevi <i>et al.</i>	1995
(7)	Pérez-Arquillué <i>et al.</i>	1995
(8)	Mateo <i>et al.</i>	1996
(9)	Körvath <i>et al.</i>	1997
(10)	Weston <i>et al.</i>	1999
(11)	Gómez-Bárez	2000
(12)	Costa <i>et al.</i>	2000
(13)	Terrab <i>et al.</i>	2001
(14)	Cotte <i>et al.</i>	2004
(15)	Sanz <i>et al.</i>	2004
(16)	Nozal <i>et al.</i>	2005

Los oligosacáridos están formados por unidades de glucosa, fructosa o glucosa y fructosa unidos por enlaces glicosídicos en distintas posiciones. Melibiosa y rafinosa contienen galactosa, lo que podría explicarse por la presencia de pequeñas cantidades de galactosa en el néctar (Battaglini *et al.*, 1973, Val *et al.*, 1998).

Aunque en el néctar parecen estar presentes pequeñas concentraciones de algunos oligosacáridos, como maltosa (White Jr., 1978), y otros, como melezitosa y 1-kestosa son constituyentes de las secreciones azucaradas de las plantas que dan origen a las mieles de mielada (Doner, 1977; Siddiqui, 1970), la formación de la mayor parte de oligosacáridos se produce por acción enzimática.

Se ha demostrado que la invertasa de la miel, además de ser responsable de la hidrólisis de la sacarosa con la formación de fructosa y glucosa, es una  $\alpha$ -glucosidasa (White *et al.*, 1953), es decir, tiene capacidad de transferir unidades  $\alpha$ -glucosil de la sacarosa a aceptores de estos grupos, lo que explica la presencia de muchos oligosacáridos presentes en la miel (White, 1953). Esta enzima parece proceder de tanto de la planta como de la abeja (Maurizio,

1975), aunque sería la última la que presentaría una mayor actividad (Huber *et al.*, 1976; Echigo *et al.*, 1973).

La transferencia de grupos  $\beta$ -glucosil para la obtención de oligosacáridos como gentiobiosa o laminaribiosa no ha sido explicada tan claramente, aunque parece probable la presencia de alguna  $\beta$ -glucosidasa que origine estos compuestos en la miel.

Las concentraciones de los distintos disacáridos y trisacáridos en la miel son variables, debido al origen botánico de la miel, a las condiciones climáticas, a su procesado y a su almacenamiento de la miel. En general, los disacáridos mayoritarios son maltosa, isomaltosa, turanosa y nigerosa, cuyas concentraciones suelen oscilar entre 10 y 50 mg/g de miel (Gómez-Báñez *et al.*, 2000; Nozal *et al.*, 2005; Sanz *et al.*, 2004; Cotte *et al.*, 2004; Foldhazi *et al.*, 1994; Da Costa *et al.*; 2000). Otros presentan contenidos muy variables en las distintas mieles. Es el caso de la sacarosa, cuyo valor en las mieles de cítricos suele ser significativamente superior a los del resto de las mieles (en torno a 15 mg/g en mieles de cítricos recién recolectadas frente a valores muy inferiores a 5 mg/g en otras mieles) (Serra-Bonheví, 1995), o de algunos trisacáridos como melecitosa, que varía desde valores prácticamente nulos en mieles florales hasta concentraciones del orden de los oligosacáridos mayoritarios en mielatos (61-66 mg/g) (Foldhazi *et al.*, 1994; da Costa *et al.*, 2000; Nozal *et al.*, 2005)

El conjunto de disacáridos y trisacáridos en miel presenta un especial interés debido a su elevado número, a su concentración relativamente alta, lo que permite su empleo para la caracterización de muestras de miel, y a su posible uso como nutracéuticos (Sanz *et al.*, 2005) Gran parte de esta memoria está dedicada a su estudio con una doble finalidad, la mejora de los métodos analíticos para su determinación y la caracterización de esta fracción en mieles uniflorales.

### **0.1.2.2. Humedad**

La miel se encuentra dentro de los alimentos de humedad intermedia, con un contenido en agua generalmente inferior al 18.6%. Este parámetro varía en función del clima, la humedad ambiental, la flora, la abundancia de la fuente de néctar y las prácticas apícolas

empleadas, y resulta de vital importancia para la estabilidad de la miel frente a la fermentación y la cristalización (White Jr., 1978).

La Directiva Europea 110/2001/CE relativa a la miel establece el contenido general de humedad en un máximo del 20%. Por encima de este valor la miel es muy susceptible de sufrir fermentación por las levaduras osmófilas presentes en el producto.

### 0.1.2.3. Compuestos volátiles

Los componentes volátiles de la miel, presentes en ella en reducidas concentraciones como un complejo grupo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular y distinta naturaleza química, tienen suma importancia en sus características organolépticas al ser los determinantes de su aroma.

Aunque el olor genérico “a miel” es causado por un grupo de compuestos volátiles comunes a todas las mieles (Maga, 1983), sus distintas concentraciones y la existencia de algunos compuestos específicos de ciertos orígenes, confieren a las mieles diversos matices aromáticos que permiten su diferenciación.

Los compuestos volátiles presentes más comúnmente en la miel pueden clasificarse según su estructura química en:

- **Aldehidos:** fenilacetaldehído, benzaldehído, hexanal, octanal, aldehidos de lila, etc.
- **Cetonas:** acetona, 2-butanona, diacetilo (2,3-butanodiona), 2- y 3-pentanona, etc.
- **Alcoholes:** etanol, metilbutanol, 2,3-butanodiol, alcohol bencílico, 2-feniletanol, etc.
- **Ésteres:** acetato de etilo, butanoato de metilo, antranilato de metilo, entre otros.
- **Hidroxicetonas:** 1-hidroxi-2-propanona y acetoina (3-Hidroxi-2-butanona), etc.
- **Compuestos con azufre:** sulfuro, disulfuro, trisulfuro de dimetilo, etc.
- **Derivados del furano:** furfural, 1-(2-furanil)-etanona, alcohol furfurílico y otros.
- **Hidrocarburos alifáticos** (octano, nonano) **y aromáticos** (tolueno, naftaleno etc.).

- **Compuestos terpénicos** de bajo peso molecular: Son compuestos naturales formados por unidades de 2-metilbutadieno, presentes en los aceites esenciales de muchas plantas, por lo que su presencia en la miel se asocia con la procedencia floral. Algunos de los presentes habitualmente en miel son: limoneno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, linalol, óxidos de linalilo, nerol, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, cineol, etc.

La mayoría de los compuestos volátiles presentes en la miel proceden de las flores o plantas que las originan, lo que da lugar a notables diferencias entre mieles de distinto origen. Las condiciones de procesado y almacenamiento pueden provocar cambios en su composición, lo que afectará también a sus características aromáticas.

#### 0.1.2.4. Compuestos fenólicos

Los ácidos fenólicos y los flavonoides constituyen prácticamente la totalidad de los compuestos fenólicos en miel. Estos compuestos proceden del metabolismo de las plantas (Joerg *et al.*, 1992; Anklam, 1998), por lo que su composición dependerá en gran medida del origen botánico de las mismas (Amiot *et al.*, 1989).

Los **flavonoides** parecen ser los compuestos fenólicos más comunes en mieles florales (Amiot *et al.*, 1989). Estos compuestos se encuentran en la naturaleza normalmente como glicosidos. Sin embargo, en mieles solo se han identificado las agliconas, probablemente debido a la hidrólisis del glicósido por parte de las enzimas de la miel. La tabla 4 recoge los flavonoides identificados en miel hasta el momento.

**Tabla 4.** Flavonoides identificados en miel por varios autores (D'arcy, 2005)

FLAVONOIDES	
COMPUESTOS	CITAS
<b>Apigenina</b>	Berahia <i>et al.</i> , 1993; Ferreres et al, 1994 a,b
<b>Crisina</b>	Berahia <i>et al.</i> , 1993; Ferreres et al, 1994 a,b
<b>Eriodictiol</b>	Delgado <i>et al.</i> , 1994; Ferreres et al, 1994 a,b
<b>Flavona</b>	Berahia <i>et al.</i> , 1993
<b>7-OH Flavanonol</b>	Berahia <i>et al.</i> , 1993
<b>Galangina</b>	Sabatier <i>et al.</i> , 1992; Ferreres <i>et al.</i> , 1996 b
<b>3-OMe Galangina</b>	Berahia <i>et al.</i> , 1993; Martos <i>et al.</i> , 1997
<b>Genkwanina</b>	Ferreres <i>et al.</i> , 1991, 1992, 1993, 1994 a,b

FLAVONOIDES	
COMPUESTOS	CITAS
Hesperetina	Soler <i>et al.</i> , 1995; Andrade <i>et al.</i> , 1997
Isoramnetina	Ferreres <i>et al.</i> , 1991; Gil <i>et al.</i> , 1995
Kaemferol	Amiot <i>et al.</i> , 1989; Ferreres <i>et al.</i> , 1998
8-OMe Kaemferol	Ferreres <i>et al.</i> , 1994 a,b; Martos <i>et al.</i> , 1997
3-OMe Kaemferol	Ferreres <i>et al.</i> , 1991, 1992, 1993, 1994 d
Luteolina	Ferreres <i>et al.</i> , 1991, 1992, 1993, 1994 a,b
7-OMe Luteolina	Ferreres <i>et al.</i> , 1991, 1992, 1993, 1994 a,b
Miricetina	Delgado <i>et al.</i> , 1994; Soler <i>et al.</i> , 1995
Miricetina 3-OMe	Ferreres <i>et al.</i> , 1994 a, 1996 a
Miricetina 3'-OMe	Tomás-Barberán, 1993 a
Miricetina 3,7,4', 5'-OMe	Martos <i>et al.</i> , 1997
Naringenina	Amiot <i>et al.</i> , 1989; Ferreres <i>et al.</i> , 1994b
Pinobanksina	Ferreres <i>et al.</i> , 1996b; Siess <i>et al.</i> , 1996
3-Acetato de pinobanksina	Martos <i>et al.</i> , 1997
Pinocembrina	Sabatier <i>et al.</i> , 1992; Ferreres <i>et al.</i> , 1996 b
Pinostrobin	Berahia <i>et al.</i> , 1993; Martos <i>et al.</i> , 1997
Quercetina	Amiot <i>et al.</i> , 1989; Ferreres <i>et al.</i> , 1994a,b
3-OMe Quercetina	Ferreres <i>et al.</i> , 1991, 1992, 1993, 1994 a,b
3,7-OMe Quercetina	Gil <i>et al.</i> , 1995; Martos <i>et al.</i> , 1997
3,3'-OMe Quercetina	Ferreres <i>et al.</i> , 1991, 1992; Gil <i>et al.</i> , 1995
7,3'-OMe Quercetina	Ferreres <i>et al.</i> , 1994 a,d; Gil <i>et al.</i> , 1995
Ramnetina	Amiot <i>et al.</i> , 1989
Tectocrisina	Berahia <i>et al.</i> , 1993; Gil <i>et al.</i> , 1995
Tricetina	Ferreres <i>et al.</i> , 1994a

Los principales **ácidos fenólicos** presentes en miel son ácidos benzoicos y sus ésteres, y ácidos cinámicos y sus ésteres (Sabatier *et al.*, 1992). Los distintos ácidos fenólicos encontrados en la miel como tales o como ésteres se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Ácidos fenólicos identificados en miel por distintos autores.

ÁCIDOS FENÓLICOS	
COMPUESTOS	CITAS
Benzoico	Steeg <i>et al.</i> (1987), Horváth <i>et al.</i> (1998), Anklam (1998)
Cafeico	Steeg <i>et al.</i> (1988), Yao (2002)
Cinámico	Steeg <i>et al.</i> (1988)
Clorogénico	Jörg <i>et al.</i> (1992), Yao (2002)
m-Cumárico	Jörg <i>et al.</i> (1992)
o-Cumárico	Steeg <i>et al.</i> (1988), Yao (2002)

ÁCIDOS FENÓLICOS	
COMPUESTOS	CITAS
<b>p-Cumárico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Joerg <i>et al.</i> (1993)
<b>2,4-Dihidroxibenzoico</b>	Horváth <i>et al.</i> (1998)
<b>2,6-Dihidroxibenzoico</b>	Horváth <i>et al.</i> (1998)
<b>Elágico</b>	Ferreres <i>et al.</i> , 1994,1996, Yao (2002)
<b>Estéarico</b>	Horváth <i>et al.</i> (1998)
<b>Fenilacético</b>	Steeg <i>et al.</i> (1987), Anklam (1998)
<b>b-Fenilacético</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Anklam, 1998
<b>Fenilpirúvico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>Fenilpropiónico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Anklam, 1998
<b>Ferúlico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Joerg <i>et al.</i> (1993), Yao (2002)
<b>Gálico</b>	Jörg <i>et al.</i> (1992), Yao (2002)
<b>Gentísico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Horváth <i>et al.</i> (1998), Anklam 1998
<b>3-Hidroxibenzoico</b>	Jörg <i>et al.</i> (1992)
<b>4-Hidroxifenilacético</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>4-Hidroxifenilpropiónico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>4-Hidroxifenilpirúvico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>Homogentísico</b>	Cabras (1999), Scanu (2005)
<b>Mandélico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Anklam, 1998
<b>Protocatechuico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>Salicílico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>Sinápico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988)
<b>Siríngico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Anklam (1998), Joerg <i>et al.</i> (1993), Yao (2002)
<b>Vanillico</b>	Steeg <i>et al.</i> (1988), Joerg <i>et al.</i> (1993)

Su relación con la capacidad antioxidante de la miel (Ghedolf *et al.*, 2002), y su dependencia del origen floral (Ferreres *et al.*, 1993, 1996) han provocado un gran interés por el estudio de estos compuestos, tanto para su caracterización en distintas mieles como para su clasificación según el origen botánico de las mismas.

#### 0.1.2.5. Compuestos nitrogenados

Los compuestos con nitrógeno suman aproximadamente un 0.5% del peso de miel. De las **proteínas** presentes destacan las **enzimas** como la  $\alpha$ -glucosidasa, invertasa (fructosil transferasa), diastasas ( $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas), glucosa-oxidasa, catalasa y fosfatasa ácida, responsables de muchas de las transformaciones que tienen lugar durante la elaboración de la miel. También se encuentran en la miel **aminoácidos libres** (119 mg/100g de peso seco)



entre los que destacan la prolina (50-85% del total), la fenilalanina, la asparagina y el ácido glutámico (Belitz y Grosh, 1987).

#### **0.1.2.6. Ácidos orgánicos**

El ácido principal de la miel es el ácido glucónico (Siddiqui, 1970; Serra Bonhevi *et al.*, 2004) formado por oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa. Se encuentra en equilibrio con la gluconolactona (Belitz y Grosch, 1987), por lo que existen tres medidas de acidez distintas: acidez libre, acidez lactónica y acidez total.

Otros ácidos carboxílicos presentes en la miel son acético, cítrico, succínico, fórmico, fumárico, málico, oxálico, pirúvico, etc.

La acidez contribuye junto con la baja humedad de la miel, a su estabilidad microbiológica. La miel en disolución suele presentar valores de pH entre 3.5 y 4.5 (Louveau, 1985), siendo los valores de las mieles de néctar generalmente inferiores a los que presentan los mielatos.

#### **0.1.2.7. Otros compuestos minoritarios.**

El contenido en **minerales** (0.2-1.03%) depende fundamentalmente del clima, de las condiciones ambientales y la contribución de la planta (White, 1978). El elemento mayoritario es el potasio, seguido de otros como calcio, sodio, hierro, magnesio etc.

Las **vitaminas** están en una concentración tan baja en la miel que apenas tienen importancia nutricional. Destacan el ácido ascórbico y vitaminas del grupo B.

Los **lípidos** también están presentes en una proporción muy pequeña. Algunos de los ácidos grasos identificados han sido el ácido palmítico, oleico, láurico, esteárico, linoleico, etc.

Otros componentes minoritarios presentes normalmente en la miel son pequeñas cantidades de **polen** y de **cera**. El análisis del polen es el método tradicionalmente utilizado para la determinación del origen floral de la miel.

### 0.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MIEL SEGÚN SU ORIGEN BOTÁNICO.

#### 0.1.3.1. Clasificación de las mieles.

Atendiendo a su origen botánico, las mieles se pueden clasificar en:

- **Miel de flores:** Es la miel obtenida principalmente a partir del néctar de flores. Podemos distinguir:

- Miel uniflorales: Son las mieles procedentes mayoritariamente del néctar de flores de la misma especie o de especies muy próximas.

- Miel de mezcla o multiflorales: Se denominan así todas las mieles procedentes de varios orígenes sin que uno de ellos predomine sobre el resto.

- **Miel de mielada o mielatos:** procedentes de secreciones azucaradas de las plantas.

Los dos principales grupos, las mieles de flores y las de mielada (mielatos) difieren notablemente en cuanto a su composición química y sus características organolépticas.

Entre las mieles uniflorales y las mieles de mezcla estas diferencias determinan, además, la calidad del producto. Las mieles uniflorales suelen incluir el origen en su etiqueta como criterio de calidad, al tratarse de una miel con las características propias y diferenciadoras de ese origen. Las principales mieles uniflorales producidas en España son las mieles de cítricos (o miel de azahar), de eucalipto, romero, brezo, etc.

Las mieles de mezcla, sin embargo, carecen de esas características diferenciadoras, y son, en general, menos apreciadas por el consumidor. Sin embargo, estas mieles están más extendidas comercialmente, ya que las grandes cantidades de miel requeridas para su producción industrial hacen más rentable su producción (White Jr., 1978).

#### 0.1.3.2. Caracterización de mieles uniflorales.

La caracterización de una muestra es la asignación de forma reproducible de uno o varios valores relativos a sus propiedades, composición, etc. que permitan su posterior reconocimiento o evaluación.

En el caso de la miel, resulta especialmente importante la caracterización de las mieles uniflorales con el objetivo final de su clasificación, ya que el valor añadido de las mieles artesanales uniflorales se debe a la apreciación por parte del consumidor de las características especiales derivadas de su origen.

La importancia de la caracterización del origen floral de una miel se ve reflejada en el gran número de estudios dirigidos a su determinación. Tradicionalmente esta determinación se ha llevado a cabo mediante **análisis melisopalinológico** (Maurizio, 1975; Louveaux *et al.*, 1978), que consiste en un recuento de los granos de polen presentes en la miel. Es indudable que la presencia de polen de determinadas plantas indica la contribución de las mismas a esa miel. Sin embargo, se trata de una técnica tediosa, requiere de analistas expertos, resulta poco viable para algunas especies carentes de polen y puede dar lugar a errores en las muestras en las que las especies presentes aportan distinta proporción entre néctar y polen.

La búsqueda de métodos alternativos se han basado sobre todo en el **estudio de su composición química**, ya que, como se ha subrayado a lo largo de esta memoria, la composición química depende principalmente del origen botánico de la miel. La caracterización de los compuestos volátiles (Soria *et al.*, 2003, 2004), compuestos fenólicos (Martos *et al.*, 2000), azúcares (Mateo *et al.*, 1996; Nozal *et al.*, 2005), aminoácidos (Bernal *et al.*, 2005), minerales (Hernandez *et al.*, 2005) etc. han servido en muchos casos para determinar el origen floral de las distintas mieles.

Un primer objetivo de estos estudios es la búsqueda de compuestos característicos y únicos en las mieles de cada origen floral, de manera que su presencia indique inequívocamente el origen de una miel. Son los denominados **marcadores** del origen floral. Aunque se han descrito algunos marcadores entre los principales grupos de compuestos estudiados, como el antranilato de metilo en la composición volátil de la miel de cítricos (Serra-Bonheví *et al.*, 1988), el flavonoide hesperetina en las mismas mieles (Ferrerres *et al.*, 1994), el perseitol (polialcohol de la D-mannoheptulosa ) en las mieles de aguacate (Dvash *et al.*, 2002), etc., la mayoría de los compuestos están presentes en mayor o menor concentración en distintas mieles, siendo necesario establecer unos rangos de concentración válidos para determinar un origen floral, lo que a veces resulta muy difícil. En estos casos hay que recurrir al uso conjunto de varios parámetros para dar fiabilidad a una determinación.

Para el tratamiento del gran número de datos obtenidos se requiere el uso de técnicas estadísticas multivariantes.

Los carbohidratos y los compuestos volátiles de las mieles serán objeto de estudio en esta memoria. La caracterización de la composición volátil y de azúcares en mieles uniflorales y la diferenciación de mieles según su origen floral a partir de estos compuestos son estudiados en detalle en los siguientes capítulos, así como los avances llevados a cabo en la metodología de estas determinaciones.

#### 0.1.4. EVOLUCIÓN DE LA MIEL CON EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA

La miel es un alimento muy estable. Su alto contenido en azúcares, su humedad relativamente baja y su carácter ácido constituyen una matriz poco favorable para el crecimiento de microorganismos. Se trata del único edulcorante que puede ser usado y almacenado tal como se produce en la naturaleza (White Jr., 1978).

Sin embargo, con el tiempo, y dependiendo de distintos factores como la temperatura y condiciones de almacenamiento y la composición de la miel, las mieles pueden sufrir alteraciones (como la cristalización o la fermentación de los azúcares) o ciertos cambios en su composición química que afectan a la calidad del producto.

##### **0.1.4.1. Cristalización.**

La miel es una solución sobresaturada en azúcares, principalmente en glucosa, lo que provoca que, con el tiempo, se produzca su cristalización. Este proceso consiste en la formación y precipitación de cristales de glucosa, obteniéndose como consecuencia una fase líquida más diluida. Este fenómeno puede predecirse en función de la relación entre glucosa, fructosa y agua en la muestra (Bhandari *et al.*, 1999) ya que las mieles con mayor proporción relativa de glucosa con respecto a la fructosa y al agua tendrán más tendencia a cristalizar.

Se trata de un cambio físico, ya que su composición química no se ve afectada. Sin embargo, la miel cristalizada suele ser rechazada por el consumidor. Además, la fermentación se verá favorecida con el aumento en el contenido en agua de la fase líquida.

La temperatura óptima de cristalización son 14°C, debiendo evitarse el intervalo de 12 a 16°C para preservarla de este fenómeno. A los 10°C el proceso es muy lento, y a 78°C se destruyen los cristales y desaparece totalmente el fenómeno, por lo que la pasteurización, muy frecuente en la industria, además de ser eficaz frente a los microorganismos, permite mantener la miel líquida por más tiempo.

#### **0.1.4.2. Fermentación**

Pese a tratarse de un alimento microbiológicamente seguro, la miel puede sufrir alteraciones producidas por ciertos microorganismos osmófilos, que no suelen provocar riesgo para la salud, pero deterioran del producto. La alteración microbiológica más frecuente es la fermentación de los azúcares por parte de las levaduras presentes en la miel, dando etanol como producto mayoritario, pero también otros alcoholes y ácidos orgánicos.

El comienzo de la fermentación depende del contenido en agua, la proporción de levaduras, las condiciones de almacenamiento y la cristalización (White, 1978; Huidobro y col., 2001).

#### **0.1.4.3. Cambios con el tiempo de almacenamiento**

Además de las alteraciones que pueden producirse en la miel, como la fermentación o la cristalización, la composición química de la miel varía con el **tiempo y la temperatura de almacenamiento**.

Los principales cambios que sufren las mieles con el tiempo se atribuyen a la reacción de Maillard entre azúcares y sustancias nitrogenadas, a la actuación de las enzimas de la miel, a otras reacciones no enzimáticas, a la oxidación de algunos compuestos y a la pérdida de otros por evaporación.

La **reacción de Maillard** provoca, además de la disminución del contenido de azúcares, la formación de compuestos derivados del furano, como furosina (Villamiel *et al.*, 2001), hidroximetilfurfural (Sanz *et al.*, 2003) y otros compuestos. Como consecuencia de la formación de estos compuestos se observa además, un oscurecimiento de la miel, y ciertas modificaciones en su aroma.

La **acción de las enzimas**, así como algunas **reacciones químicas catalizadas por ácidos**, dan lugar a la formación de oligosacáridos a partir de monosacáridos (White, 1978).

Algunos azúcares (aldosas), y otros componentes minoritarios, pueden sufrir **oxidación**; y por último, algunos de los compuestos más volátiles disminuyen debido, por una parte, a su **evaporación parcial**, y, por otra, a la **degradación** de los compuestos menos estables.

#### **0.1.4.4. Acción del calor**

A menudo las mieles son calentadas para facilitar su manipulación durante el procesado, para evitar la cristalización, o eliminar las levaduras responsables de la fermentación, lo que provoca también cambios que afectan a la calidad del producto.

Dependiendo de la temperatura y tiempo de calentamiento tienen lugar algunas reacciones similares a las que suceden en el almacenamiento, como el oscurecimiento de las mieles, la pérdida de aromas y formación de otros compuestos volátiles.

En la fracción azucarada también se producen cambios. Aunque los cambios enzimáticos no son significativos, sí que lo es la reacción de Maillard y reacciones de caramelización de los azúcares (Singh *et al.*, 1998).

Por último, las temperaturas elevadas provocan la degradación de compuestos termolábiles de distinta naturaleza.

Para preservar la calidad de la miel conviene evitar calentamientos excesivos durante su procesado y almacenarla a temperaturas adecuadas para evitar en la medida de lo posible los cambios en su composición química. En posteriores capítulos se detalla un estudio de la evolución de la composición volátil y los carbohidratos de varias mieles con el almacenamiento prolongado a distintas temperaturas, así como los cambios producidos tras someter a las mieles a altas temperaturas.

## **0.2. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LA MIEL**

### **0.2.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR GC-MS**

Los compuestos volátiles de la miel constituyen una fracción muy compleja, cuyo análisis requiere una técnica de gran poder de resolución como la Cromatografía de Gases. Su acoplamiento con la Espectrometría de Masas aporta una información adicional que ayuda en gran medida a la identificación de los compuestos.

Estos compuestos están presentes en la miel en concentraciones muy bajas y dentro de una matriz no volátil formada principalmente por agua y carbohidratos, por lo que es necesaria su extracción y preconcentración previas al análisis por GC-MS.

#### **0.2.1.1. Preparación de la muestra: fraccionamiento de compuestos volátiles.**

El fraccionamiento constituye la fase más crítica del análisis de compuestos volátiles por GC-MS. Se han utilizado muy diversas técnicas con el fin de conseguir la recuperación del máximo número de compuestos posible, de evitar la aparición de compuestos no presentes inicialmente en la muestra como consecuencia de la aplicación de altas temperaturas o de impurezas del disolvente y de conseguir una válida determinación cuantitativa.

Las técnicas de extracción de compuestos volátiles se pueden clasificar en técnicas de extracción exhaustiva, donde se obtiene un rendimiento cercano al 100%, o técnicas de fraccionamiento, con la recuperación de un porcentaje variable de estos compuestos. Las primeras necesitan en general tiempos muy largos, grandes cantidades de muestra y son difícilmente automatizables, por lo que las técnicas de fraccionamiento suelen tener mayor interés práctico.

Para el fraccionamiento de compuestos volátiles en miel se han utilizado las diferencias de polaridad, de volatilidad o de ambas propiedades entre los compuestos volátiles y la matriz de la muestra. Las técnicas más empleadas se detallan a continuación.

0.2.1.1.1. *Extracción con disolventes: Extracción líquido-líquido y extracción soxhlet.*

Se basan en el reparto de los compuestos entre el disolvente extractante y la matriz acuosa, por lo que recuperación de cada compuesto será muy variable dependiendo sus coeficientes de reparto en cada disolvente. Han sido de las técnicas más usadas por su sencillez y el amplio número de disolventes disponibles (Graddon *et al.*, 1979; Bicchi *et al.*, 1983; Bonaga *et al.*, 1986; D'arcy *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2003).

Los disolventes empleados para la extracción de los compuestos volátiles de la miel han sido acetato de etilo (Wootton *et al.* 1978, Bicchi *et al.*, 1983, D'arcy *et al.*, 1997), diclorometano (Graddon *et al.*, 1979, Bicchi *et al.* 1983, Häusler *et al.*, 1989, 1990, 1991, Ferreres *et al.*, 1994), eter etílico (Stegg *et al.* 1988, Campos *et al.* 2000), hexano (Bonaga *et al.*, 1986) y acetona (Campos *et al.* 2000).

La extracción con disolventes de los compuestos volátiles de la miel puede hacerse **en modo discontinuo** a temperatura ambiente, en **extractores líquido-líquido** (diluida) o en **aparatos soxhlet** (miel sin diluir contenida en un cartucho). En los dos últimos casos se emplean temperaturas superiores a la temperatura ambiente, obteniéndose una mayor recuperación de los compuestos. El inconveniente es que al calentar la muestra pueden degradarse algunos compuestos termolábiles y pueden aparecer compuestos de descomposición.

Tras la extracción es necesario concentrar la muestra para eliminar el exceso de disolvente, lo que conlleva la pérdida de los compuestos más volátiles. Además, los compuestos de volatilidad alta que queden en el extracto serán muy poco retenidos en la columna y eluirán muy cerca del disolvente, quedando enmascarados por él, por lo que estas técnicas no son adecuadas para compuestos muy volátiles. La concentración de grandes volúmenes de disolvente hace que las impurezas del disolvente se concentren también (Jeon *et al.*, 1976), por lo que deben usarse disolventes de elevada pureza o disolventes previamente destilados.

Otro problema de estas técnicas es la posible solubilidad en el disolvente extractante de compuestos de baja volatilidad, que no deben inyectarse en el cromatógrafo de gases.



0.2.1.1.2. *Extracción-destilación simultáneas (SDE).*

Se basa en la combinación de una destilación en corriente de vapor y la extracción con disolventes. El vapor destilado de la muestra, que contiene los compuestos volátiles, y el vapor de un disolvente orgánico son condensados y entran en contacto, produciéndose la transferencia de los compuestos volátiles de la fase acuosa a la orgánica.

Esta técnica, desarrollada por Likens y Nickerson (1964) y modificada por Godefroot *et al.* (1981), mejora las recuperaciones obtenidas por la extracción con disolventes y da lugar a extractos libres de compuestos no volátiles, al ser el destilado el que se pone en contacto con el disolvente. Es adecuada para la extracción de compuestos de volatilidad media, ya que los compuestos más volátiles se perderán en la etapa de concentración o quedarán enmascarados por el disolvente en el análisis.

Las temperaturas necesarias para la destilación de la muestra acuosa son elevadas, por lo que se producirá la degradación de compuestos termolábiles y la formación de productos de degradación. Para solucionar este problema se han desarrollado dispositivos a presión reducida que permitan el aislamiento de volátiles a temperatura ambiente (Maignial *et al.* 1992). El problema de la aplicación de esta técnica es que los disolventes más ligeros se evaporan totalmente al ponerlos a vacío, mientras que si se usan disolventes con puntos de ebullición más altos la mayor parte de compuestos volátiles se pierden en la etapa de concentración de la muestra.

Otros autores tratan de eliminar los compuestos indeseables formados por el calentamiento mediante un doble proceso de extracción con disolventes seguido de SDE (Bouseta *et al.* 1995). La aplicación secuencial de las dos técnicas elimina la formación de compuestos por el calentamiento y elimina también los compuestos pesados solubles en el disolvente extractante, aunque la recuperación de compuestos se verá disminuida al someterlos a dos procesos de fraccionamiento.

0.2.1.1.3. *Análisis del espacio de cabeza: Vapor confinado y arrastre con gas inerte.*

Las técnicas del vapor confinado (o espacio de cabeza estático) y del arrastre con gas inerte (o espacio de cabeza dinámico) fraccionan los compuestos según su volatilidad,

basándose en su reparto entre la fase líquida de la muestra y la fase gaseosa que está en contacto con ella.

Para el análisis del **vapor confinado** la muestra se coloca en un vial cerrado dejando un espacio gaseoso libre. La muestra puede calentarse a una temperatura moderada para favorecer la volatilización de los compuestos, y tras alcanzarse el equilibrio entre las fases se toma con una jeringa una muestra de la fase gaseosa para su inyección en el cromatógrafo de gases. Es una técnica rápida, limpia y no destructiva, en la que se evita la degradación de compuestos termolábiles y la formación de compuestos de descomposición por la temperatura (Cole y Woolfenden, 1991) pero que presenta recuperaciones muy bajas, especialmente de los compuestos de volatilidad media y baja (Rowland *et al.* 1995).

En la técnica de **arrastre con gas inerte** se hace pasar una corriente de gas inerte para extraer los compuestos volátiles de la muestra. Así se desplaza el equilibrio termodinámico desde la muestra hacia la fase gaseosa, obteniendo mayores recuperaciones que por la técnica del vapor confinado. Los dispositivos tienen una trampa (que consisten en un material adsorbente o en el empleo de bajas temperaturas), que retiene los compuestos volátiles del gas, concentrándolos. La última etapa consiste en la transferencia de la fracción volátil retenida al sistema cromatográfico mediante desorción con disolventes (Olafsdottir *et al.*, 1985) o, más comúnmente, mediante desorción térmica.

Existen dispositivos comerciales de arrastre con gas inerte, entre ellos el más conocido es el llamado “*Purge & Trap*” (o “Purga y trampa”).

Varios autores han aplicado esta técnica para la determinación de compuestos volátiles de mieles, obteniéndose un elevado número de compuestos recuperados de alta y media volatilidad (Bouseta *et al.*, 1992; Radovic *et al.*, 2001).

Además de la mejora en la recuperación y una mejor reproducibilidad para el caso de los dispositivos automáticos, esta técnica presenta las ventajas del vapor confinado, aunque su principal inconveniente sigue siendo la discriminación negativa para compuestos de volatilidad media y baja.

#### 0.2.1.1.4. Extracción en fase sólida (SPE).

Consiste en la elución de la muestra disuelta a través de un cartucho relleno de un polímero poroso (adsorbente) provocando la retención de los compuestos volátiles en él mediante distintas interacciones.

En el caso de la miel los adsorbentes usados han sido Porapak Q (estireno-divinilbenceno) (Shimoda *et al.*, 1996; Moreira *et al.* 2002, Castro *et al.*, 2003) y Amberlita XAD-2 (Dalla-Serra *et al.*, 1999). Tras un lavado con agua que elimina los azúcares de la muestra, los compuestos se extraen con un disolvente orgánico como diclorometano (Dalla-Serra *et al.*, 1999; Guyot *et al.*, 2000, Castro *et al.*, 2003), dietil eter (Shimoda *et al.*, 1996) o acetona (Moreira *et al.*, 2002). Por último se lleva a cabo la concentración de la disolución obtenida.

Los volúmenes de disolvente empleados son menores que por otras técnicas, aunque sigue siendo necesaria la etapa de concentración. Entre sus ventajas cabe destacar que no es necesario calentar la muestra (Shimoda *et al.*, 1996) y el amplio número de adsorbentes disponibles comercialmente.

#### 0.2.1.1.5. Microextracción en fase sólida (SPME).

La microextracción en fase sólida se basa en el reparto o adsorción entre la muestra y un delgado recubrimiento polimérico soportado por una fibra de sílice fundida (Arthur *et al.*, 1990). La recuperación de los compuestos depende de la naturaleza del recubrimiento polimérico y de los analitos de interés.

Un estudio llevado a cabo por Soria (Soria *et al.*, 2003) comparó los resultados obtenidos en el fraccionamiento de los compuestos volátiles de la miel para 4 recubrimientos poliméricos: polidimetilsiloxano (PDMS), Carbowax/divinilbenceno (CW/DVB), poliacrilato (PA) y Carboxen/polidimetilsiloxano (C/PDMS). En general, los dos últimos recubrimientos presentaron mayores recuperaciones. El recubrimiento de poliacrilato presentó mayor sensibilidad para compuestos de volatilidad media, sin embargo, la fibra de Carboxen/polidimetilsiloxano mostró buenas recuperaciones para un rango mayor de

compuestos. La elección de la fibra depende de la naturaleza de los analitos de interés y del objetivo del análisis.

Hay dos modalidades de fraccionamiento: la extracción del espacio de cabeza y la extracción por inmersión. En la primera los compuestos volátiles son transferidos desde la fase gas que está en contacto con la muestra hasta la fibra, mientras que en la segunda la fibra se pone en contacto directo con la muestra. Sin embargo, esta última modalidad no puede aplicarse a matrices como la miel, ya que la fibra se contaminaría con los azúcares presentes en la misma.

La microextracción en fase sólida del espacio de cabeza tiene lugar en 4 etapas:

- **Acondicionamiento de la fibra:** Consiste en la desorción de los compuestos volátiles retenidos en la fase, procedentes del ambiente o de anteriores determinaciones. Normalmente se trata de una desorción térmica, que se lleva a cabo exponiendo a la fibra a temperaturas que dependen de cada fase polimérica, por lo general superiores a 250°C.

- **Equilibrio:** La muestra se coloca durante un cierto tiempo en un vial sellado, a temperatura ambiente o calentada a temperatura moderada, hasta alcanzar el equilibrio termodinámico de los compuestos entre la fase de la muestra (líquida o sólida) y la fase gaseosa que la rodea.

Algunos estudios se han basado en la extracción de compuestos por SPME en condiciones de no equilibrio, aunque en esta modalidad el control de los parámetros de operación es más difícil y la dispersión en los resultados aumenta.

Los parámetros que afectan a esta etapa son la temperatura y tiempo de equilibrio, la agitación que pueda acelerarlo, el pH para evitar la ionización de algunos analitos (Zhang *et al.*, 1994; Pawliszyn, 2000) y la adición de sales a la muestra, que en algunos casos será conveniente para disminuir la solubilidad de los compuestos volátiles en la matriz y favorecer su liberación a la fase gaseosa (Yang *et al.*, 1994). En el caso de la miel este último parámetro no parece afectar a la determinación (Soria *et al.*, 2003), probablemente debido a que la miel ya es una solución sobresaturada de azúcares. Tampoco parece necesario ajustar el pH de la miel. Las temperaturas de equilibrio empleadas para su aplicación a la miel varían desde 30°C (Verzera *et al.*, 2001) a 85°C (Pérez *et al.*, 2002), aunque algunos autores

han observado la formación de compuestos de degradación de azúcares a temperaturas superiores a 60°C (Soria *et al.*, 2003).

• **Extracción:** Cuando la muestra está en equilibrio con la fase gaseosa la fibra se introduce en el espacio de cabeza del vial para la extracción de los compuestos. En esta etapa ha de optimizarse y controlarse el tiempo de equilibrio a la temperatura previamente fijada y el volumen del espacio de cabeza, ya que cuanto menor sea el volumen mayor será el rendimiento de la extracción (Yang *et al.*, 1994) y, por tanto, la sensibilidad.

• **Desorción:** La desorción de los compuestos retenidos en la fibra y su inyección en el cromatógrafo de gases se dan en la misma etapa. El inyector calentado a alta temperatura provoca la desorción térmica de los compuestos volátiles. El modo de inyección suele ser inyección sin división de flujo (splitless) para que durante el tiempo en que se produce la desorción los compuestos desorbidos pasen a la columna. Durante este tiempo conviene mantener la temperatura del horno tan baja como sea posible para que los compuestos se concentren en la cabeza de la columna (crioenfoque) y disminuya el ensanchamiento de bandas, especialmente de las correspondientes a los compuestos más volátiles (Arthur y Pawliszyn, 1990).

Se trata de una técnica sencilla, rápida y asequible, de gran versatilidad debido al amplio número de fibras comerciales existentes, y que evita el uso de disolventes y de altas temperaturas. Permite la determinación de compuestos volátiles de muestras muy variadas, sólidas o acuosas, aunque no es adecuada para la extracción de compuestos disueltos en disolventes orgánicos ya que la afinidad de éstos por la fibra provocaría su saturación, impidiendo la retención de los analitos de interés.

A pesar de tratarse de una técnica reciente ha sido muy aplicada para la determinación de compuestos volátiles de distintas matrices, entre ellas la miel (Guidotti *et al.*, 1998; Verzera *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002; Piasenzotto *et al.*, 2003; Soria *et al.*, 2003,2004,2005).

Sus principales limitaciones son la necesidad de controlar al máximo todas las variables del proceso para obtener buena reproducibilidad, y los problemas asociados con la adición de un patrón interno, lo que dificulta el análisis cuantitativo.

### **0.2.1.2. Análisis de compuestos volátiles por GC-MS.**

#### *0.2.1.2.1. Condiciones cromatográficas*

Como se ha comentado previamente, la fracción volátil de la miel contiene un amplio número de compuestos de distinta naturaleza, bajo peso molecular y media a baja polaridad.

Las técnicas que no emplean disolventes, como el análisis del espacio de cabeza o la SPME, permiten extraer un amplio rango de compuestos, desde compuestos muy volátiles a compuestos con volatilidad media-baja. Por ello, las columnas cromatográficas más comunes usadas en su determinación son las de polietilenglicol u otras fases polares, que permiten su mejor separación. Los extractos obtenidos mediante disolventes pierden los compuestos más volátiles durante la concentración, pero no los de mayor peso molecular. Las columnas cromatográficas más adecuadas para su análisis deberán poder soportar temperaturas elevadas que permitan la elución de estos últimos. Las más usadas son las columnas de polimetilsiloxano.

La programación de temperatura se fijará para cada método, aunque en general consisten en una rampa suave que abarca el máximo rango de temperaturas posible, para intentar conseguir la máxima resolución de los compuestos sin alargar en exceso el tiempo

#### *0.2.1.2.2. Identificación de compuestos*

La identificación de los compuestos se basa en los datos de retención cromatográfica y en los de fragmentación por espectrometría de masas.

La inyección de patrones es recomendable en todos los casos en que sea posible para la obtención de estos datos, pero cuando no se dispone de ellos, los datos tabulados de retención de distintos compuestos en distintas fases estacionarias y las bibliotecas de espectros permiten en muchos casos su identificación.

0.2.1.2.3. *Análisis cuantitativo*

- **Modos de registro: SIM y SCAN**

Para la cuantificación de compuestos utilizando GC-MS pueden usarse dos modos de registro, según el objetivo de nuestra determinación.

El registro en modo SIM, o registro selectivo de iones, se emplea para la cuantificación de determinados compuestos de la muestra previamente identificados. Consiste en el registro exclusivo de uno o varios iones característicos del compuesto a determinar, y presenta como principal ventaja una mayor sensibilidad de la determinación, al aumentar la relación señal/ruido.

Cuando el objetivo de la determinación es la identificación y cuantificación de todos los componentes volátiles de la muestra, como en la determinación de la fracción volátil de la miel, es necesario utilizar el registro en modo SCAN, ya que nos permite obtener información cualitativa y cuantitativa de todos los compuestos de la muestra.

- **Integración en modo SCAN y tipos de análisis cuantitativo**

La integración del área de los picos obtenida del registro total de iones (TIC) puede usarse de forma absoluta (comparación de áreas), de forma relativa (referidos a un compuesto que se toma como referencia o a la señal total de la muestra) o mediante el empleo de un calibrado externo o un patrón interno para la determinación cuantitativa absoluta.

- **Determinación cuantitativa de compuestos volátiles en mezclas complejas. Exactitud y precisión.**

Para obtener datos exactos del análisis cuantitativo absoluto a través de un calibrado externo, éste debería hacerse con todos los compuestos presentes en la muestra, lo que resulta muy tedioso en mezclas tan complejas como la miel.

Para el empleo de un patrón interno éste debería presentar un comportamiento de recuperación, separación y respuesta cromatográfica similar al de los analitos a determinar, lo cual suele no cumplirse para la mayor parte de los compuestos de la fracción volátil de la

miel dadas las diferencias que hay entre ellos. En estos casos, no pueden conseguirse determinaciones cuantitativas exactas.

Sin embargo, cuando la caracterización de la fracción volátil tiene fines comparativos, los resultados, aunque no sean exactos, pueden ser de gran utilidad siempre que sean precisos. La precisión viene dada por la dispersión de los datos cuantitativos, y dependerá de la técnica de fraccionamiento y del tipo de cuantificación que se lleve a cabo.

En general, el empleo de datos cuantitativos absolutos da como resultado una mayor dispersión de los datos cuantitativos. Esto puede apreciarse especialmente, en técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME), donde el uso de un patrón interno da lugar a resultados muy poco precisos, probablemente debido a la difícil homogenización de éste (que al presentar poca polaridad se añade disuelto en un disolvente orgánico) en la matriz acuosa de la muestra. Sin embargo, la precisión en los resultados mejora considerablemente cuando se utilizan datos de concentración relativos, por lo que han sido los más usados en estos casos (Soria *et al.* 2003.).

El principal problema que presenta el uso de datos relativos con respecto a la dispersión, es la correlación existente entre los valores de los distintos compuestos, al estar relacionada la concentración de cada compuesto con la del conjunto de compuestos determinados. En estos casos la precisión puede mejorar mediante el uso de relaciones entre compuestos.

La mejora de la exactitud de los resultados pasa, como hemos visto, por conocer la recuperación de cada compuesto según la técnica elegida. El fraccionamiento en múltiples etapas, y la extrapolación de los resultados de varias etapas por medio de modelos matemáticos han sido empleadas con este objetivo (Kolb *et al.*, 1982, 1984, 1990, 1991; Vitenberg *et al.*, 1984; Venema, 1986, 1988, 1990; Kostianem, 1994; Soria, 2006). Sin embargo, estos métodos requieren tiempos muy largos de análisis y presentan dificultades para algunas técnicas de fraccionamiento, por lo que en esta memoria se ha evaluado la posibilidad de la estimación de la recuperación de los compuestos a partir de parámetros estructurales cualitativos, ya que la recuperación de los compuestos por una técnica de fraccionamiento debe depender de las características de cada analito.



## 0.2.2. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN MIEL POR GC.

Para el estudio de la fracción de carbohidratos de la miel las principales técnicas empleadas han sido la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) y la Cromatografía de Gases (GC).

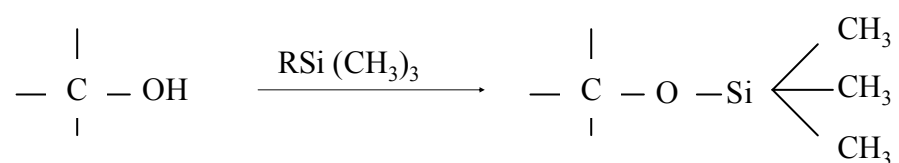
La principal ventaja de la Cromatografía de Líquidos es que la muestra solo necesita ser diluida y filtrada, mientras que para la determinación por Cromatografía de Gases es necesaria la derivatización previa de los azúcares, inicialmente no volátiles, para convertirlos en compuestos con mayor volatilidad analizables por esta técnica.

Sin embargo, la gran variedad de carbohidratos presentes en la miel y la similitud estructural entre ellos la convierten en una fracción muy compleja, por lo que resulta necesaria una técnica con gran poder de resolución. La Cromatografía de Gases puede resultar más útil para este tipo de muestras, al dar lugar a una mejor separación de estos compuestos.

### 0.2.2.1. Preparación de la muestra: derivatización de carbohidratos.

Entre los derivados utilizados para la determinación de azúcares por Cromatografía de Gases se encuentran los acetatos, metil éteres, trifluoroacetatos y trimetilsilil éteres (TMS éteres).

La formación de TMS éteres consiste en la sustitución del hidrógeno del grupo hidroxilo de los azúcares por el radical  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ .



Los derivados obtenidos presentan unas características de volatilidad y estabilidad muy adecuadas, que permiten la separación de di- y trisacáridos por GC, por lo que han sido de los derivados más utilizados (Cotte *et al.*, 2003; Sweeley *et al.*, 1963; DeJongh *et al.*, 1969).

Cada azúcar puede cristalizar en diferentes formas pero, en disolución, los azúcares con un centro anomérico libre (azúcares reductores) pueden adoptar todas sus posibles formas tautoméricas, que a su vez dan lugar a los distintos derivados correspondientes. Esto supone un problema para su análisis por Cromatografía de Gases, ya que a partir de cada azúcar reductor se obtienen varios picos (hasta 5 por cada azúcar), por lo que las mezclas de disacáridos pueden presentar solapamientos, dando lugar a cromatogramas muy complejos (Cotte *et al.*, 2004)

Para evitar la formación de múltiples picos se han seguido distintos procedimientos basados en eliminar el centro anomérico del azúcar. Uno de los métodos propuestos fue la reducción de los azúcares previa a su trimetilsililación (Sweeley *et al.*, 1963) que lleva asociados varios problemas, ya que además de que los alditoles presentan peor resolución que los azúcares correspondientes, algunas aldosas y cetosas (entre ellas glucosa y fructosa) al reducirse dan el mismo alditol.

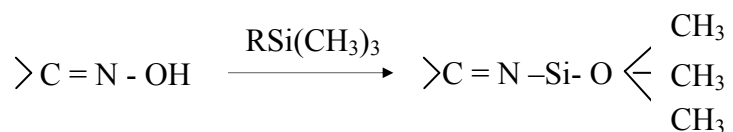
Un método extendido para la eliminación del centro anomérico de los azúcares es la formación de la oxima del grupo carbonilo previa a la trimetilsililación. Este paso consigue reducir el número de picos de los azúcares reductores a 2, con lo que se simplifican en parte los cromatogramas obtenidos. Los derivados formados a partir de las aldosas reductoras corresponden a los isómeros Z y E, cuyas proporciones relativas están en torno al 80% del primero y 20% para el segundo. Los isómeros 1 y 2 formados a partir de las cetosas se obtienen, sin embargo, en proporciones aproximadas del 50% de cada uno (Sanz *et al.*, 2003). Los disacáridos no reductores dan lógicamente los *per*-trimetilsilil éteres (un solo pico). Este método ha sido utilizado con éxito por varios autores (Gómez Bárez *et al.*, 1999; Hörváth *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2002) por lo que ha sido el elegido para llevar a cabo este trabajo.

Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

1. Formación de la oxima.



## 2. Formación del derivado trimetilsililado:



Otro método propuesto para reducir el número de picos ha sido la deshidratación de las oximas de las aldosas para formar los aldononitrilos correspondientes, de forma que se consigue un único derivado para las aldosas (Rubino, 1989). Sin embargo, este método solo se ha empleado con mezclas de patrones y no se ha comprobado su uso con muestras reales que contengan también cetosas.

La formación de tioéteres de azúcar se presenta como el único método conocido que permite obtener un solo derivado de cada azúcar (aldosa o cetosa) (Englmaier 1990), pero este método presenta varias dificultades en su preparación debidas principalmente al empleo de un tiol como reactivo de derivatización.

Entre los métodos citados, son las TMS oximas los derivados que presentan más ventajas para los análisis de mezclas de azúcares debido a la sencillez del método, la estabilidad de los derivados, la formación de un máximo de dos isómeros por cada azúcar y la buena separación encontrada con las fases estacionarias más habituales en GC. Como se ha comentado, el método da lugar a dos picos por azúcar reductor, lo que complica el cromatograma pero proporciona una información adicional útil en caso de solapamientos.

**0.2.2.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos por GC y GC-MS.***0.2.2.2.1. Condiciones cromatográficas.*

Los métodos de análisis de carbohidratos por Cromatografía de Gases utilizan columnas apolares que soporten temperaturas muy elevadas. Así, las más usadas han sido columnas de metilsilicona, o con cierto porcentaje de fenilsilicona, que pueden ser calentadas a temperaturas superiores a 300°C.

Para la determinación de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos suelen emplearse columnas de bajo espesor de fase y longitud intermedia (25 ó 30 metros), para tratar de

obtener la máxima resolución de los isómeros sin alargar en exceso los tiempos de análisis. La utilización de columnas de menor longitud ha permitido la determinación de carbohidratos de mayor peso molecular (hasta hexasacáridos), aunque se obtiene una menor resolución entre picos.

#### *0.2.2.2.2. Identificación de carbohidratos*

La determinación de mezclas complejas de carbohidratos presenta grandes dificultades, al tratarse de grupos (mono-, di- y trisacáridos) cada uno de los cuales está constituido por numerosos compuestos del mismo peso molecular. En el caso de la miel es especialmente complicada la fracción de disacáridos, debido al elevado número de compuestos presentes y al carácter reductor de muchos de ellos (que dan lugar a múltiples derivados), por lo que no se ha conseguido hasta el momento su completa separación en una sola columna.

La Espectrometría de Masas, aunque útil, está limitada para este tipo de compuestos por su similitud estructural, que hace que los espectros de algunos azúcares den lugar a los mismos fragmentos (Sanz et al., 2004), lo que dificulta su identificación y cuantificación en casos de coelución. El empleo de patrones es imprescindible para confirmar su identificación, sin embargo, solo un número limitado de ellos está disponible comercialmente.

#### *0.2.2.2.3. Análisis cuantitativo de carbohidratos.*

Para facilitar la determinación de azúcares que solapan, algunos autores han utilizado dos derivados distintos, consiguiendo doble información para cada compuesto. Es el caso del empleo de los trimetilsilil derivados llevando a cabo o no previamente la formación de oximas (Gómez-Bárez et al., 1999). Otros autores han usado un solo derivado pero dos fases estacionarias distintas (Sanz et al., 2004), lo que facilita también la cuantificación de algunos compuestos, ya que los índices de retención de los compuestos son distintos en las dos fases. Además, el uso de dos columnas o de dos derivados reduce la probabilidad de que las interferencias solapen con el mismo compuesto en las dos fases.

En otros casos se ha utilizado un solo derivado y una sola fase, obteniendo sólo una determinación conjunta de aquellos compuestos que no se consiguen cuantificar por separado.

Para el análisis cuantitativo suele utilizarse un patrón interno. Los patrones más usados por los distintos autores han sido n-octadecano (Mateo et al., 1996), fenil- $\beta$ -glucósido (Gómez-Bárez et al., 1999) y metil- $\alpha$ -galactósido (Troyano et al., 1996). El cálculo del factor de respuesta de cada compuesto mediante la fórmula:

$$\frac{A_i}{A_p} = f_r \frac{W_i}{W_p}$$

donde  $A_i$  y  $A_p$  son las áreas en unidades de integración del patrón interno y del patrón del disacárido  $i$  respectivamente,  $W_p$  y  $W_i$  las cantidades de patrón interno y de disacárido y  $f_r$  el factor de respuesta del disacárido con respecto al patrón interno.

La similitud entre los distintos monosacáridos, disacáridos y trisacáridos hace que sus factores de respuesta sean muy similares, por lo que es habitual usar un factor de respuesta medio para cada grupo de isómeros.



## CAPÍTULO 1

# DESARROLLO DE UN MÉTODO ROBUSTO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE DISACÁRIDOS EN MIEL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

### 7.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1.1. PROBLEMÁTICA DE LA DETERMINACIÓN DE DISACÁRIDOS EN MIEL

Como se ha comentado previamente, la miel contiene un elevado número de azúcares, principalmente mono-, di- y trisacáridos, que pueden ser analizados por Cromatografía de Gases mediante su transformación en derivados volátiles.

Los cromatogramas obtenidos presentan tres zonas de elución bien diferenciadas. En la primera aparecen los monosacáridos, siendo fructosa y glucosa los más importantes; en la segunda eluyen los numerosos disacáridos presentes, y en una tercera zona los trisacáridos, que se encuentran en menor proporción.

Mientras que mono- y trisacáridos parecen resolverse satisfactoriamente, la zona de elución de los disacáridos se presenta como un conjunto de picos parcialmente solapados, donde cada pico corresponde en muchos casos a varios compuestos. Además, la formación de varios derivados de los disacáridos reductores (dos derivados por azúcar reductor, en el caso de las oximas) complica aún más esta zona del cromatograma, puesto que un mismo disacárido puede contribuir a dos picos distintos.

El uso de patrones permite conocer a qué picos contribuye cada disacárido, así como, en el caso de los azúcares reductores, la proporción de cada derivado formado. Sin embargo, no todos los patrones de disacáridos están presentes comercialmente, y dado el origen natural de la miel, y el complejo mecanismo de formación de los distintos azúcares por vía enzimática a partir de glucosa y fructosa, no puede descartarse la presencia de otros disacáridos que no hayan sido identificados hasta el momento. Las coeluciones presentes en esta zona dificultan o impiden la identificación de estos compuestos, dando lugar, además, a errores en la cuantificación de los disacáridos conocidos.

Podemos considerar a estos compuestos no identificados que coeluyen con los disacáridos identificados como compuestos interferentes para su determinación cuantitativa. Los errores sistemáticos que por esta causa pueden producirse son muy superiores a los errores aleatorios propios del método.

En este capítulo se ha llevado a cabo el desarrollo de un método de cálculo que tiene en cuenta esta posible presencia de compuestos desconocidos coeluyentes, con el objetivo, por una parte, de mejorar la exactitud del análisis cuantitativo de los disacáridos identificados, y por otra, de poner de manifiesto la presencia de otros disacáridos no descritos hasta el momento en miel.

### 1.1.2. MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO

En análisis cuantitativo multicomponente, cuando dos o más compuestos pueden contribuir a una misma señal analítica se supone que la respuesta sigue el modelo aditivo:

$$R_{m,v} = \Sigma Q_{m,k} f_{k,v} + R_{b,v} + e_{m,v} \quad [1]$$

donde  $R_{m,v}$  es la respuesta experimental que proporciona la muestra  $m$  a la señal  $v$ ,  $Q_{m,k}$  es la concentración del componente  $k$  en la muestra  $m$ ,  $f_{k,v}$  es el valor de la respuesta a la señal  $v$  de una concentración unidad del componente  $k$ ,  $R_{b,v}$  es la respuesta de un ensayo en blanco a la misma señal y  $e_{m,v}$  son los posibles errores experimentales.

En cromatografía de gases,  $v$  es el pico cromatográfico, y los factores de respuesta  $f_{k,v}$  pueden obtenerse experimentalmente o, si los compuestos son similares, estimarse como iguales. La respuesta del blanco  $R_{b,v}$  se supone nula y los errores  $e_{m,v}$  se consideran aleatorios. El modelo [1] se convierte en:

$$R_{m,v} = \Sigma Q_{m,k} f_{k,v} + e_{m,v} \quad [2]$$

donde cada compuesto contribuye a un único pico, siendo sencilla la determinación cuantitativa cuando se conocen los valores  $f_{k,v}$  al disponer de patrones.



Sin embargo, en el análisis de disacáridos en mieles por GC la aplicación del modelo [2] presenta problemas debido a la presencia de componentes no identificados en la muestra cuya contribución a la señal analítica no es conocida. En este caso, [2] pasa a ser:

$$R_{m,v} = \sum Q_{m,k} f_{k,v} + \sum P_{m,j} f_{j,v} + e_{m,v} \quad [3]$$

donde  $P_{m,j}$  es la concentración del componente desconocido  $j$  en la muestra  $m$  y  $f_{j,v}$  es el valor de la respuesta a la señal  $v$  de una concentración unidad de  $j$ . Como tanto  $P_{m,j}$  como  $G_{j,v}$  son desconocidos, el modelo puede escribirse:

$$R_{m,v} = \sum Q_{m,k} f_{k,v} + e'_{m,v} \quad [4]$$

donde al contrario que en [1] los  $e'_{m,v}$  no están distribuidos aleatoriamente al incluir los valores de  $\sum P_{m,j} f_{j,v}$  donde tanto  $P_{m,j}$  como  $f_{j,v}$  son  $> 0$ .

Por otra parte, los dos isómeros producidos al formar las TMS oximas de azúcares reductores (isómeros  $E$  y  $Z$ ), y el uso de dos columnas para facilitar la determinación de estos compuestos multiplican el número de picos. En este caso, como el número de picos  $v$  es superior al de compuestos  $k$ , los valores de  $Q_{m,k}$  pueden estimarse minimizando  $\sum e_{m,v}^2$  en una regresión de mínimos cuadrados.

Sin embargo, este tipo de regresión sólo puede aplicarse cuando los  $e_{m,v}$  tienen una distribución aleatoria. Si esto no se cumple, como ocurre en el modelo [4], y si la contribución aleatoria a  $e'_{m,v}$  es menor que la debida a componentes no identificados, el empleo del método de mínimos cuadrados puede dar lugar a valores incorrectos debidos al sesgo introducido al tratar de compensar los altos valores  $e'_{m,v}$  debidos en realidad a la existencia de interferencias. Cuando estas son importantes, las concentraciones  $Q_{m,k}$  pueden tener errores elevados, llegando incluso a tomar valores negativos sin significado físico. Lo mismo ocurre con los residuos  $e'_{m,v}$ ; mientras que unos valores positivos elevados pueden corresponder a interferencias, los valores negativos de magnitud similar que aparecen no tienen justificación.

Un método de estimación mas robusto frente a interferencias para la estimación de los coeficientes  $Q_{m,k}$  debería dar una mayor importancia a minimizar los resultados con  $e'_{m,v}$

negativos que a la existencia de valores  $e'_{m,v}$  positivos explicables por la presencia de interferencias. El método de mínimos cuadrados clásico no permite este tratamiento.

Por este motivo, hemos desarrollado un método iterativo basado en el modelo  $R_{m,v} = \sum Q_{m,k} f_{k,v} + e'_{m,v}$  (modelo [4]) en el que, de forma similar a la regresión clásica, se trata de obtener los valores de  $Q_{m,k}$  que minimicen el valor de:

$$\sum e'_{m,v} = \sum (R_{m,v} - Q_{m,k} f_{k,v}) \quad [5]$$

pero cumpliendo la limitación de que todos los  $e'_{m,v}$  deben ser nulos o positivos, para cumplir con el significado del modelo.

El método desarrollado parte de un conjunto inicial de valores para los cada uno de los coeficientes  $Q_{m,k}$ , que cubren el intervalo lógico de concentraciones para cada compuesto, y selecciona el subconjunto que da lugar a un menor valor de  $\sum e'_{m,v}$ . El proceso se repite reduciendo en las etapas siguiente el intervalo de concentración permitido para cada compuesto.

### 1.1.3. MUESTRAS DE REFERENCIA PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

Una validación de la exactitud y robustez del nuevo método desarrollado es imposible, al no existir muestras de referencia ni procedimientos normalizados para este tipo de determinación, y al no ser válido el empleo de mezclas de patrones ya que la diferencia entre métodos se pone de manifiesto sólo cuando existen compuestos no identificados interferentes.

Por este motivo, para validar el método iterativo se simuló la composición de varias muestras de referencia partiendo de la típica de una miel e incluyendo interferencias de valor conocido, y a partir de las composiciones obtenidas se determinaron los correspondientes resultados cromatográficos  $R_{m,v}$ . Estos se utilizaron para determinar los valores de  $Q_{m,k}$  y de  $e'_{m,v}$  en la ecuación [4], mediante el método iterativo y mediante métodos clásicos basados en la regresión.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE RETENCIÓN Y PROPORCIONES RELATIVAS DE LOS ISÓMEROS DE TMS-OXIMAS DE DISACÁRIDOS DE MIEL.

#### 1.2.1.1. Patrones

Para el cálculo de los tiempos de retención de los distintos disacáridos y el porcentaje formado de cada isómero se emplearon los siguientes patrones de disacáridos, todos de calidad analítica y pureza adecuada para GC:

- Celobiosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Gentiobiosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Isomaltosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Kojibiosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Laminaribiosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Maltosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Maltulosa (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA).
- Melibiosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Nigerosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Palatinosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Sacarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- $\alpha,\alpha$ -trehalosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- $\alpha,\beta$ -trehalosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Trehalulosa (cedida por Dr. Wach, Südzucker, Mannheim, Germany).
- Turanosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Como patrón interno se ha utilizado fenil-  $\beta$ -glucósido (Fluka, Buchs, Switerland). Los reactivos empleados para la derivatización de carbohidratos fueron cloruro de hidroxilamina, piridina, hexametildisilazano y ácido trifluoroacético, (todos ellos de Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

### 1.2.1.2. Derivatización de disacáridos

La formación de los TMS-oximas se llevó a cabo según el método desarrollado por Sanz *et al.* (2002).

Se mezcló 1ml de una disolución 1mg/ml (80% etanol/ 20% agua) de cada patrón por separado con 0.5 ml de una disolución 1mg/ml de patrón interno, y se evaporó totalmente la muestra en un rotavapor (marca), puesto que la reacción debe llevarse a cabo en condiciones anhidras.

Para la formación de la oxima se añadieron 350  $\mu$ l de cloruro de hidroxilamina en piridina al 2.5% y se mantuvo 30 minutos en una estufa a 75°C.

La sililación se llevó a cabo añadiendo a la muestra anterior 350  $\mu$ l de hexametildisilazano (HMDS) y 35  $\mu$ l de ácido trifluoroacético (TFA), calentando a 45° durante 30 minutos. Se centrifugó la muestra obtenida a 8000 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante de un precipitado formado por el exceso de reactivos, y se inyectó 1  $\mu$ l del sobrenadante en un cromatógrafo de gases.

### 1.2.1.3. Análisis GC

Los análisis fueron llevados a cabo en modo de división de flujo (1:20) usando nitrógeno como gas portador, en dos cromatógrafos de gases con detectores de ionización de llama (FID) (HP 5890 y Carlo Erba HRGC 5160) usando las siguientes columnas y condiciones:

- **Columna MeSi:** fase SPB-1 (metilsilicona). La temperatura se mantuvo 15 minutos a 200° C, se incrementó hasta 270° C a una velocidad de 5° C/min, a continuación a 1° C/min hasta 290° C y siguió aumentando a 5° C/min hasta 300° C, donde se mantuvo 30 minutos.
- **Columna FeSi:** fase Rtx-65 (65% de fenilsilicona y 35% de metilsilicona). Tras 10 minutos a 170° C se programó una subida hasta 215° C a razón de 15°C/min, seguida de un incremento de 1° C/min hasta 240° C y finalmente uno de 5° C/min hasta 320° C, manteniéndose la temperatura durante 20 minutos.

Los patrones listados en el apartado 7.2.1.1 se inyectaron en las anteriores columnas condiciones, determinándose el tiempo de retención y el área de pico para cada uno de los posibles isómeros, y a partir de ésta última la proporción relativa de cada uno de ellos para un compuesto.

## 1.2.2. SIMULACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE DISACÁRIDOS DE MIELES A PARTIR DE SU COMPOSICIÓN.

### 1.2.2.1. Simulación de una miel típica: intervalos de integración.

Para simular el cromatograma de una miel cuya concentración en disacáridos conocidos y en compuestos interferentes sea conocida se siguieron las siguientes etapas:

1. Basándonos en datos medios de disacáridos conocidos de miel obtenidos previamente en nuestro laboratorio definimos la siguiente composición de disacáridos como típica de una miel (mg/g):

- Sacarosa: 0.9 mg/g
- $\alpha,\alpha$ -Trehalosa: 0.0 mg/g
- $\alpha,\beta$ -Trehalosa: 4.4 mg/g
- Celobiosa: 1.3 mg/g
- Laminaribiosa: 2.7 mg/g
- Maltulosa: 19.2 mg/g
- Nigerosa: 10.4 mg/g
- Turanosa: 20.6 mg/g
- Maltosa: 15.6 mg/g
- Kojibiosa: 13.0 mg/g
- Trehalulosa: 10.1 mg/g
- Palatinosa: 2.4 mg/g
- Gentiobiosa: 0.1 mg/g
- Isomaltosa: 12.7 mg/g
- Melibiosa: 0.0 mg/g

2. Partiendo de la composición de esta miel de “referencia”, de los tiempos de retención y de las anchuras de pico obtenidos para los patrones en ambas columnas, y de las proporciones relativas en que se forman los isómeros *cis*- y *trans*- de las TMS-oximas de los disacáridos reductores, se simularon los cromatogramas a los que daría lugar una miel con la composición seleccionada en las dos columnas utilizadas (MeSi y FeSi). Al igual que ocurre en la miel, los perfiles cromatográficos obtenidos para la miel simulada presentaron la coelución de varios compuestos dando lugar a picos ensanchados y parcialmente solapados.

3. Para sistematizar la integración de un cromatograma, se dividieron los citados perfiles en zonas que comienzan y terminan en valles bien definidos entre picos, aunque cada pico correspondiera a la contribución de varios compuestos. A estos intervalos de elución, en los que los resultados de la integración son fiables, se les denominó “ventanas”. También se asignaron intervalos de elución a zonas del cromatograma en las que suelen aparecer picos en las mieles reales, aunque no coincidan con los propios de disacáridos conocidos.

Se definieron 29 ventanas en la zona de elución de disacáridos de la columna MeSi y 23 ventanas en la correspondiente de la columna FeSi. La concentración (mg/g) obtenida para cada ventana en las dos columnas dio lugar a los datos de partida para la miel simulada sin interferencias (miel de “referencia”).

#### **1.2.2.2. Simulación de interferencias.**

Partiendo de los valores de concentración en mg/g, obtenidos para las ventanas de elución en la miel de referencia, se simuló en el cromatograma la presencia de otros compuestos añadiendo de forma aleatoria los valores 3, 4, 5 y 6 mg /g en distintas ventanas de cada una de las dos columnas, obteniéndose así 10 pares (columnas MeSi y FeSi) de datos de integración simulados. Se consideraron para la adición aleatoria de interferencias sólo las ventanas que incluyen en su zona de elución más de un disacárido conocido.

#### **1.2.3. MÉTODO DE CÁLCULO: PROCESO ITERATIVO.**

El método de cálculo desarrollado, al que hemos denominado “Proceso iterativo” parte de la concentración (mg/g) de las ventanas de elución para calcular la concentración de cada disacárido.

### 1.2.3.1. Gestión de entrada / salida de datos

En el anexo I se muestra un listado del programa desarrollado para llevar a cabo el proceso iterativo.

El fichero "**datos.txt**" incluye en modo ASCII, para cada una de las 29 ventanas definidas en la columna MeSi y de las 23 definidas en la columna FeSi. los nombres de los patrones que se eluyen en cada ventana y los tiempos de retención del máximo de pico.

Para cada una de las muestras a calcular, los valores de partida de integración de las ventanas, expresados como mg/g miel, se encuentran en dos ficheros de texto, denominados en el programa "**mevent.txt**" (columna MeSi) y "**fevent.txt**" (columna FeSi).

La salida se presenta en tres ficheros de texto:

- "**comp.txt**" incluye el valor en mg/g obtenido para cada compuesto.
- "**reme.txt**" y "**refe.txt**" incluyen para cada ventana los valores de los residuos obtenidos para las columnas MeSi y FeSi respectivamente.

### 1.2.3.2. Estimación numérica

Para cada composición propuesta para una muestra, el resultado de una integración experimental se simula sumando para cada ventana (columnas MeSi y FeSi) el producto de la concentración de cada uno de los 15 compuestos por su contribución relativa a dicha ventana. La comparación de una muestra teórica (basada en la concentración obtenida para cada compuesto) con una experimental (obtenida del cromatograma de partida) calcula para cada una de las ventanas en las dos columnas la diferencia entre valores reales y teóricos (residuos), así como la suma de los valores absolutos de estas diferencias para cada columna.

### 1.2.3.3. Representación gráfica

Partiendo de una línea base correspondiente a una respuesta nula, el perfil cromatográfico se simula por puntos que se representan gráficamente por separado para MeSi y FeSi, con una resolución de 600 pixels para el cromatograma completo. A cada punto del cromatograma se le suman las contribuciones de todos los compuestos, suponiendo para cada

pico una distribución gaussiana con area proporcional a su concentración, con lo que la respuesta decrece al alejarse del valor medio. La representación de cromatogramas en las columnas MeSi y FeSi requiere una estimación de anchura de pico, para lo que se ha adoptado una relación lineal con el tiempo de retención cuyos parámetros se han calculado por comparación con datos experimentales de patrones en ambas columnas.

#### **1.2.3.4. Intervalo inicial de concentraciones.**

Para cada compuesto se toma un valor mínimo de cero para su concentración. El valor máximo se calcula mediante simulación numérica, anulando la concentración de todos los compuestos excepto la del calculado, que se incrementa en pasos de 0.1 mg/g hasta que su comparación con los datos experimentales da lugar a un residuo negativo. Este valor se toma como máximo.

#### **1.2.3.5. Programa de cálculo.**

El programa que lleva a cabo el cálculo por iteración se desarrolló en Visual Basic para Windows, versión 4.5. (listado en Anexo I). Dependiendo de la velocidad del procesador empleado, el tiempo requerido para el cálculo de una muestra oscila entre 3 y 10 minutos en los ordenadores PC de uso en el laboratorio (figura 1 del Anexo I).

### **1.2.4. MÉTODOS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE.**

La determinación de los valores de concentración de los disacáridos en muestras de miel de acuerdo con el modelo [1] descrito en la Introducción se llevó a cabo mediante regresión múltiple. Para los cálculos se empleó el paquete de programas BMDP en su versión BMDPDYN para PC (18), mediante el programa 9R de regresión por subconjuntos, utilizando el modo general de mínimos cuadrados y los modificadores requeridos para incluir o no ordenada en el origen.



### 1.3. RESULTADOS.

#### 1.3.1. CONTRIBUCIÓN DE CADA DISACÁRIDO AL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA MIEL.

Para cada disacárido, los porcentajes de sus isómeros y la “ventana de retención” en que se incluyen se detallan en la siguientes tablas:

**Tabla 1.** Ventanas presentes en metilsilicona, con los isómeros que coeluyen en cada ventana y % de cada isómero con respecto al otro.

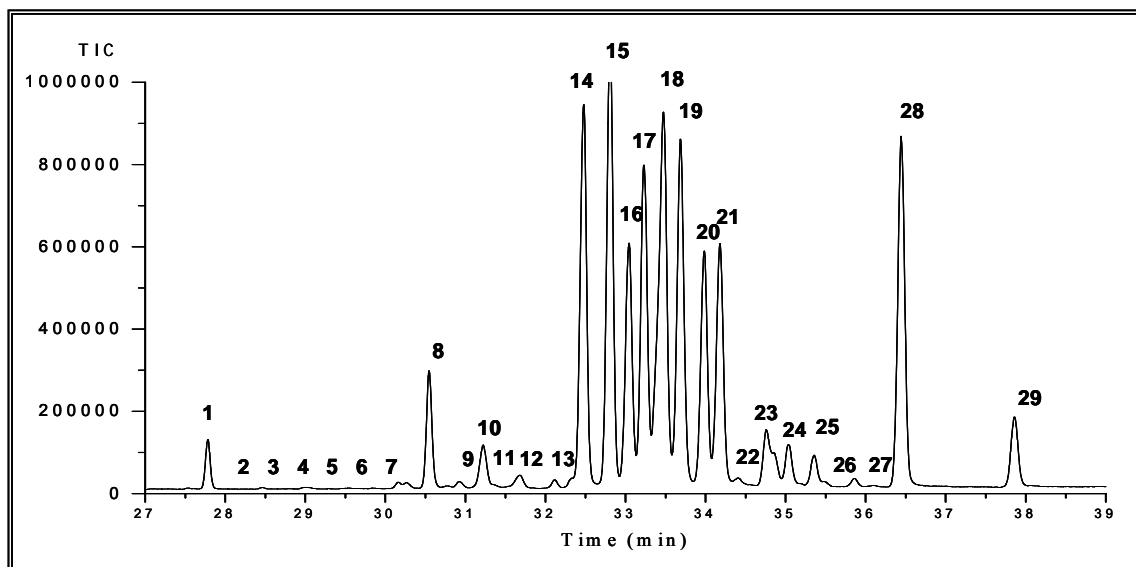
METILSILICONA		
VENTANAS	PICOS	%
1	Sacarosa	100
2	n.i.	
3	n.i.	
4	n.i.	
5	n.i.	
6	n.i.	
7	$\alpha,\alpha$ -Trehalosa	100
8	$\alpha,\beta$ -Trehalosa	100
9	n.i.	
10	n.i.	
11	n.i.	
12	Celobiosa ( <i>E</i> )	82.6
13	n.i.	
14	Celobiosa ( <i>Z</i> )	17.4
	Laminaribiosa ( <i>E</i> )	82.2
	Maltulosa 1	45.2
15	Maltulosa 2	54.8
16	Nigerosa ( <i>E</i> )	80.9
17	Turanosa 1	51.8
18	Laminaribiosa ( <i>Z</i> )	17.8
	Turanosa 2	49.0
	Maltosa ( <i>E</i> )	73.5
19	Kojibiosa ( <i>E</i> )	83.8
20	Maltosa ( <i>Z</i> )	26.5
	Trehalulosa 1	46.0
21	Nigerosa ( <i>Z</i> )	19.1
	Trehalulosa 2	54.0
22	n.i.	
23	Palatinosa 1	48.1
	Gentiobiosa ( <i>E</i> )	80.1
24	kojibiosa ( <i>Z</i> )	16.2
25	Palatinosa 2	51.9

METILSILICONA		
VENTANAS	PICOS	%
26	Gentiobiosa (Z)	19.8
27	Melibiosa (E)	79.5
28	Isomaltosa (E)	79.6
29	Melibiosa (Z)	20.5
	Isomaltosa (Z)	20.4

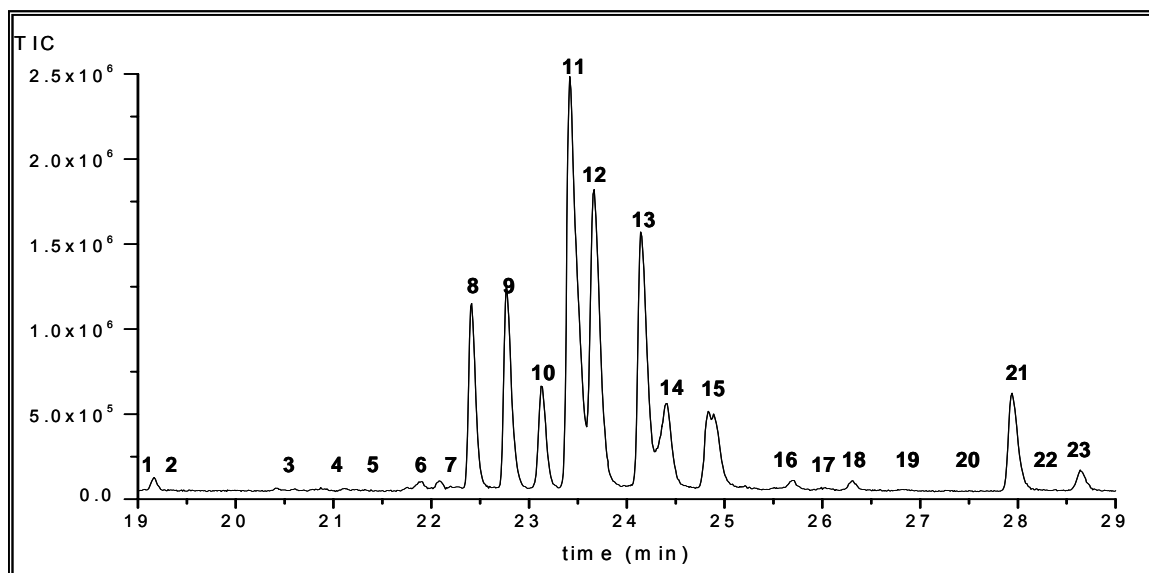
**Tabla 2.** Ventanas de retención consideradas en la columna de FeSi, con los compuestos y % de cada isómero que contribuyen a cada ventana.

FENILSILICONA		
VENTANAS	PICOS	%
1	n.i.	
2	Sacarosa	100
3	n.i.	
4	n.i.	
5	n.i.	
6	n.i.	
7	$\alpha,\alpha$ -Trehalosa	100
8	Maltulosa (E)	49.5
9	Celobiosa (E)	83.0
	Maltulosa (Z)	50.5
10	Celobiosa (Z)	17.0
	Laminaribiosa (E)	65.5
11	Turanosa 1	51.8
	Maltosa (E)	75.1
12	Nigerosa (E)	82.1
	Turanosa 2	48.2
	Maltosa (Z)	24.9
13	Laminaribiosa (Z)	34.5
	kojibiosa (E)	79.4
	Trehalulosa 1	46.0
14	Nigerosa (Z)	17.9
	Trehalulosa 2	54.0
	$\alpha,\beta$ -Trehalosa	100
15	kojibiosa (Z)	20.6
16	Palatinosa (E)	48.0
17	n.i.	
18	Palatinosa (Z)	52.0
19	Gentiobiosa (E)	81.0
20	Melibiosa (E)	80.6
	Gentiobiosa (Z)	19.0
21	Isomaltosa (E)	79.9
22	Melibiosa (Z)	19.4
23	Isomaltosa (Z)	20.1

En las figuras 2 y 3 se presentan unos cromatogramas típicos de los O-TMS derivados de los disacáridos presentes en la miel, empleando las columnas MeSi y FeSi respectivamente. Los números corresponden a las 29 y 23 ventanas definidas en los cromatogramas.



**Figura 1.** Perfil típico de disacáridos de una miel en la columna MeSi



**Figura 2.** Perfil típico de disacáridos de una miel en la columna de FeSi.

### 1.3.2. COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE CÁLCULO EN LA DETERMINACIÓN DE DISACÁRIDOS EN MUESTRAS DE MIEL SIMULADAS.

Se calculó, para la miel de referencia (S0) y para las 10 mieles simuladas con interferencias (S1-S10) la concentración de cada disacárido mediante tres distintos métodos:

- **Método R1.** Regresión múltiple con ordenada en el origen, . Basado en el modelo [1] de la Introducción
- **Método R2.** Regresión múltiple sin considerar la ordenada en el origen. Basado en el modelo [2] de la Introducción
- **Método IT.** Procedimiento de iteración basado en el modelo [4] de la Introducción, que se describe en el apartado 7.2.3 (IT).

Los resultados de concentración obtenidos mediante cada método se comparan con la composición teórica de la miel de referencia. Un método robusto debería dar una composición similar a la dicha miel, y presentar como residuos valores próximos a 3, 4, 5 y 6 para cuatro de las ventanas en las columnas MeSi y FeSi, y valores nulos para las restantes ventanas.

La composición de disacáridos obtenida para las distintas mieles se detalla en la tabla 3. En las tablas 4 y 5 se muestran los valores de los residuos obtenidos en las ventanas donde fueron añadidas las interferencias en la columna de MeSi y FeSi respectivamente.

Como cabría esperar, los tres métodos dan lugar a resultados correctos cuando se aplican a la miel sin interferencias (miel S0<sub>exp</sub>). La composición obtenida mediante los tres métodos es la misma y coincide con la propia de la miel original (S0<sub>teor</sub>). Los valores de los residuos son prácticamente nulos para los tres métodos.

Para comparar los resultados globales de los distintos métodos en su aplicación a las mieles con interferencias, se ha calculado el promedio de los valores absolutos de los errores en su determinación (valor "real" menos valor calculado por el método). Mientras que tanto la regresión R1 como la R2 dan lugar a un error promedio de 1.6 mg/g, la iteración presenta un error de 0.55 mg/g, muy inferior al anterior.

En el caso ideal, los residuos deberían ser nulos para todas las ventanas de integración excepto para aquellas en las que se hubiese simulado un compuesto interferente. Calculando para todas las ventanas y mieles simuladas (tablas 4 y 5) el promedio de los valores absolutos de los errores, se obtiene para el caso de la columna MeSi un valor de 0.89 mg/g para el método R1, de 0.65 mg/g para el método R2 y de 0.15 mg/g para el método de iteración. En el caso de las 23 ventanas de la columna FeSi los promedios son de 0.99 mg/g para R1, de 0.74 mg/g para R2 y de sólo 0.08 mg/g para la iteración.

**Tabla 3.** Composición en disacáridos de la miel de referencia ( $S0_{teor}$ ), de la miel sin interferencias calculada ( $S0_{exp}$ ) por los métodos R1,R2 e IT y de las mieles con interferencias simuladas (S1-S10).

		Sac	$\alpha\alpha$ Tr	$\alpha\beta$ Tr	Cel	Lam	Mltu	Nig	Tur	Malt	Koj	Trhlu	Pal	Gent	Isom	Mel
$S0_{teor}$		0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	10.4	20.6	15.6	13	10.1	2.4	0.1	12.7	0
$S0_{exp}$	R1	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	10.4	20.6	15.6	13	10.1	2.4	0.1	12.7	0
	R2	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	10.4	20.6	15.6	13	10.1	2.4	0.1	12.7	0
	IT	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	10.4	20.6	15.6	13	10.1	2.3	0.1	12.7	0
S1	R1	0.9	0.0	3.1	5.5	2.8	17.1	8.8	29.4	9.1	13.8	15.5	3.4	5.0	12.6	3
	R2	0.8	-0.1	3.0	5.4	2.7	16.9	8.7	29.2	9.1	13.7	15.4	3.2	4.9	12.4	2.8
	IT	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	8.0	26.8	11.4	13.0	11.2	2.3	0.1	12.7	0
S2	R1	0.9	0.0	6.73	2.88	1.33	20.5	10.7	20.5	15.7	15.9	10.6	5.3	-0.8	18.6	0.78
	R2	0.7	-0.2	6.61	2.74	1.24	20.2	10.6	20.3	15.6	15.7	10.5	5.0	-1.0	18.3	0.55
	IT	0.9	0.0	4.4	1.47	2.69	19.2	10.4	20.6	15.6	13.0	10.1	2.3	0.1	12.7	0.0
S3	R1	0.9	0.0	4.4	3.3	1.9	20.5	8.3	29.7	11.3	13.7	10.9	6.3	-1.0	12.7	0.1
	R2	0.1	-0.8	3.8	2.7	1.5	19.5	7.7	28.8	10.9	12.9	10.2	5.1	-1.7	11.6	-0.9
	IT	0.9	0	4.4	1.5	2.7	19.2	7.3	29.5	9.5	13	10.5	2.3	0.1	12.7	0
S4	R1	0.9	0	4.3	1.3	2.8	19.2	14.8	19.9	16	13.2	9.1	2.8	2.8	19.7	1.8
	R2	0.6	-0.3	4.1	1.1	2.7	18.8	14.6	19.6	15.9	13	8.9	2.4	2.6	19.3	1.5
	IT	0.9	0	4.4	1.3	2.7	19.2	14.1	20.6	15.6	13	8.9	2.3	0.1	12.7	0
S5	R1	0.9	0	3.3	4.2	3.7	22.1	12.7	23	13.9	12.0	13.3	5.8	2.7	15.1	-0.4
	R2	0.8	-0.1	6.0	0.8	6.1	20.7	12.7	22.8	16.1	12.1	10.4	5.7	-1.0	14.8	0.3
	IT	0.9	0	4.4	1.4	2.6	19.5	10.5	20.6	15.6	13.0	10.1	2.3	0.1	12.7	0
S6	R1	0.9	0	5.9	4.2	3.2	20.1	12.4	28.2	9.4	11.7	14.8	2.3	0.4	12.6	2.3
	R2	1.0	0.1	3.4	4.3	3.8	22.2	12.8	23.1	13.9	12.1	13.4	6.0	2.7	15.2	-0.3
	IT	0.9	0	4.4	1.5	2.6	19.2	6.8	30.6	8.6	13	10.6	2.3	0.1	12.7	0
S7	R1	0.9	0.0	6.1	0.9	6.1	20.9	12.8	23.0	16.1	12.2	10.5	5.9	-0.9	15.0	0.5
	R2	0.6	-0.3	5.8	4.0	3.1	19.7	12.1	27.9	9.2	11.4	14.6	1.8	0.2	12.2	2.0
	IT	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	9.0	24.7	12.9	13.0	10.5	2.3	0.1	12.7	0.0

		Sac	$\alpha\alpha$ Tr	$\alpha\beta$ Tr	Cel	Lam	Mltu	Nig	Tur	Malt	Koj	Trhlu	Pal	Gent	Isom	Mel
S8	R1	0.9	0.0	5.5	0.0	2.0	23.4	9.6	21.1	20.1	15.4	11.8	2.4	0.1	12.7	0
	R2	0.3	-0.6	5.1	-0.5	1.7	22.6	9.1	20.4	19.8	14.8	11.2	1.4	-0.4	11.8	-0.8
	IT	0.9	0.0	4.4	1.3	2.8	19.2	9.4	20.6	19.6	13	8.2	2.3	0.1	12.7	0
S9	R1	0.9	0	6.3	1.3	2.6	19.2	16.8	19.6	16.0	13.4	10.3	5.4	-1.0	16.2	2.3
	R2	0.7	-0.2	6.1	1.2	2.5	19.0	16.7	19.4	15.9	13.2	10.1	5.1	-1.2	15.9	2.1
	IT	0.9	0	4.4	1.3	2.7	19.2	15.3	20.6	15.6	13	8.7	2.3	0.1	12.7	0
S10	R1	0.9	0.0	3.8	1.8	4.4	18.3	10.9	20.8	15.0	14.5	12.3	5.3	-0.7	12.5	7.1
	R2	0.5	-0.4	3.5	1.5	4.2	17.8	10.6	20.3	14.8	14.0	11.9	4.6	-1.0	11.9	6.6
	IT	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	10.4	20.6	15.6	13.0	10.1	2.3	0.1	12.7	0.0

**Tabla 4.** Residuos obtenidos para la columna de MeSi en las ventanas donde se han añadido interferencias (T) por los 3 métodos evaluados (R1,R2 e IT).

Ventanas:		12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	23	24	25	26	27	28	
S1	T	6.0		5.0				4.0		3.0								
	R1	2.5	-0.1	0.2	1.1	1.3	0.5	0.4	-0.7	1.3	-0.1	-1.4	-0.2	-0.5	-1.1	-2.4	0.1	
	R2	2.5	0.0	0.2	1.2	1.3	0.5	0.4	-0.7	1.3	0.0	-1.4	-0.1	-0.5	-1.0	-2.4	0.1	
	IT	6.0	0.0	0.0	0.0	1.9	1.8	0.0	0.0	3.9	0.0	3.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	
S2	T					4.0				3.0			5.0		6.0			
	R1	-1.3	-0.2	0.3	-0.7	-0.3	0.0	0.2	1.6	-0.4	-0.2	-0.6	2.4	3.5	0.0	-0.6	1.4	
	R2	-1.3	0.0	0.3	-0.7	-0.2	0.0	0.2	1.6	-0.4	0.0	-0.7	2.5	3.5	0.2	-0.6	1.3	
	IT	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	3.0	5.1	0.0	0.0	6.0	
S3	T					6.0		3.0		5.0			4.0					
	R1	-1.9	-0.8	-0.1	-0.9	1.4	1.0	1.9	-0.6	-0.3	4.2	-0.6	-0.7	1.9	-0.4	-0.1	0.1	
	R2	-1.7	0.0	-0.3	-0.7	1.7	1.3	1.8	-0.6	-0.1	5.0	-1.0	-0.1	2.0	0.2	-0.1	0.0	
	IT	-0.1	0.0	0.0	0.0	2.6	1.4	3.1	0.0	0.3	5.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0	
S4	T					4.0				3.0			5.0				6.0	
	R1	-0.1	-0.3	0.0	-0.1	0.4	0.2	0.0	-0.2	-0.4	-0.3	0.8	-0.2	-0.2	4.3	-1.5	0.5	
	R2	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.5	0.3	0.0	-0.2	-0.3	0.0	0.6	0.0	-0.2	4.5	-1.5	0.4	
	IT	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	3.0	0.0	0.1	5.0	0.0	6.0	
S5	T	3.0				5.0				6.0			4.0					
	R1	0.3	-0.1	2.5	-0.9	3.0	1.7	-2.2	0.7	-0.8	-0.1	-0.8	0.0	-1.8	0.1	-0.4	2.2	
	R2	-2.4	0.0	-2.6	1.4	-1.8	-1.2	-0.1	0.9	2.8	0.0	2.3	0.2	-1.8	-0.5	0.3	2.1	
	IT	-0.1	0.0	-0.1	2.8	-0.1	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	6.0	0.0	0.1	0.0	0.0	4.0	
S6	T	4.0		5.0		6.0		3.0										
	R1	-2.4	0.1	-2.6	1.5	-1.8	-1.2	-0.1	0.9	2.9	0.1	2.2	0.2	-1.8	-0.4	0.3	2.1	
	R2	-2.4	4.0	-1.3	-0.5	3.4	2.1	0.7	1.1	0.1	0.0	-0.2	0.2	0.1	-0.1	-1.9	0.1	
	IT	-0.2	4.0	0.0	0.0	7.9	0.9	0.2	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	

Ventanas:		12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	23	24	25	26	27	28
S7	T			6.0		5.0	3.0										4.0
	R1	-2.4	3.7	-1.3	-0.6	3.3	2.0	0.7	1.1	-0.1	-0.3	-0.1	0.0	0.0	-0.3	-1.8	0.1
	R2	0.4	0.0	2.5	-0.9	3.1	1.8	-2.2	0.7	-0.7	0.0	-0.9	0.1	-1.8	0.2	-0.4	2.1
	IT	0.0	0.0	6.0	0.0	6.1	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	4.0
S8	T			6.0			3.0			5.0	4.0						
	R1	0.9	-0.6	-1.0	3.6	0.4	-0.5	-0.4	-2.1	-1.0	4.4	0.3	3.1	-0.1	-0.5	0.0	0.1
	R2	1.1	0.0	-1.1	3.7	0.7	-0.3	-0.4	-2.0	-0.8	5.0	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	IT	0.0	0.0	-0.1	6.0	0.8	0.0	0.0	0.0	1.2	5.0	0.0	4.0	0.1	0.0	0.0	0.0
S9	T		3.0			6.0							5.0	4.0			
	R1	-0.1	2.8	0.1	-0.1	0.8	0.4	0.2	-0.4	-1.4	-0.2	-0.5	-0.2	3.4	0.1	2.1	-2.7
	R2	0.0	3.0	0.1	0.0	0.8	0.5	0.2	-0.3	-1.4	0.0	-0.6	-0.1	3.4	0.2	2.1	-2.8
	IT	0.0	3.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	5.1	0.0	4.0	0.0
S10	T								4.0	5.0	3.0						6.0
	R1	-0.5	-0.4	-1.0	0.4	-0.5	-0.3	0.1	2.7	3.6	2.6	-0.6	-0.6	-1.6	-0.2	0.3	0.2
	R2	-0.4	0.0	-1.1	0.5	-0.4	-0.1	0.1	2.8	3.7	3.0	-0.8	-0.2	-1.5	0.2	0.3	0.2
	IT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	5.0	3.0	0.0	0.0	0.1	0.0	6.0	0.0

**Tabla 5.** Residuos obtenidos en las ventanas de FeSi donde se han añadido interferencias (T) por los 3 métodos evaluados (R1,R2 e IT).

Ventanas:		9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S1	T					4.0			3.0			5.0	6.0		
	R1	-2.4	-0.8	0.3	-1.3	0.9	-1.3	-0.3	2.5	-0.1	-0.5	1.0	2.7	0.1	-0.7
	R2	-2.4	-0.8	0.3	-1.3	0.8	-1.3	-0.2	2.5	0.0	-0.5	1.0	2.7	0.1	-0.6
	IT	0.0	0.0	-0.1	0.0	3.5	-0.2	0.0	3.1	0.0	0.1	5.0	6.0	0.0	0.0
S2	T	3.0					5.0							4.0	6.0
	R1	1.2	0.6	0.0	-0.2	-2.0	2.4	-0.7	-1.5	-0.2	-1.6	0.7	-0.4	-0.7	5.7
	R2	1.1	0.6	0.0	-0.2	-2.1	2.3	-0.6	-1.4	0.0	-1.5	0.7	-0.5	-0.7	5.9
	IT	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	4.0	6.0
S3	T	4.0						5.0	3.0	6.0					
	R1	2.0	-0.2	-1.5	-1.4	-0.3	0.2	4.3	1.0	5.2	-2.2	0.7	0.3	0.1	-0.6
	R2	1.7	0.2	-1.5	-1.6	-0.6	0.0	4.9	1.1	6.0	-2.1	0.9	0.1	0.0	0.0
	IT	3.9	0.0	0.0	-0.2	-0.2	0.3	5.0	3.1	6.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
S4	T				3.0				5.0			4.0	6.0		
	R1	0.1	-0.2	0.0	-0.3	0.3	-0.1	-0.2	-0.2	4.8	-0.2	-2.3	2.1	0.4	-0.5
	R2	0.0	-0.1	0.0	-0.4	0.2	-0.1	-0.1	-0.2	5.0	-0.2	-2.2	2.0	0.4	-0.4
	IT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.1	5.0	0.1	0.0	4.0	6.0	0.0

Ventanas:		9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S5	T	6.0	5.0		4.0						3.0				
	R1	-0.4	-2.2	3.3	-3.2	-0.7	1.7	0.1	-1.7	-0.1	4.2	0.8	-0.2	-1.9	2.8
	R2	2.2	3.9	0.0	1.4	-1.0	-1.1	0.2	-1.7	0.0	1.2	-2.1	-0.2	-1.9	0.1
	IT	5.8	5.1	0.0	3.9	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0
S6	T	5.0	3.0				6.0						4.0		
	R1	2.1	3.9	0.0	1.4	-1.1	-1.1	0.3	-1.6	0.1	1.2	-2.1	-0.2	-1.9	0.1
	R2	2.2	2.2	0.7	-3.7	-1.3	1.5	0.3	0.1	0.0	0.1	-0.3	2.1	0.1	-0.5
	IT	4.8	3.0	0.0	-0.2	-0.2	6.4	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	4.0	0.0	0.0
S7	T			5.0			4.0				6.0				3.0
	R1	2.3	2.0	0.7	-3.6	-1.2	1.6	0.1	0.0	-0.3	0.0	-0.4	2.1	0.1	-0.7
	R2	-0.5	-2.2	3.3	-3.2	-0.8	1.7	0.2	-1.7	0.0	4.2	0.8	-0.2	-1.9	2.9
	IT	0.0	0.0	4.9	-0.2	-0.2	4.0	0.0	0.1	0.0	6.1	0.0	0.0	0.0	3.0
S8	T			5.0		4.0	3.0			6.0					
	R1	-0.8	0.4	1.4	-0.5	1.8	1.3	-1.0	-0.1	5.4	-0.1	-0.2	0.1	0.1	-0.4
	R2	-1.0	0.7	1.4	-0.7	1.5	1.1	-0.5	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	IT	0.0	0.0	1.9	-0.2	4.8	4.2	0.0	0.1	6.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
S9	T				4.0		5.0	3.0						6.0	
	R1	0.1	0.0	0.2	-0.8	-0.3	1.9	2.8	-1.5	-0.2	-1.6	0.8	-1.6	3.3	-0.6
	R2	0.0	0.1	0.2	-0.9	-0.4	1.9	2.9	-1.5	0.0	-1.6	0.9	-1.7	3.2	-0.5
	IT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	4.9	3.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	6.0	0.0
S10	T		4.0							3.0	5.0		6.0		
	R1	0.2	2.6	0.4	-0.2	-2.6	-0.5	-0.6	-1.5	2.6	3.4	0.5	0.5	0.2	-1.7
	R2	0.0	2.8	0.4	-0.3	-2.8	-0.6	-0.3	-1.4	3.0	3.5	0.6	0.4	0.2	-1.4
	IT	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	3.0	5.1	0.0	6.0	0.0	0.0

Como resumen, podemos indicar que el método de iteración resulta notablemente ventajoso tanto por su determinación más exacta de los valores de la concentración como por la mejor detección y cuantificación de las posibles interferencias presentes.

Como ejemplos de estas ventajas, se presentan gráficamente los resultados de la aplicación de estos métodos a las mieles simuladas S1, S2 y S3.

• **Miel simulada 1 (S1).**

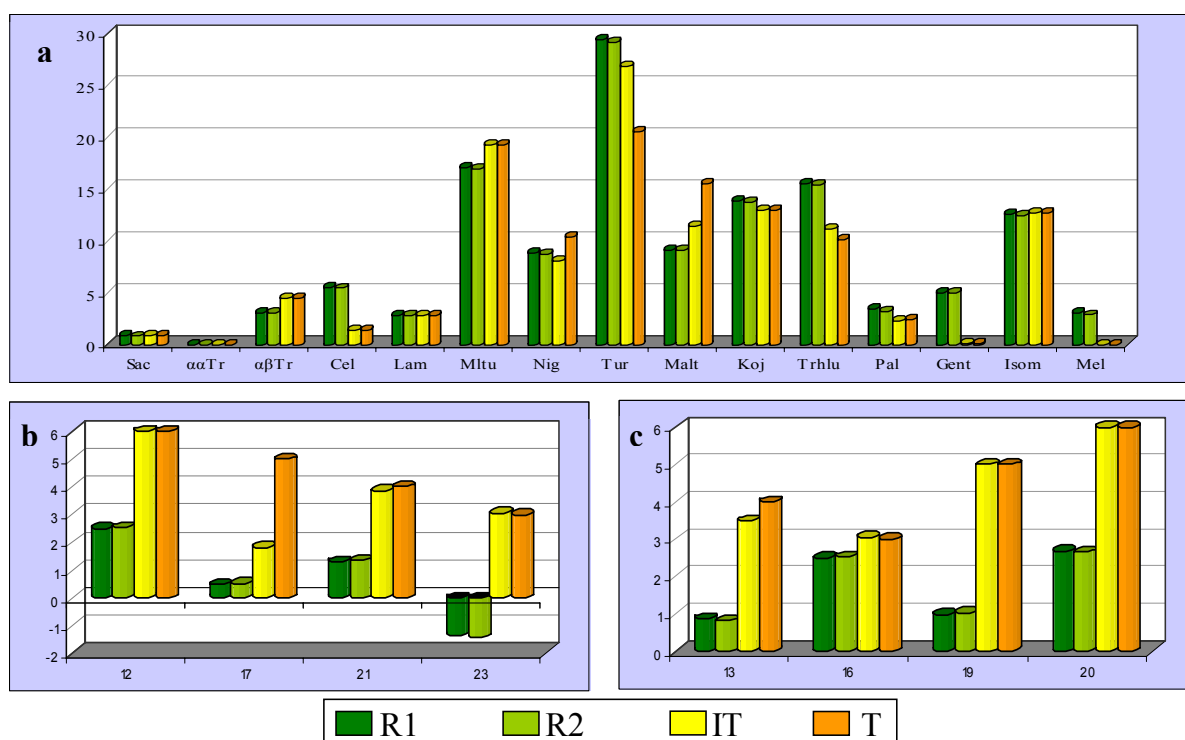
Para la miel simulada S1, una comparación de los valores calculados para su composición por los métodos R1, R2 y de iteración (IT) se muestra en la figura 3. Se observa que para sacarosa,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa, laminaribiosa, kojibiosa e isomaltosa (3,5,10 y 14) los tres métodos dan lugar a valores próximos al esperado. Por el contrario, nigerosa, turanosa y maltosa (7,8 y 9) presentan diferencias muy significativas entre valor original y valor



calculado por los tres métodos. Pero para muchos disacáridos, como  $\alpha,\beta$ -trehalosa, celobiosa, maltulosa, trehalulosa, palatinosa y gentiobiosa, (3, 4, 6,11, 12 y 13) los valores obtenidos por el método de iteración son mucho más próximos a los originales que los calculados por los métodos de regresión.

Esta miel incluyó interferencias de 3, 4, 5 y 6 mg /g en las ventanas 23, 21, 17 y 12 respectivamente en la columna MeSi. El método de iteración da lugar a estimaciones adecuadas para las ventanas 12, 23 y 21; para la ventana 17 el error es más elevado. Los métodos de regresión dan resultados similares entre sí, con errores muy superiores a los del método de iteración, llegando a estimar valores negativos para la ventana 23 (figura 3b).

Para FeSi se produce un comportamiento similar; el método de iteración da valores muy exactos para las ventanas 16, 19 y 20, con un error de 0.5 mg/g en la estimación de 4 mg/g para la ventana 13 (figura 3c). Esta misma ventana se estima con un error de 3.2 mg/g con los métodos de regresión, mientras que para las demás el error oscila entre 0.5 y 4 mg/g.

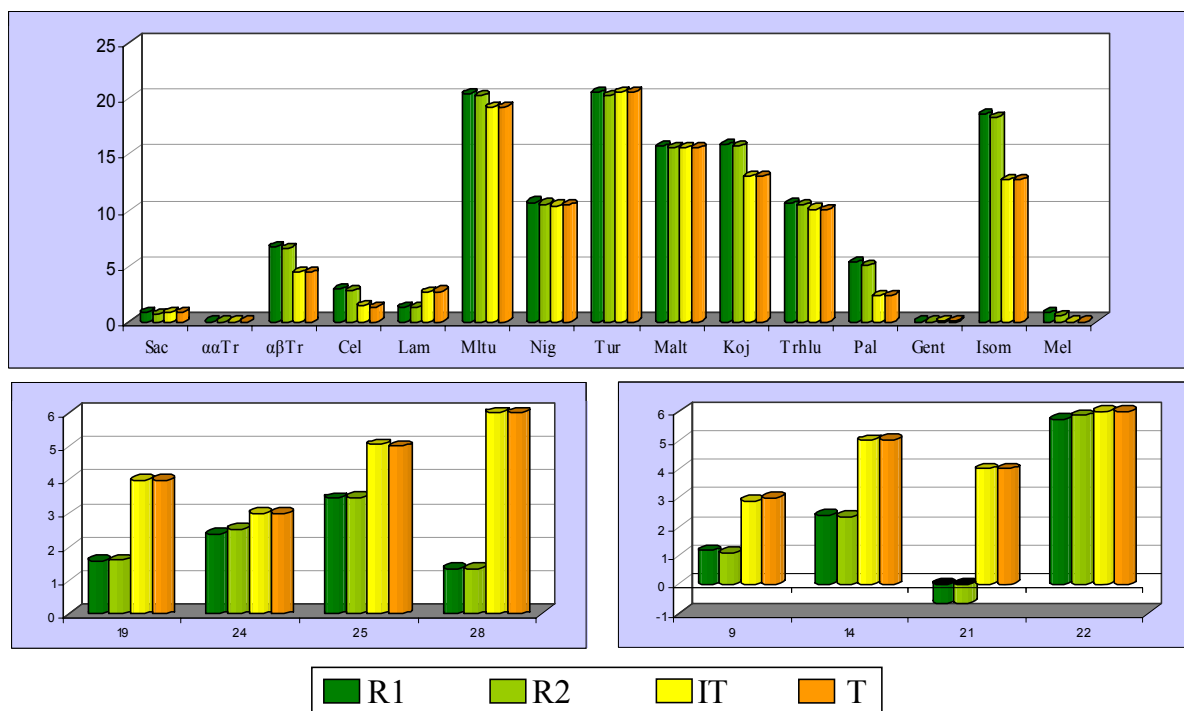


**Figura 3.** Resultados y residuos obtenidos por los distintos métodos (R1,R2,IT,T) para la miel simulada S1. El gráfico superior muestra las concentraciones (mg/g) calculadas de cada disacárido, y los inferiores muestran los residuos (mg/g) obtenidos en MeSi (izquierda) y FeSi (derecha).

• Miel simulada 2 (S2).

En la miel simulada S2, para  $\alpha,\beta$ -trehalosa, celobiosa, laminaribiosa, maltulosa, kojibiosa, palatinona, gentiobiosa, isomaltosa y melibiosa (2,4,5,6,10,12,13 y 14) el método de iteración es más exacto que los de regresión, como se observa gráficamente en la figura 4a. Para la gentiobiosa estos últimos métodos dan lugar a valores negativos. El resto de compuestos se calcula con suficiente exactitud mediante los tres métodos.

Para las ventanas en la columna MeSi, el método de iteración presenta residuos coincidentes con las interferencias de esta miel (3, 4, 5.1 y 6 para 3, 4, 5 y 6 mg /g). Los métodos de regresión dan lugar como en la miel S1 a resultados muy similares entre sí, pero bastante alejados de los valores reales, oscilando las diferencias entre 0.5 y 4.6 mg/g. Los resultados son similares en la columna FeSi, con errores de más de 4 mg/g para la ventana 21 para la que se calculan valores negativos.

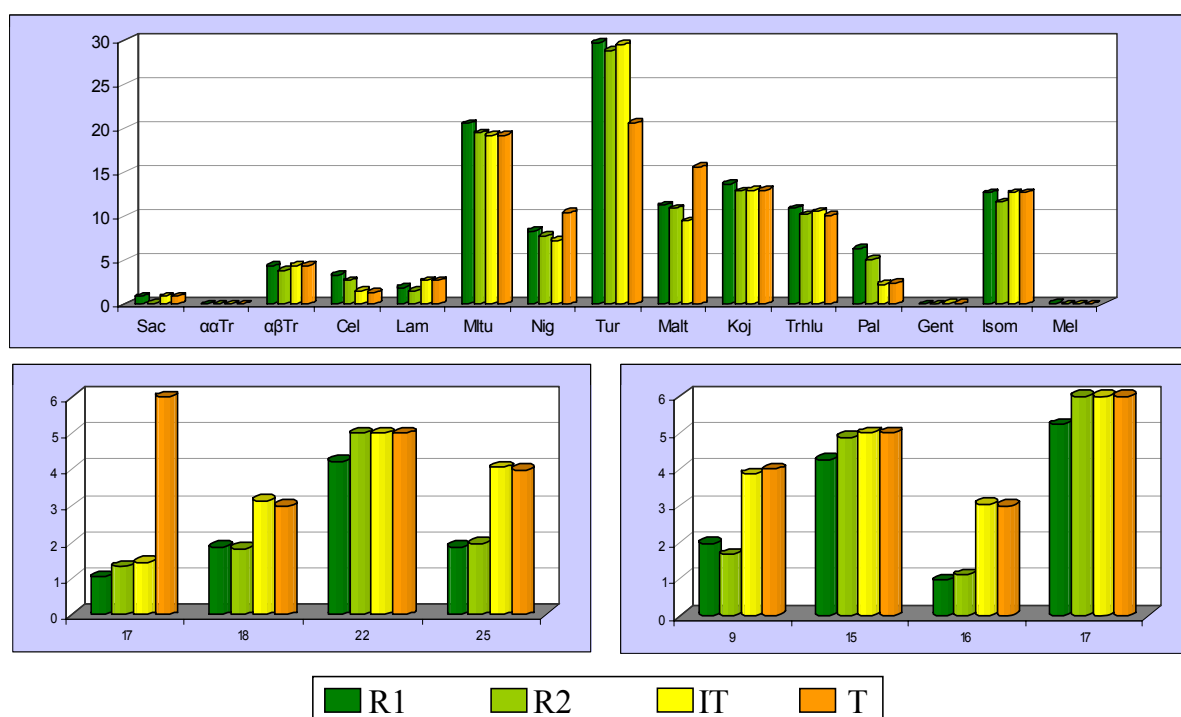


**Figura 4.** Resultados y residuos obtenidos por los distintos métodos (R1,R2,IT,T) para la miel simulada S2. El gráfico superior muestra las concentraciones (mg/g) calculadas de cada disacárido, y los inferiores muestran los residuos (mg/g) obtenidos en MeSi (izquierda) y FeSi (derecha).

### • Miel simulada 3 (S3)

Los resultados obtenidos para la concentración de los disacáridos en la miel simulada S3 se muestran gráficamente en la figura 5a. En este caso existe una mayor diferencia entre los residuos de las regresiones R2 y R1 debido a que la ordenada en el origen presenta un valor más elevado, lo que reduce en general la exactitud de los resultados obtenidos por el método S2. Puede observarse que los tres métodos dan lugar a resultados aceptables para sacarosa,  $\alpha,\beta$ -trehalosa, kojibiosa, trehalulosa e isomaltosa, mientras que conducen a errores del mismo signo y aproximada magnitud para la nigerosa, turanosa y maltosa. Para celobiosa, laminaribiosa, palatinosa y gentibiosa, los resultados de la iteración son mucho más exactos que los de las regresiones, pudiendo destacarse el caso de la gentibiosa, de concentración 0.1 mg/g en S3, para la que los métodos R1 y R2 predicen valores negativos, de  $-1.67$  y  $-1.02$  mg/g respectivamente.

La miel simulada S3 da lugar, como en el caso de las mieles S1 y S2, a unos resultados más exactos para las interferencias cuando se utiliza el método de iteración. Así puede comprobarse en las representaciones de las figuras 5b para MeSi y 5c para FeSi



**Figura 5.** Resultados (gráfico superior) y residuos en MeSi (izquierda) y FeSi (derecha) en mg/g obtenidos por los distintos métodos (R1,R2,IT,T) para la miel simulada S3.

#### 1.4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en la aplicación de los tres métodos de cálculo (R1, R2 e IT) a la determinación de la composición en disacáridos de mieles simuladas con interferencias, se confirma la mejora que supone el nuevo método de iteración, frente a los basados en regresión. Las principales ventajas que presenta este método se resumen a continuación:

- El método iterativo da lugar a valores de la concentración que en promedio son más próximos a los teóricos que los métodos basados en regresión, y evita la obtención de valores negativos de concentración sin significado físico.
- Permite detectar interferencias debidas a compuestos no identificados que coeluyen con los demás disacáridos, así como estimar su concentración en forma más exacta que los métodos de regresión.
- Aunque presenta limitaciones para la determinación de interferencias en ciertas posiciones del cromatograma, en estos casos la determinación por regresión tampoco es posible.
- Su aplicación no supone un incremento apreciable del tiempo total de análisis.

## CAPÍTULO 2

### DETERMINACIÓN DE MONO-, DI- Y TRISACÁRIDOS EN MIELES UNIFLORALES ESPAÑOLAS

#### 2.1. INTRODUCCIÓN

La caracterización de las mieles uniflorales resulta de gran importancia en su aplicación al control de calidad de la miel, ante los posibles fraudes que puedan cometerse con respecto a su origen o su posible adulteración (Bianchi *et al.*, 2005).

Numerosos estudios han tratado de relacionar la composición de azúcares de la miel con su origen botánico (Mateo *et al.*, 1996; Hörvath *et al.*, 1997; Devillers *et al.*; 2004, Cotte *et al.*, 2004). Debido al origen de los carbohidratos de la miel, formados por acción de las enzimas de las abejas sobre la sacarosa del néctar, es esperable que todas las mieles contengan los mismos azúcares. Sin embargo, las distintas proporciones en que aparece cada uno de ellos parecen depender en parte del origen botánico de la miel, aunque también en cierta medida del origen geográfico y las condiciones climáticas.

Para la diferenciación entre mieles de origen floral y de mielatos se ha recurrido frecuentemente al estudio de los carbohidratos. El mielato o mielada contiene una mezcla mucho más compleja de azúcares que el néctar, y el contenido en azúcares reductores y en oligosacáridos de las mieles procedentes de mielatos es notablemente superior al de las mieles florales (Doner, 1977). Además ciertos oligosacáridos, como la melecitosa, han sido considerados característicos de los mielatos (Doner, 1977).

Aunque entre las mieles florales las diferencias son menos claras, y no existe ningún método que permita una clara asignación de sus orígenes, el análisis de los perfiles de carbohidratos con ayuda de técnicas estadísticas multivariantes puede aportar una información muy útil para la determinación del origen botánico de una miel (Anklam, 1998).

En un estudio llevado a cabo por Mateo (Mateo *et al.*, 1996) sobre la composición en carbohidratos de mieles de romero, eucalipto, cítricos, lavanda, girasol, brezo y mielato, los parámetros más útiles para la clasificación de los distintos orígenes florales fueron las

concentraciones de fructosa, glucosa, maltosa y la relación glucosa/agua. Mediante la utilización de estos parámetros pudieron clasificarse correctamente el 71.6% de las muestras estudiadas. Las mieles de girasol presentaron valores muy altos de glucosa, fructosa y de la relación entre el contenido en glucosa y la humedad, y bajas concentraciones de maltosa, kojibiosa y maltulosa. Las mieles de eucalipto mostraron un alto contenido en fructosa y maltosa, y una elevada relación entre glucosa y agua debida a la baja humedad de estas mieles. Las concentraciones de sacarosa en las mieles de cítricos fueron significativamente más altas que en otros orígenes, aunque otros disacáridos como kojibiosa y maltulosa presentaron los valores más bajos. Las concentraciones más altas de estos disacáridos fueron las obtenidas en las mieles de mielato.

Los perfiles de varias mieles de brezo, de dos especies de lavándula (*Lavandula stoechas* y *Lavandula latifolia*), de tomillo, multiflorales y mieles de bosque de la misma zona geográfica de España fueron evaluados en un estudio llevado a cabo recientemente por Nozal (Nozal *et al.*, 2005). Los valores medios de los azúcares trehalosa, erlosa, melezitosa y maltotriosa mostraron diferencias significativas entre los diferentes orígenes, lo que sugiere que estos azúcares podrían desempeñar un importante papel en la caracterización de los orígenes botánicos considerados. Entre el 80% y el 100% de las muestras fueron clasificadas correctamente mediante un análisis discriminante canónico en 4 pasos.

Devillers empleó el análisis discriminante por pasos para la clasificación de 469 mieles de abeto, brezo, castaño, lavándula, acacia, colza y girasol. Las variables utilizadas (concentración de fructosa, glucosa y rafinosa, junto con los valores de conductividad, acidez libre y pH) permitieron la correcta asignación del 100% de las muestras estudiadas.

En este capítulo se presentan los resultados del análisis de carbohidratos de 104 muestras de miel, entre las que se encuentran mieles de cítricos (*Citrus sp.*), de romero (*Rosmarinus officinalis*), de eucalipto (*Eucalyptus sp.*, principalmente *E. globulus* y *E. camaldulensis*) y de brezo (géneros *Erica* y *Calluna*). Este estudio forma parte de un proyecto de investigación destinado a la caracterización de los tipos más importantes de mieles uniflorales españolas (CAL2001-066-C7-5).

Los análisis se han llevado a cabo siguiendo un método previamente desarrollado en nuestro laboratorio basado en la formación de las TMS-oximas como derivados de los

azúcares, y en su análisis por cromatografía de gases, utilizando dos columnas para facilitar la identificación de los compuestos que coeluyen.

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la complejidad de la zona de elución de los disacáridos y la ausencia de algunos patrones comerciales ha impedido hasta el momento la identificación de otros posibles compuestos que eluyen en esta zona. Estos compuestos no son tenidos en cuenta en la determinación cuantitativa de los disacáridos conocidos cuando se aplican las técnicas habituales, lo que puede producir importantes errores. Para tratar de evitar este problema, se ha desarrollado un procedimiento de cálculo, descrito en el capítulo 1, que ha mostrado una mayor robustez frente a este tipo de determinaciones que la regresión múltiple por mínimos cuadrados, comúnmente utilizada hasta el momento, y que además permite detectar y estimar la concentración de los posibles compuestos no identificados presentes en las muestras, gracias al uso de dos columnas cromatográficas diferentes.

El método de análisis y el procedimiento de cálculo se han aplicado a las 104 muestras de miel antes mencionadas, permitiendo la identificación y la determinación cuantitativa de los dos monosacáridos mayoritarios (glucosa y fructosa), de 15 disacáridos y de 9 trisacáridos, además de la detección de otros compuestos no identificados hasta el momento.

A partir de los resultados cuantitativos para estos compuestos, y empleando también otros parámetros derivados de ellos, como la relación fructosa/glucosa, la suma de azúcares, los monosacáridos totales etc., se ha investigado la presencia de pautas en la composición de azúcares de las mieles analizadas mediante la aplicación de distintas técnicas estadísticas multivariantes, con el principal objetivo de evaluar la relación entre la concentración de los carbohidratos en la miel y su origen floral.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN MIELES

#### 2.2.1.1. Patrones

Los patrones de monosacáridos y trisacáridos utilizados para la identificación de los carbohidratos de la miel fueron los siguientes:

- Glucosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Fructosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Rafinosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- 1-Kestosa (Fluka, Buchs, Switerland).
- Erlosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Melecitosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Theanderosa (cedida por Dr. Rastall. Reading, UK)
- Maltotriosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Panosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Isomaltotriosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Los patrones de disacáridos fueron los descritos en el Capítulo 1. Apartado 1.2.1.1.

Se utilizó fenil-  $\beta$ -glucósido (Fluka, Buchs, Switerland) como patrón interno.

#### 2.2.1.2. Muestras

Dentro del proyecto “Características de calidad de las principales producciones de miel españolas” orientado a la caracterización de cuatro tipos de mieles españolas considerados de mayor importancia (eucalipto, romero, brezo y cítricos), el subproyecto “Caracterización de carbohidratos” contempla la determinación cuantitativa de sus carbohidratos en un número elevado de muestras.

Se han estudiado 104 muestras de mieles uniflorales españolas de orígenes botánicos seleccionados, como se recoge en la siguiente tabla:



**Tabla 1.** Origen y número de mieles analizadas de cada origen.

CÓDIGO	NOMBRE COMÚN	NOMBRE BOTÁNICO	Nº
A	Azahar	<i>Citrus sp.</i>	15
R	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	34
B	Brezo	<i>Erica and Calluna</i> genus	33
E	Eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	22

### 2.2.1.3. Derivatización de las muestras de miel.

Se prepararon disoluciones 1:50 de miel en agua/etanol (1/4). Para cada muestra, se evaporó 1 ml de la disolución (20 mg de miel) junto con 0.5 mg de fenil- $\beta$ -glucósido, utilizado como patrón interno.

Las TMS-oximas de los azúcares de las muestras anhidras de miel se formaron siguiendo el procedimiento descrito para los patrones de disacáridos en el apartado 1.2.1.2.

### 2.2.1.4. Análisis GC-FID

Los análisis fueron llevados a cabo usando nitrógeno como gas portador en modo split (1:20), en dos cromatógrafos de gases con detectores de ionización de llama (FID) (HP 5890 y Carlo Erba HRGC 5160) usando dos columnas de distinta fase estacionaria (denominadas MeSi y FeSi en el capítulo 1, apartado 1.2.1.3): las características de estas dos columnas y sus condiciones de operación se detallan en dicho apartado.

### 2.2.1.5. Análisis GC-MS

Con el fin de ayudar a la identificación de disacáridos, las muestras de interés se inyectaron también en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890 Series) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo (Agilent 5973 Network) con ionización por impacto electrónico. La cámara de ionización se mantuvo a una temperatura de 280 °C. El rango de masas detectadas fue de 60-600 u.m.a. y la temperatura de la fuente 230°C.

Las columnas y los programas de temperatura utilizados fueron similares a los descritos en el apartado anterior. Se utilizó helio como gas portador.

### 2.2.1.6. Análisis cuantitativo

La similitud entre los distintos isómeros hace que sus factores de respuesta ( $f_R$ ) frente al patrón interno (fenil- $\beta$ -glucósido) sean muy similares (Scanion *et al.*, 1985), por lo que se calculó un valor medio para monosacáridos calculado a partir de la inyección de glucosa y fructosa con el patrón interno, un valor medio para disacáridos, obtenido mediante inyecciones conjuntas del patrón y de los disacáridos sacarosa,  $\alpha,\beta$ -trehalosa, maltosa e isomaltosa, y un valor medio para trisacáridos, obtenido a partir de patrones de 1-kestosa, erlosa y melecitosa, mediante su inyección junto con fenil- $\beta$ -glucósido. La fórmula para su determinación fue:

$$(A_i/A_p) = f_R (W_i/W_p) \implies f_R = (A_i/A_p) \times (W_p/W_i)$$

donde  $f_R$  es el factor de respuesta del azúcar con respecto al patrón interno,  $A_i$  y  $A_p$  son las áreas en unidades de integración del patrón interno y del patrón del compuesto  $i$  respectivamente y  $W_p$  y  $W_i$  las cantidades de patrón interno y del compuesto.

La concentración de monosacáridos y trisacáridos se calculó directamente a partir del área de integración de sus picos, ya que no se dan solapamientos en estas zonas. En el caso de los disacáridos, la integración se extendió a zonas de retención determinadas (ventanas de retención) (capítulo 1, apartado 1.3.1.) y a partir de los valores obtenidos para ellas, y mediante la aplicación del procedimiento de cálculo desarrollado (capítulo 1, apartado 1.2.3.) se obtuvo la concentración de cada disacárido.

La ecuación utilizada para el cálculo de los monosacáridos, trisacáridos y las ventanas de disacáridos, parte de la empleada para calcular el factor de respuesta, siendo ahora  $W_p$  (mg) la incógnita de la ecuación. El resultado se dividió por la cantidad de miel pesada ( $w_{miel}$ ) para obtener la concentración del compuesto ( $C_p$ ), expresada en mg/g miel.

$$W_p = W_i \times (A_p/A_i) \times f_r$$

$$C_p = W_p / w_{miel}$$

La adquisición y tratamiento de datos se llevó a cabo empleando el programa Chrom Card 2.20 (CE Instruments, Milan, Italia) para Thermo Electron Corporation.

### 2.2.2. DETECCIÓN DE INTERFERENCIAS EN EL PERFIL DE DISACÁRIDOS

La presencia de una interferencia daría lugar, en el caso de ser detectada por el método de cálculo, a un residuo positivo en la determinación cuantitativa de la muestra de miel para la ventana de retención en la que se eluyera la citada interferencia. En el caso de que la interferencia diese lugar a dos picos, los residuos positivos aparecerían en dos de las ventanas en cada columna.

El valor de los residuos coincidiría, en un caso ideal, con la correspondiente concentración de la interferencia: la relación entre los valores de las correspondientes ventanas debería ser por este motivo lineal. Cabe esperar, sin embargo, que en un caso real los errores del método, la presencia de otras interferencias y la coelución con distintos compuestos identificados enmascaren los valores de los residuos, como se ha comprobado en algunos casos del estudio comparativo a partir de mieles simuladas (capítulo 1, apartado 1.3.2.). La relación lineal puede por tanto no ser clara.

La confirmación de que dos residuos (uno en una ventana de MeSi y otro en FeSi) corresponden a una misma interferencia puede llevarse a cabo mediante el registro de sus espectros de masas, comprobando que éstos (después de la eliminación de la contribución de posibles coeluyentes, si es necesario) son similares.

Como resultado, cada interferente quedaría caracterizado mediante el tiempo de retención (ventana de retención) de su o sus derivados en las dos columnas, y mediante el espectro de masas correspondiente.

En la práctica, este método se ha desarrollado en varios pasos:

- Se partió de las matrices de residuos en las columnas MeSi y FeSi obtenidas por la aplicación del programa de cálculo a las 114 mieles analizadas por GC. Se unieron ambas matrices para conseguir una matriz conjunta de 114 filas (muestras de miel) x 52 columnas (29+23 ventanas).
- Se calculó (BMDP) la correlación entre variables (residuos de las ventanas) para la matriz anterior, obteniendo  $52 \times 51/2 = 1326$  coeficientes de correlación.
- Se seleccionaron los coeficientes de correlación con valor  $>0.4$  entre al menos una variable de la columna MeSi y otra de la columna FeSi.
- Se comprobó si existían otras variables en las columnas MeSi y FeSi con correlaciones elevadas con las anteriores.
- Se seleccionaron aquellas muestras de miel con mayores valores de los residuos para las ventanas seleccionadas.
- Dichas muestras se analizaron mediante GC-MS para registrar los correspondientes espectros de masas.

### 2.2.3. CLASIFICACIÓN DE MIELES UNIFLORALES.

Para los cálculos multivariantes y de correlación se empleó el paquete de programas BMDP en su versión BMDPDYN para PC (BMDP Statistical Software release 7). Los coeficientes de correlación se obtuvieron como salida intermedia del programa 4M de análisis factorial. Para el análisis discriminante por pasos se empleó el programa 7M, mientras que para la regresión lineal múltiple se utilizó el programa 2R.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN MIELES.

#### 2.3.1.1. Cálculo de los factores de respuesta relativos ( $f_R$ ).

Los factores de respuesta obtenidos con respecto al patrón interno (fenil- $\beta$ -glucósido) se detallan en la tabla 2:

**Tabla 2.** Factores de respuesta relativos medios de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos en las dos columnas utilizadas.

COMPUESTOS	$f_{R\ MeSi}$	$f_{R\ FeSi}$
Monosacáridos	1.549	1.401
Disacáridos	0.971	0.967
Trisacáridos	0.957	1.222

Siguiendo nuestra definición del factor de respuesta, un valor de  $f_R > 1$  indica una respuesta del patrón interno superior a la del compuesto correspondiente. Esto ocurre con los monosacáridos en ambas columnas, aunque la diferencia en metilsilicona fue mayor que en fenilsilicona. Los disacáridos presentaron una respuesta muy similar en las dos fases, y valores muy próximos a 1, es decir, respuestas similares a las del patrón interno. Lo más sorprendente fue la diferencia obtenida para los trisacáridos en ambas columnas: mientras que en metilsilicona el valor es muy próximo a 1, en fenilsilicona la respuesta relativa de estos compuestos disminuyó notablemente.

#### 2.3.1.2. Determinación de monosacáridos y trisacáridos.

Tras el análisis de 104 muestras de miel y la posterior integración de sus cromatogramas se ha calculado para cada uno de los monosacáridos y trisacáridos el valor de su concentración expresado en mg/g de miel de acuerdo con la fórmula indicada en el apartado 2.2.1.5. Los resultados obtenidos están reflejados en la siguiente tabla (tabla 3).

. Los monosacáridos y trisacáridos fueron identificados a partir de la inyección de sus patrones comerciales, salvo en los casos de neokestosa y 6-kestosa, donde la ausencia de los

mismos sólo nos permitió su identificación tentativa a partir de datos bibliográficos de retención y de sus espectros de masas.

**Tabla 3.** Concentraciones de los monosacáridos (*MS*) y los trisacáridos cuantificados en las 114 mieles estudiadas de eucalipto (*E*), romero (*R*), brezo (*B*) y azahar (*A*). *N* y *O* indican el número y origen de cada muestra. Los monosacáridos cuantificados han sido fructosa (*Fru*) y glucosa (*Glu*). Las 19 columnas restantes hacen referencia a los trisacáridos: rafinosa (*R*), 1-kestosa (*k*), neo-kestosa (*Nk*), erlosa (*Erl*), melezitosa (*Mlz*), theanderosa (*Tnd*), Maltotriosa (*Mttr*), panosa (*Pan*) e Isomaltotriosa (*Imtt*). Los compuestos no identificados (*ni*) en la zona de elución de trisacáridos se han numerado por orden creciente de retención. Las concentraciones están expresadas en mg/g.

N°	O	MS		TRISACÁRIDOS																		
		<i>Fru</i>	<i>Glu</i>	R+k	6K	Nk	Erl	Mlz	ni 1	Tnd	ni 2	ni 3	ni 4	Mtt	ni 6	ni 7	ni 8	ni 9	ni10	Pan	ni11	Imtt
1	E	378.2	244.9	0.9	0.2	0.7	1.9	0.2	0.0	1.4	0.1	0.9	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4	0.6	3.1	2.7	0.9	2.6
2	E	368.6	236.0	0.7	0.1	0.5	1.5	0.2	0.0	1.1	0.1	0.7	0.0	0.4	0.2	0.1	0.3	0.5	2.3	2.0	0.7	1.8
3	E	418.5	301.5	0.6	0.1	0.5	2.2	0.2	0.0	0.8	0.1	0.9	0.1	0.4	0.2	0.1	0.3	0.3	1.6	2.0	0.7	1.0
4	E	311.1	251.8	0.5	0.1	0.4	1.7	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.8	0.2	0.0	
5	E	377.4	280.5	0.4	0.1	0.3	0.7	0.1	0.3	0.3	0.0	0.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.7	1.0	0.1	0.4
6	R	362.0	288.8	0.4	0.2	0.2	3.4	0.8	0.5	0.2	0.4	0.8	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.0	0.4	0.9	0.1	0.0
7	R	439.1	361.3	1.5	0.3	0.4	9.9	1.3	0.7	0.9	0.1	1.0	0.3	0.4	0.1	0.1	0.2	0.2	1.0	1.8	0.3	0.2
8	B	405.8	288.0	1.2	0.3	0.3	1.2	0.5	0.4	0.3	0.2	0.8	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	1.5	1.5	0.3	0.2
9	B	412.2	337.9	0.2	0.1	0.0	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.5	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.7	0.2	0.0
10	E	353.9	295.4	0.4	0.2	0.2	2.3	0.9	0.5	0.1	0.2	0.7	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.0	0.4	0.9	0.2	0.0
11	E	376.7	292.2	0.5	0.1	0.3	2.6	0.7	0.5	0.2	0.1	0.6	0.1	0.3	0.0	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.1	0.0
12	A	411.2	335.8	0.9	0.2	0.4	2.5	0.5	0.5	0.2	0.1	0.4	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.5	0.1	0.0
13	A	331.3	259.3	1.6	0.2	0.6	2.4	0.5	0.5	0.5	0.2	0.8	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	1.1	1.6	0.4	0.2
14	B	368.1	251.9	1.8	0.3	0.3	2.5	1.1	0.0	0.3	0.6	1.1	0.2	0.9	0.1	0.0	0.4	0.3	2.1	2.8	0.9	0.6
15	E	379.5	296.5	0.8	0.2	0.5	4.5	0.8	0.0	0.3	0.2	1.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.3	0.1	0.7	1.5	0.5	0.1
16	E	378.0	303.7	0.8	0.4	0.4	3.9	0.5	0.0	0.3	0.2	1.3	0.2	0.4	0.1	0.1	0.3	0.1	0.6	1.5	0.4	0.1
17	A	407.0	320.6	1.5	0.2	0.6	3.2	0.5	0.1	0.4	0.2	1.0	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	0.1	0.9	1.6	0.5	0.2
18	R	397.3	340.9	1.5	0.3	0.4	3.9	0.4	0.1	0.3	0.1	0.9	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5	1.2	0.3	0.1
19	R	383.8	302.0	1.9	0.4	0.5	15.1	1.4	0.3	1.3	0.3	1.8	0.3	0.6	0.2	0.2	0.4	0.2	1.5	2.9	0.9	0.3
20	R	455.9	364.2	0.9	0.2	0.2	3.3	0.6	0.0	0.4	0.2	1.1	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3	0.1	1.0	1.9	0.5	0.2
21	R	358.9	303.0	1.7	0.2	0.4	4.7	0.5	0.1	0.4	0.1	0.9	0.1	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	1.1	1.9	0.6	0.3
22	R	434.1	375.2	0.3	0.1	0.2	1.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.5	0.1	0.0
23	B	386.9	317.4	3.0	0.3	0.3	1.0	0.5	0.1	0.4	0.2	0.6	0.0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	1.5	1.6	0.6	0.4

N°	O	MS		TRISACÁRIDOS																		
		Fru	Glu	R+k	6K	Nk	Erl	Mlz	ni 1	Tnd	ni 2	ni 3	ni 4	Mtt	ni 6	ni 7	ni 8	ni 9	ni10	Pan	ni11	Imtt
24	B	333.2	260.3	2.5	0.3	0.4	0.5	1.0	0.0	0.5	0.2	0.7	0.0	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	1.5	1.9	0.8	0.3
25	B	367.5	320.3	3.8	0.8	0.5	1.4	1.2	0.1	0.3	0.1	0.6	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	1.1	1.5	0.6	0.2
26	R	377.7	317.7	1.2	0.2	0.3	4.8	0.8	0.3	0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.7	0.2	0.1
27	R	334.9	257.6	2.5	0.4	0.5	4.7	1.6	0.7	0.6	0.3	1.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.6	0.5	1.0	1.3	0.1	0.1
28	B	341.0	277.7	5.4	0.5	0.4	3.1	1.4	0.2	0.5	0.2	0.8	0.1	0.5	0.1	0.1	0.3	0.4	1.7	2.2	0.4	0.3
29	E	404.1	300.5	3.2	0.4	0.4	2.5	1.1	0.2	0.4	0.1	0.7	0.1	0.4	0.1	0.1	0.3	0.3	1.4	1.8	0.3	0.3
30	B	445.6	364.6	2.6	0.2	0.1	2.6	0.7	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.3	0.0	0.0
31	B	376.8	317.4	4.6	0.4	0.4	3.3	1.0	0.3	0.5	0.2	0.7	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.4	1.5	2.2	0.3	0.2
32	B	378.4	322.1	1.5	0.2	0.2	1.3	0.4	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.2	0.7	1.0	0.1	0.1
33	B	410.5	331.9	3.1	3.6	0.4	0.4	0.5	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	1.9	0.4	0.2
34	B	335.6	250.9	1.2	0.4	0.1	0.8	0.3	0.1	0.1	0.3	0.7	0.1	0.6	0.1	0.1	0.3	0.3	1.1	1.2	0.2	0.2
35	B	307.1	252.8	0.8	1.2	0.2	1.1	1.4	0.0	0.3	0.1	0.5	0.4	0.9	0.1	0.1	0.3	0.2	1.2	1.6	0.2	0.2
36	B	396.2	283.5	1.9	0.4	0.3	0.9	0.8	0.1	0.3	0.2	1.0	0.1	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4	2.0	2.3	0.4	0.3
37	R	390.1	331.1	2.9	0.3	0.4	11.4	1.5	0.2	0.8	0.2	1.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.4	0.1	0.5	2.0	0.4	0.1
38	R	379.6	332.3	2.1	0.3	0.4	4.5	2.2	0.1	1.1	0.3	1.4	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	0.3	2.1	2.9	0.4	0.3
39	E	389.5	307.5	1.1	0.2	0.4	1.5	1.5	0.1	0.7	0.3	1.2	0.2	0.7	0.2	0.2	0.4	0.4	2.0	2.4	0.4	0.7
40	R	377.7	303.6	3.6	0.3	0.3	11.3	1.6	0.1	1.2	0.2	1.6	0.3	0.6	0.3	0.2	0.4	0.2	1.3	2.6	0.2	0.3
41	R	318.2	301.4	1.4	0.2	0.3	9.7	1.0	0.1	0.6	0.1	0.8	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.6	1.4	0.1	0.1
42	R	303.8	273.4	1.4	0.2	0.3	7.4	0.9	0.1	0.5	0.1	0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.7	1.4	0.2	0.1
43	R	306.4	297.3	1.4	0.3	0.3	9.5	0.9	0.1	0.5	0.1	0.8	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	0.7	0.8	0.1	0.2
44	R	326.5	272.8	0.9	0.2	0.2	4.9	0.6	0.1	0.3	0.1	1.1	0.2	0.4	0.1	0.1	0.2	0.0	0.6	1.4	0.1	0.1
45	R	301.4	254.7	1.0	0.2	0.3	2.6	0.4	0.1	0.3	0.1	0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.6	1.3	0.1	0.1
46	R	313.3	267.5	0.9	0.2	0.2	5.4	0.7	0.1	0.6	0.2	0.9	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.8	1.5	0.1	0.1
47	R	300.3	273.4	0.7	0.3	0.4	8.3	0.8	0.1	0.4	0.1	0.9	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	1.0	0.1	0.0
48	R	310.2	270.4	1.2	0.2	0.3	7.3	1.3	0.1	0.8	0.2	1.6	0.4	0.6	0.2	0.2	0.3	0.3	1.4	2.5	0.3	0.2
49	R	355.6	226.7	1.1	0.2	0.2	0.9	1.9	0.1	1.3	0.4	1.5	0.2	0.5	0.3	0.2	0.4	0.6	3.0	3.7	0.4	0.4
50	A	376.5	327.0	1.4	0.2	0.3	6.2	1.1	0.1	0.4	0.1	0.9	0.3	0.6	0.2	0.1	0.2	0.4	0.7	1.8	0.2	0.0
51	A	345.7	265.0	2.2	0.3	0.7	6.3	1.4	0.1	0.7	0.1	0.7	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1	0.5	1.2	0.1	0.1
52	E	439.3	358.2	0.5	0.2	0.3	2.9	1.9	0.0	0.3	0.4	1.7	0.3	0.7	0.2	0.1	0.3	0.2	0.9	1.5	0.2	0.1
53	R	384.3	309.1	1.2	0.1	0.4	1.5	0.8	0.2	0.8	0.4	1.6	0.2	0.5	0.3	0.2	0.2	0.6	2.1	2.2	0.6	0.5
54	A	366.5	310.3	1.2	0.1	0.3	0.8	0.6	0.1	0.4	0.2	0.9	0.2	0.5	0.1	0.1	0.3	1.1	0.7	1.3	0.4	0.1
55	B	351.6	290.4	0.5	0.0	0.2	0.5	0.8	0.1	0.8	0.5	2.0	0.4	1.3	0.5	0.3	0.5	0.7	3.8	3.4	0.7	0.8
56	B	329.1	253.8	3.0	0.2	0.3	30.0	0.0	0.2	0.7	1.1	2.6	0.6	1.0	0.4	0.2	0.7	0.7	4.6	4.5	1.1	1.3
57	A	414.4	338.7	1.3	0.2	0.4	4.4	0.9	0.6	0.4	0.1	1.1	0.2	0.4	0.1	0.1	0.2	0.2	0.8	1.6	0.1	0.1
58	R	373.4	275.6	1.0	1.4	0.1	1.4	0.6	0.0	0.9	0.4	0.8	0.2	0.5	0.2	0.1	0.4	0.5	2.5	3.3	0.4	0.4
59	E	381.6	280.4	0.9	0.2	0.3	3.8	0.9	0.1	0.4	0.2	1.2	0.2	0.6	0.1	0.1	0.4	0.3	1.3	1.6	0.2	0.0
60	R	415.7	343.3	0.9	0.3	0.3	6.2	1.2	0.1	0.6	0.2	1.4	0.2	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4	1.5	2.2	0.2	0.2
61	E	453.1	304.7	0.8	0.1	0.4	0.8	1.2	0.2	1.0	0.1	1.0	0.2	0.5	0.2	0.2	0.4	0.6	2.7	2.4	0.4	1.0

N°	O	MS		TRISACÁRIDOS																		
		Fru	Glu	R+k	6K	Nk	Erl	Mlz	ni 1	Tnd	ni 2	ni 3	ni 4	Mtt	ni 6	ni 7	ni 8	ni 9	ni10	Pan	ni11	Imtt
62	B	399.3	298.1	1.0	0.2	0.2	1.0	2.1	0.1	0.2	0.1	0.9	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.3	1.1	1.6	0.2	0.2
63	B	386.7	294.7	5.9	0.6	0.4	0.9	0.0	0.1	0.4	0.0	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1	0.3	0.3	2.2	2.4	0.4	0.5
64	R	415.1	331.9	0.3	0.2	0.2	2.0	1.2	0.0	0.4	0.3	1.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.7	1.7	0.1	0.1
65	R	391.3	295.4	1.2	0.2	0.2	6.0	0.3	0.0	0.5	0.3	0.6	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.5	2.9	1.9	0.5	0.5
66	B	379.2	321.4	0.2	0.1	0.0	1.4	1.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.2	0.2	0.3	0.4	0.9	0.3	0.0	0.0
67	E	412.4	322.3	0.8	0.3	0.0	1.5	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.3	0.8	0.1	0.2	0.2	0.3	0.9	0.4	0.0	0.0
68	A	394.5	316.5	1.3	0.5	0.0	5.1	1.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1	0.5	0.2	0.0	0.0
69	R	374.9	326.9	0.9	0.4	0.0	9.6	1.0	0.0	0.4	0.0	0.3	0.2	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	1.0	0.4	0.0	0.0
70	R	355.8	326.3	0.7	0.3	0.0	1.6	1.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3	0.9	0.4	0.0	0.0
71	A	355.8	292.0	1.5	0.7	0.0	10.6	1.0	0.0	0.4	0.0	0.1	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.3	0.0	0.0
72	A	438.6	343.1	1.7	0.6	0.0	6.7	1.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1	0.6	0.3	0.0	0.0
73	B	383.8	321.6	0.8	0.6	0.0	2.5	0.7	0.0	0.2	0.1	0.4	0.3	1.0	0.2	0.3	0.2	0.3	0.9	0.4	0.0	0.0
74	B	406.1	349.9	0.6	0.3	0.0	1.4	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.6	0.1	0.2	0.1	0.3	0.8	0.2	0.0	0.0
75	B	358.7	286.9	7.7	1.2	0.0	2.7	1.4	0.3	0.4	0.2	0.5	0.4	0.8	0.1	0.3	0.3	0.3	1.0	0.6	0.0	0.0
76	B	356.9	287.4	8.1	1.4	0.0	2.4	1.1	0.5	0.4	0.2	0.5	0.3	0.9	0.2	0.3	0.3	0.3	1.3	0.7	0.0	0.0
77	B	357.3	280.3	3.6	0.7	0.0	2.7	1.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3	0.7	0.2	0.3	0.3	0.4	1.2	0.7	0.0	0.0
78	B	307.0	253.2	3.1	0.7	0.0	3.0	1.2	1.6	0.4	0.4	0.3	0.2	0.5	0.1	0.0	0.3	0.9	1.9	0.4	0.0	0.0
79	B	367.0	283.2	6.4	1.1	0.0	9.7	1.8	0.5	0.3	0.2	0.1	0.2	0.6	0.1	0.0	0.3	0.3	1.4	0.4	0.0	0.0
80	B	358.0	271.9	2.3	0.5	0.0	4.4	0.9	0.2	0.6	0.8	0.2	0.3	1.0	0.2	0.0	0.5	0.7	2.2	1.4	0.0	0.0
81	B	362.7	268.0	2.8	0.6	0.0	2.2	8.1	0.3	0.7	0.8	0.3	0.4	1.3	0.2	0.3	0.5	0.8	3.0	0.9	0.0	0.0
82	A	351.0	280.8	1.4	0.7	0.0	9.0	1.3	0.0	0.4	0.0	0.1	0.1	0.5	0.2	0.1	0.2	0.7	1.0	0.4	0.0	0.0
83	E	345.8	265.0	0.4	0.4	0.0	1.8	1.1	0.0	0.3	0.3	0.7	0.1	0.5	0.2	0.0	0.3	0.4	1.1	0.5	0.0	0.0
84	R	372.0	324.0	0.9	0.4	0.0	14.1	2.2	0.0	0.6	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.4	1.4	0.6	0.0	0.0
85	E	357.4	291.0	0.5	0.5	0.0	1.6	1.1	0.0	0.4	0.2	0.2	0.3	0.9	0.2	0.2	0.3	0.6	1.7	0.7	0.0	0.0
86	R	331.5	288.6	0.5	0.3	0.0	3.2	1.6	0.0	0.2	0.0	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.4	1.0	0.4	0.0	0.0
87	A	379.8	324.0	0.9	0.4	0.0	4.9	0.7	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1	0.1	0.6	0.2	0.0	0.0
88	E	347.1	297.3	0.5	0.5	0.0	8.0	1.6	0.2	0.2	0.8	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.8	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
89	A	375.4	324.3	0.6	0.3	0.0	7.7	0.8	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.7	0.0	0.0
90	B	390.1	268.0	2.3	0.6	0.0	4.0	5.0	0.2	0.4	0.0	0.2	0.2	0.9	0.3	0.3	0.4	0.7	1.6	0.6	0.0	0.0
91	E	424.6	308.7	0.5	0.4	0.0	1.6	0.6	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2	0.1	0.4	0.9	0.5	0.0	0.0
92	R	365.0	312.1	0.9	0.6	0.0	4.6	1.7	0.0	0.3	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.9	0.3	0.0	0.0
93	B	374.9	316.3	0.7	0.3	0.0	1.9	6.3	0.0	0.4	0.1	0.2	0.2	0.6	0.1	0.2	0.2	0.4	1.1	0.6	0.0	0.0
94	B	388.7	247.0	0.8	0.3	0.0	1.9	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.2	0.0	0.0
95	R	354.7	303.1	1.5	0.3	0.3	13.8	1.2	0.2	0.7	0.2	1.4	0.2	0.4	0.1	0.1	0.3	0.3	0.9	2.1	0.1	0.1
96	E	338.2	263.4	0.6	0.5	0.0	3.8	1.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2	0.2	0.2	0.7	0.2	0.0	0.0
97	B	365.5	327.9	0.7	0.3	0.0	5.5	1.0	0.0	0.4	0.1	0.4	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.7	0.2	0.1	0.0	0.0
98	A	338.9	280.6	2.2	0.9	0.0	9.1	1.5	0.0	0.9	0.0	0.0	0.1	0.7	0.2	0.2	0.2	0.5	1.5	0.7	0.0	0.0
99	R	385.1	335.7	0.7	0.3	0.0	5.1	0.7	0.0	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.9	0.4	0.0	0.0



N°	O	MS		TRISACÁRIDOS																		
		Fru	Glu	R+k	6K	Nk	Erl	Mlz	ni 1	Tnd	ni 2	ni 3	ni 4	Mtt	ni 6	ni 7	ni 8	ni 9	ni10	Pan	ni11	Imtt
100	R	365.4	308.7	0.8	0.3	0.0	4.3	0.7	0.0	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.7	0.3	0.0	0.0
101	E	342.4	269.2	0.5	0.4	0.0	4.1	1.2	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	0.0	0.0
102	A	326.8	270.4	0.8	0.3	0.0	4.3	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0
103	B	361.4	259.6	2.4	0.7	0.0	3.1	0.9	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2	0.7	0.2	0.0	0.0
104	E	383.4	284.6	0.5	0.4	0.0	1.7	0.6	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.0	0.0

De los monosacáridos podemos destacar las elevadas concentraciones de fructosa que, como podía esperarse, son superiores en todos los casos a los valores de glucosa. Los valores medios de fructosa y glucosa fueron 371.5 mg/g y 298.0 mg/g respectivamente, y los valores de la relación entre ellos (fru/glu) osciló entre 1.03 y 1.57. No se observan diferencias aparentes en la composición entre los distintos orígenes.

La suma total de trisacáridos es muy variable en las distintas mieles, con un rango entre 4.2 mg/g y 53 mg/g. Las concentraciones medias más altas son las obtenidas para la erlosa (4.3 mg/g), el conjunto de rafinosa y 1-kestosa (1.6 mg/g), panosa (1.3 mg/g) y melezitosa (1.1 mg/g), aunque las muestras presentaron una gran variabilidad. Los demás trisacáridos identificados presentaron concentraciones medias inferiores a 0.5 mg/g. Los trisacáridos no identificados presentaron en general bajas concentraciones, siendo su valor superior 1.1 mg/g para el compuesto n.i. 10.

### 2.3.1.3. Determinación de disacáridos.

Los datos de concentración de las ventanas se procesaron utilizando el programa de determinación cuantitativa por iteración descrito en el apartado 2.7, que proporciona como salida los resultados de concentración, en mg/g de miel, de los 15 disacáridos disponibles como patrones para cada una de las mieles analizadas, que aparecen en la tabla 4. Los datos de integración de las ventanas se muestran en tablas del anexo II.

**Tabla 4.** Concentración de disacáridos (mg/g) en las 114 mieles analizadas. La 114 filas representan las muestras de miel estudiadas, y en las columnas quedan reflejados las concentraciones de cada disacárido en mg/g, junto con el número (N°) y origen (O) de cada

muestra. Los disacáridos, cuyo nombre se ha abreviado en la tabla, han sido los siguientes: Sacarosa (**Sac**),  $\alpha,\alpha$ -trehalosa ( **$\alpha\alpha$ Tr**),  $\alpha,\beta$ -trehalosa ( **$\alpha\beta$ Tr**); celobiosa (**Cel**); laminaribiosa (**Lam**); maltulosa (**Mltu**); nigerosa (**Nig**); turanosa (**Tur**); maltosa (**Mlto**); kojibiosa (**Koj**); trehalulosa (**Trhlu**); palatinosa (**Pal**); gentiobiosa (**Gent**); isomaltosa (**Isom**) y melibiosa (**Mel**).

N <sup>a</sup>	O	Sac	$\alpha\alpha$ Tr	$\alpha\beta$ Tr	Cel	Lam	Mltu	Nig	Tur	Malt	Koj	Trhlu	Pal	Gent	Isom	Mel
1	E	0.3	0.0	4.3	0.0	1.6	13.2	5.8	17.9	13.1	13.9	22.3	2.9	0.1	23.9	0.0
2	E	0.4	0.1	4.1	0.9	1.0	13.5	5.7	18.3	13.2	14.0	22.9	3.2	0.1	22.8	0.0
3	E	1.9	0.0	4.6	1.0	2.0	14.6	5.8	20.6	16.4	15.4	14.6	2.5	0.1	17.7	0.0
4	E	0.7	0.0	2.9	0.8	1.0	8.6	7.5	14.0	6.3	9.9	8.7	0.6	0.1	10.5	0.0
5	E	0.0	0.0	3.0	0.9	1.1	9.7	7.3	13.5	4.1	9.3	8.9	1.3	0.1	10.6	0.0
6	R	2.0	1.1	2.6	1.2	0.0	8.0	8.5	15.8	9.4	10.0	8.0	1.3	0.1	6.8	0.0
7	R	6.8	0.0	4.1	1.1	2.1	19.2	9.0	24.4	13.6	11.1	13.5	2.7	0.1	12.7	0.0
8	B	0.0	0.0	3.8	1.4	2.1	24.8	7.8	22.1	10.9	9.9	14.4	2.4	0.0	17.2	0.0
9	B	0.0	0.0	3.9	0.9	2.2	13.1	4.8	18.2	6.4	5.1	8.5	1.0	0.0	4.0	0.0
10	E	2.0	0.0	3.2	0.9	1.8	10.5	3.7	15.5	15.4	5.4	6.8	0.9	0.0	6.3	0.0
11	E	2.2	0.0	3.2	0.8	1.8	9.4	5.9	16.7	16.5	10.3	6.0	1.0	0.0	5.2	0.0
12	A	23.0	0.0	2.9	1.2	1.5	8.4	9.4	14.7	11.0	10.1	5.1	1.0	0.0	5.5	0.0
13	A	2.1	0.0	4.5	1.4	2.0	21.5	9.4	20.8	12.2	10.6	6.9	0.1	0.0	14.7	0.0
14	B	0.0	2.5	5.0	1.0	3.5	24.9	8.4	24.7	11.1	17.9	16.4	3.5	0.1	21.3	0.0
15	E	0.8	0.0	5.4	1.1	1.8	16.9	6.1	25.0	17.6	17.1	9.6	2.0	0.1	9.5	0.0
16	E	1.9	0.0	3.7	1.4	3.3	12.5	2.1	23.6	21.7	16.8	9.5	1.5	0.1	6.9	0.0
17	A	5.3	0.0	3.4	1.2	2.8	15.4	5.1	20.9	15.3	13.4	9.7	1.8	0.1	8.6	0.0
18	R	1.2	0.0	2.6	1.0	2.0	9.8	5.3	17.1	7.7	10.2	5.9	1.1	0.1	5.0	0.0
19	R	13.7	0.2	4.7	1.2	2.3	18.6	5.6	24.8	21.5	16.3	11.9	2.4	0.1	13.7	0.0
20	R	0.9	0.0	2.9	0.0	3.9	14.9	6.1	22.8	10.2	11.9	10.3	1.9	0.1	8.1	0.0
21	R	0.8	0.0	3.4	0.7	1.8	14.7	6.1	20.2	5.6	10.8	8.5	1.5	0.1	8.9	0.0
22	R	2.2	0.0	2.5	0.8	1.5	7.3	2.4	12.3	11.4	8.6	4.1	0.7	0.0	3.2	0.0
23	B	0.6	0.5	2.6	2.6	1.4	21.5	8.8	12.4	12.2	13.0	11.7	2.6	0.1	13.2	0.0
24	B	0.3	0.0	2.9	1.2	1.7	16.5	5.6	17.4	6.9	11.8	8.8	1.6	0.1	9.3	0.0
25	B	0.7	0.0	2.6	2.2	1.3	13.9	5.8	15.0	7.3	10.2	6.7	1.3	0.1	7.2	0.0
26	R	1.8	0.0	3.0	0.1	3.3	5.8	8.7	9.7	2.8	11.4	0.2	1.1	0.1	5.5	0.0
27	R	1.3	0.0	2.6	1.2	1.1	10.6	4.0	16.2	6.1	7.6	7.3	1.4	0.1	6.2	0.0
28	B	0.8	0.0	4.1	1.1	1.6	12.1	4.5	17.6	6.1	10.2	8.3	1.4	0.0	7.9	0.0
29	E	0.4	0.0	3.0	1.0	0.7	12.6	6.8	17.6	5.0	7.6	10.6	2.3	0.1	12.6	0.0
30	B	3.2	0.0	4.6	2.9	1.0	12.8	8.6	16.0	12.9	11.1	8.6	0.8	0.1	9.7	0.0
31	B	1.2	0.2	3.8	1.8	1.1	26.5	10.5	18.1	11.6	16.3	6.0	3.0	0.0	17.6	0.0
32	B	0.0	0.0	3.9	1.8	0.8	24.6	9.4	22.2	8.4	10.0	14.1	3.0	0.1	16.9	0.0

33	B	0.0	0.0	3.4	2.2	2.3	26.3	9.3	23.6	8.5	8.5	16.8	3.4	0.1	16.8	0.0
34	B	0.0	0.0	3.2	0.9	2.3	26.4	8.4	20.1	5.9	10.9	10.7	2.2	0.1	13.6	0.0
35	B	0.5	0.0	4.4	0.9	2.2	21.1	12.7	23.2	3.8	14.6	11.4	2.5	0.1	14.6	0.0
36	B	0.0	0.0	5.7	1.6	1.8	30.7	14.7	26.9	12.4	23.7	7.5	2.9	0.0	22.2	0.0
37	R	14.7	0.0	4.7	1.2	2.3	19.5	9.9	26.9	15.4	14.1	11.2	2.4	0.1	13.6	0.0
38	R	0.9	0.0	4.3	0.7	2.6	22.9	9.3	27.6	6.4	9.9	15.1	3.2	0.1	15.6	0.0
39	E	0.3	0.0	5.1	1.3	2.2	23.3	8.7	27.9	6.9	13.2	18.7	3.3	0.1	19.8	0.0
40	R	13.1	0.0	5.0	1.4	3.1	17.1	9.9	25.9	22.7	17.1	12.0	2.7	0.1	15.7	0.0
41	R	6.6	0.0	2.5	0.7	1.4	11.0	5.5	18.4	6.5	7.2	7.0	1.3	0.1	6.5	0.0
42	R	3.1	0.0	2.6	0.7	1.2	10.4	5.9	16.6	5.5	7.2	6.6	1.3	0.0	6.5	0.0
43	R	6.0	0.0	2.6	0.8	1.0	11.1	6.3	17.4	7.0	7.7	6.7	1.2	0.0	6.3	0.0
44	R	4.2	0.0	4.1	1.1	2.7	8.7	11.3	13.2	23.5	13.8	5.2	1.3	0.1	8.3	0.0
45	R	2.1	0.0	3.8	0.8	1.2	12.3	8.0	16.9	13.1	11.2	7.1	1.5	0.1	8.6	0.0
46	R	1.7	0.0	3.8	1.2	2.5	16.2	9.3	17.8	15.5	11.6	9.3	1.8	0.1	11.3	0.0
47	R	24.1	0.0	2.3	1.0	1.8	8.1	4.6	12.9	16.5	7.8	5.6	0.5	0.1	5.4	0.0
48	R	3.2	0.0	4.5	1.2	2.8	14.7	8.0	19.0	19.1	16.7	9.1	2.1	0.1	12.7	0.0
49	R	0.1	0.0	4.6	0.8	3.1	21.1	10.7	23.6	9.2	14.3	16.1	2.7	0.1	18.9	0.0
50	A	3.4	0.0	4.8	1.0	2.2	11.4	9.6	18.3	14.8	14.0	6.8	1.4	0.1	8.3	0.0
51	A	56.1	0.0	3.4	1.1	1.5	13.2	6.1	17.3	23.6	9.8	6.6	1.6	0.0	8.6	0.0
52	E	1.3	0.0	4.6	1.9	4.5	16.9	10.6	22.9	16.6	17.7	9.7	1.6	0.1	8.9	0.0
53	R	1.2	0.0	3.9	2.2	5.0	26.9	8.9	26.8	9.8	14.6	17.9	3.5	0.1	17.8	0.0
54	A	1.3	0.0	4.1	2.3	4.2	25.1	9.9	23.2	13.7	15.3	14.9	3.1	0.1	16.5	0.0
55	B	0.7	0.0	4.3	1.6	5.3	36.6	13.9	23.5	18.4	17.5	20.4	5.3	0.1	24.1	0.0
56	B	1.0	4.9	5.7	1.4	2.9	41.8	12.8	29.6	15.9	22.8	33.0	8.0	0.1	41.6	0.0
57	A	9.5	0.0	5.2	1.0	2.3	17.7	11.9	24.2	23.7	16.6	10.8	3.1	0.1	11.7	0.0
58	R	0.2	0.0	5.8	1.0	2.2	20.2	14.1	25.4	14.1	17.9	16.0	2.8	0.1	22.6	0.0
59	E	0.5	0.0	7.9	1.0	2.7	23.6	16.5	30.9	22.5	25.6	16.2	3.0	0.1	20.5	0.0
60	R	1.6	0.0	4.6	1.4	2.8	21.2	10.8	24.3	17.8	14.5	11.8	2.6	0.1	14.6	0.0
61	E	0.4	0.0	5.9	1.0	1.7	21.4	13.3	24.5	16.5	16.7	21.1	3.8	0.0	26.6	0.0
62	B	0.9	0.0	4.4	1.3	2.7	19.2	10.4	20.6	15.6	13.0	10.1	2.4	0.1	12.7	0.0
63	B	2.2	0.0	3.4	1.8	1.9	27.5	8.8	22.2	3.9	10.3	16.0	3.9	0.0	19.3	0.0
64	R	0.5	0.0	3.2	1.8	2.8	12.9	9.7	20.7	13.6	13.9	7.6	1.5	0.1	9.3	0.0
65	R	0.0	0.0	2.7	1.8	2.2	37.6	6.7	24.9	8.5	10.0	28.5	5.9	0.1	23.5	0.0
66	B	0.0	0.0	6.7	0.0	2.7	36.8	16.2	31.3	22.1	20.5	16.1	2.8	0.1	18.8	0.0
67	E	0.0	0.0	6.4	1.4	4.5	31.1	13.9	35.1	18.7	18.5	17.0	3.3	0.1	16.5	0.0
68	A	47.9	0.0	4.4	1.2	2.2	17.6	3.1	26.1	33.6	11.3	8.4	1.3	0.0	8.3	0.0
69	R	17.3	0.0	5.2	1.1	2.7	17.0	6.0	24.7	31.3	15.7	8.3	1.3	0.0	10.2	0.0
70	R	0.0	0.0	5.2	1.0	2.9	20.1	13.6	26.6	8.5	15.6	10.2	1.8	0.1	11.3	0.0
71	A	57.6	0.0	4.8	1.4	0.7	15.8	0.0	21.5	38.0	10.4	6.8	1.4	0.0	8.3	0.0
72	A	45.7	0.0	5.2	0.7	1.7	19.5	3.2	25.1	29.9	14.3	9.1	1.7	0.0	9.8	0.0

73	B	1.1	0.0	5.4	1.2	1.8	20.7	8.4	21.6	20.1	18.7	8.6	1.7	0.1	11.6	0.0
74	B	1.8	0.0	4.6	1.0	1.9	17.6	11.1	20.8	12.6	17.1	7.9	1.4	0.1	10.8	0.0
75	B	2.4	0.0	5.5	4.3	0.9	27.6	12.9	32.0	15.8	20.1	11.0	2.3	0.0	16.3	0.0
76	B	1.6	0.0	5.6	3.3	1.0	22.6	11.2	24.6	14.3	17.5	9.0	2.0	0.1	13.8	0.0
77	B	1.2	0.0	6.8	3.1	1.5	26.5	15.8	28.0	16.2	21.3	12.7	2.6	0.1	18.1	0.0
78	B	2.2	0.0	6.7	2.6	1.0	20.4	13.3	23.1	12.6	18.4	10.0	2.1	0.1	15.5	0.0
79	B	3.5	0.0	5.6	3.4	0.7	19.0	8.1	22.3	19.8	17.6	8.7	0.0	0.0	13.6	0.0
80	B	0.5	0.0	6.3	3.7	0.9	20.6	6.4	24.5	14.9	6.3	13.0	3.8	0.1	15.5	0.0
81	B	0.6	0.0	5.6	2.3	2.2	44.8	12.9	26.9	26.2	21.7	24.1	5.7	0.1	32.0	0.0
82	A	16.0	0.0	4.4	2.6	1.1	22.6	6.4	22.6	21.6	11.4	11.7	2.4	0.1	13.4	0.0
83	E	0.1	0.0	6.3	1.7	2.0	37.9	16.0	28.2	25.5	20.1	21.9	4.7	0.1	22.3	0.0
84	R	6.3	0.0	6.3	1.6	1.5	19.9	10.3	22.7	30.7	20.5	10.4	1.5	0.1	13.6	0.0
85	E	0.5	0.0	6.8	2.1	2.0	38.7	15.3	33.1	23.3	24.5	21.4	4.5	0.1	22.3	0.0
86	R	0.8	0.0	5.0	2.0	2.0	23.5	9.7	21.3	16.7	16.4	12.4	2.1	0.1	13.3	0.0
87	A	4.5	0.0	4.9	2.1	2.4	13.6	6.4	19.2	22.1	17.2	7.4	1.4	0.1	7.9	0.0
88	E	2.1	0.0	6.5	1.7	1.8	18.4	6.2	25.0	32.6	21.1	9.4	1.9	0.1	9.9	0.0
89	A	11.5	0.0	4.5	1.4	0.7	11.7	3.9	17.1	27.9	14.5	6.2	1.3	0.1	6.6	0.0
90	B	1.4	0.0	7.1	2.1	0.7	31.5	15.3	27.8	19.3	19.9	15.0	2.7	0.1	21.1	0.0
91	E	0.8	0.0	5.9	1.0	1.8	16.4	7.9	18.6	20.5	18.3	10.7	1.8	0.1	13.9	0.0
92	R	2.8	0.0	5.0	1.8	2.2	16.0	8.2	18.4	20.0	18.0	8.4	1.7	0.1	10.3	0.0
93	B	0.5	0.0	3.8	1.4	1.5	29.1	9.7	21.4	15.2	8.6	17.0	3.5	0.1	14.7	0.0
94	B	5.5	0.0	2.6	1.2	0.9	7.1	3.5	8.2	13.8	8.6	4.0	0.6	0.1	4.3	0.0
95	R	10.0	0.0	4.8	0.5	1.8	15.8	10.5	22.9	19.0	14.6	9.0	2.1	0.0	11.5	0.0
96	E	0.8	0.0	6.9	1.8	1.5	23.6	12.2	23.4	21.1	20.9	11.0	2.1	0.1	13.8	0.0
97	B	2.9	0.0	4.5	1.5	1.3	17.7	8.7	19.3	20.2	14.0	8.9	1.5	0.1	10.3	0.0
98	A	14.7	0.0	7.8	2.8	5.9	14.1	5.8	28.6	29.8	22.3	19.5	5.1	0.1	22.2	0.0
99	R	2.5	0.0	5.0	1.3	1.4	17.2	11.1	19.0	23.9	19.0	8.8	1.7	0.1	11.6	0.0
100	R	2.0	0.0	4.9	1.2	2.7	14.2	7.4	17.3	18.0	16.2	8.0	1.6	0.1	9.4	0.0
101	E	0.8	0.0	5.8	1.5	2.0	17.2	8.0	20.4	20.3	18.1	9.4	1.8	0.1	10.9	0.0
102	A	3.4	0.0	4.2	1.5	1.7	13.7	6.4	18.0	16.7	12.7	6.8	1.3	0.1	7.1	0.0
103	B	0.9	0.0	5.4	2.2	0.7	21.2	9.6	21.6	15.2	15.7	9.8	1.9	0.1	13.6	0.0
104	E	1.6	0.0	4.2	1.2	0.7	10.9	6.7	13.7	19.3	13.3	13.0	1.9	0.1	16.1	0.0

A la vista de las tablas podemos señalar que algunos disacáridos descritos pocas veces en miel, como melibiosa, no aparecen en las muestras analizadas.

Los disacáridos mayoritarios fueron maltulosa, turanosa, maltosa, kojibiosa, trehalulosa e isomaltosa, con valores medios entre 11.3 mg/g (para trehalulosa) y 21.4 mg/g (para turanosa). Nigerosa y  $\alpha,\beta$ -trehalosa (con concentraciones medias de 8.6 y 4.5 mg/g

respectivamente) presentaron valores intermedios, mientras que los disacáridos celobiosa, laminaribiosa y palatinosa mostraron concentraciones en torno a 2 mg/g, aunque aparecieron en todas las muestras analizadas. La  $\alpha,\alpha$ -trehalosa aparece solo en 5 de las 114 muestras estudiadas, mientras que la gentiobiosa está presente en la mayoría de ellas, aunque en concentraciones no superiores a 0.1 mg/g. A pesar de la gran variabilidad de los disacáridos en las mieles, los disacáridos mayoritarios y minoritarios coinciden, en general, con los publicados por otros autores (Gómez-Báñez *et al.*, 2000; da Costa Leite *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2004; Cotte *et al.*, 2004; Nozal *et al.*, 2005).

La sacarosa presentó una gran variabilidad: mientras que en la mayoría de las muestras presenta valores muy bajos, en algunas muestras de azahar muestra unos valores extremadamente altos ( $> 40$  mg/g), siendo incluso el disacárido mayoritario en estas muestras. Otros autores han destacado también concentraciones elevadas de sacarosa en mieles de azahar recién recolectadas (Serra-Bonhevi *et al.*, 1995), así como la disminución de estos valores después de su maduración, en un tiempo aproximado de 3 meses.

Los datos reflejados en la tabla (tabla 4) junto con los obtenidos para monosacáridos y trisacáridos (tabla 3) constituyen una caracterización objetiva de las mieles seleccionadas. En etapas posteriores de este trabajo, se tratará de encontrar pautas en sus valores y de correlacionar estas posibles pautas con el origen floral de las mieles.

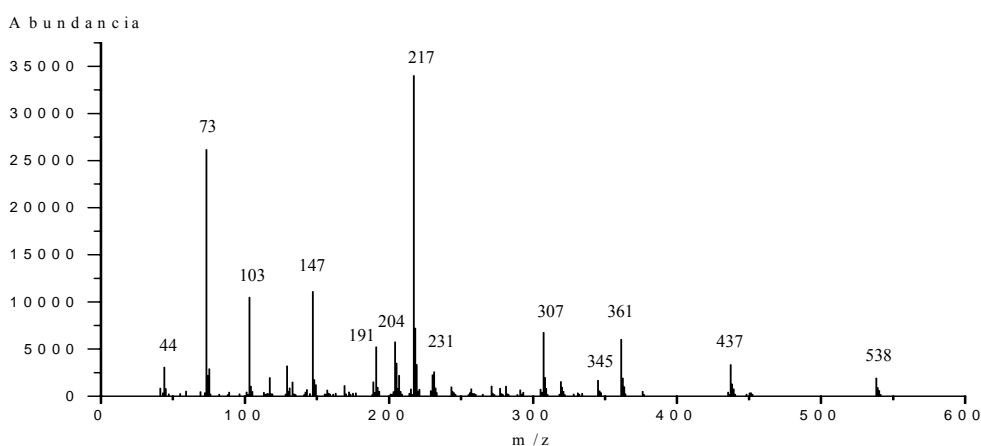
### 2.3.2. IDENTIFICACIÓN DE INTERFERENCIAS EN EL PERFIL DE DISACÁRIDOS EN MIELES.

Como se ha mostrado en el capítulo 1, en la determinación de disacáridos en mieles el procedimiento de cálculo iterativo presenta frente a la regresión clásica la ventaja de dar un significado analítico a los errores positivos encontrados, que deben corresponder a compuestos presentes en la miel de los que no se dispone como patrones comerciales. Según esto, la presencia de residuos positivos significativos puede utilizarse como base para detección, y posible identificación posterior, de este tipo de compuestos. En el anexo III se presentan las tablas de los residuos correspondientes a cada ventana de retención en las columnas MeSi y FeSi respectivamente.

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2. se calcularon las correlaciones existentes entre los residuos de las ventanas de retención de ambas columnas y se seleccionaron los coeficientes de correlación superiores a 0.4, al considerarse lo suficientemente significativos como para indicar la posible presencia de compuestos no identificados. Los resultados más significativos se exponen a continuación:

- **Ventana 10 MeSi / Ventana 8 FeSi**

Los residuos obtenidos en estas ventanas presentaron un coeficiente de correlación de 0.42. La muestra 90 presenta para estas ventanas residuos elevados, de 5.98 mg/g en MeSi y de 6.03 mg/g en FeSi. Su espectro de masas, que se muestra en la figura, coincide en ambas ventanas. Se trata de un espectro típico de disacáridos, en el que la abundancia relativa de los iones 217, 307 y 437 sugiere la presencia de al menos una unidad de fructosa.

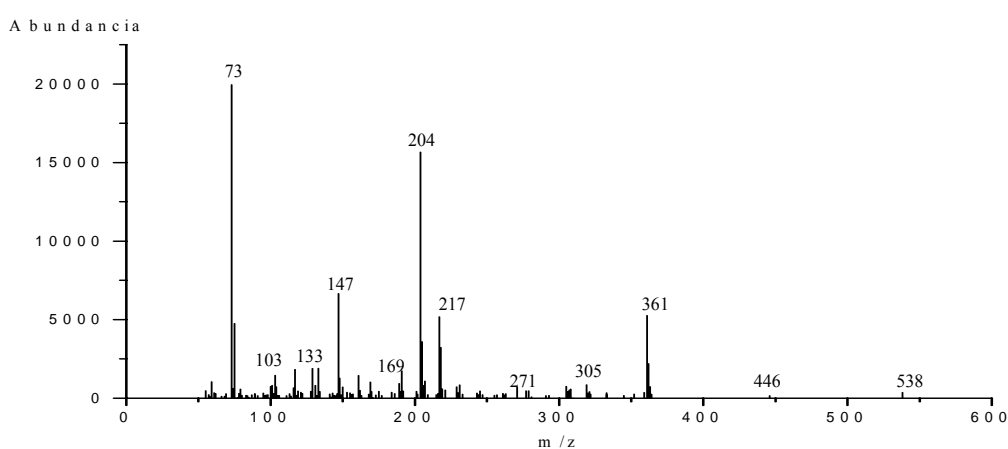


**Figura 1.** Espectro de masas del posible compuesto que contribuye a las ventanas de retención 10 de MeSi y 8 de FeSi.

Además, parece probable que se tratara de un disacárido no reductor, ya que si se tratara de un disacárido reductor éste daría lugar a 2 picos en cada fase, y debería observarse una correlación elevada de cada ventana con otra ventana de la misma fase.

- **Ventana 23 MeSi / Ventana 19 FeSi**

La correlación entre los residuos de las ventanas de retención 23 de MeSi y 19 de FeSi también fue elevada ( $r=0.57$ ). El espectro de masas correspondiente al máximo de la ventana 19 en la columna FeSi se muestra en la figura 2: la ventana de retención 23 en la columna MeSi presenta coelución con otro compuesto y por tanto un espectro algo diferente, lo que impide el confirmar que un mismo compuesto no identificado aparece en ambas ventanas. Por su espectro de masas, parece corresponder a un compuesto con glucosa y posiblemente no reductor.



**Figura 2.** Espectro del compuesto de la ventana de retención 19 de FeSi.

Tampoco se ha podido confirmar por el momento la existencia de compuestos interferentes cuya posibilidad queda puesta de manifiesto en las siguientes correlaciones:

- **Ventana 20 MeSi / 15 FeSi.**

Presentaron un coeficiente de correlación de 0.55. Hay distintos compuestos coeluyentes en ambas ventanas de retención, lo que complica la interpretación de sus espectros de masas.

- **Ventanas 18 y 24 MeSi / ventanas 8, 14 y 21 FeSi.**

Las correlaciones entre los residuos de estas ventanas oscilan entre 0.24 y 0.69, siendo este último valor muy significativo. Sin embargo, la caracterización de los posibles

interferentes se complica por el hecho de que parece tratarse de dos compuestos distintos, siendo debida su correlación positiva a una procedencia asociada, que además coeluyen con otros compuestos. Es difícil, por tanto, llegar a una conclusión en este caso.

### 2.3.3. CLASIFICACIÓN DE MIELES UNIFLORALES.

Con el fin de evaluar la existencia de pautas en los resultados cuantitativos obtenidos se emplearon distintas técnicas estadísticas multivariantes. En todos los casos se partió de los datos de concentración de todos los compuestos en las mieles estudiadas, lo que dio lugar a una matriz de datos de 104 filas, correspondientes a las muestras de miel, y de 40 columnas, correspondientes a las variables del análisis estadístico. Estas variables incluyen los monosacáridos (2), disacáridos (14) y trisacáridos (19) cuantificados, junto con otros parámetros que se han considerado significativos, como son la suma total de monosacáridos, de disacáridos y de trisacáridos, la suma total de azúcares y la relación fructosa/glucosa, previamente utilizada por varios autores.

También se definieron 4 variables de agrupación correspondientes al origen floral de las mieles (eucalipto, romero, brezo y azahar). Para clasificar las muestras, estas se agruparon considerando cada origen de forma individual: a cada variable de agrupación se asignó el valor 1 para las muestras del correspondiente origen y el valor cero para las restantes.

#### 2.3.3.1. Coeficientes de correlación.

Con el fin de evaluar en un primer paso la relevancia de las variables utilizadas, consideradas de forma independiente, en la separación de grupos, se calcularon los coeficientes de correlación entre las 40 variables correspondientes a las concentraciones y las 4 indicativas del origen floral, lo que dio lugar a 160 coeficientes.

Las variables que parecen estar más relacionadas con el origen floral (mayores valores absolutos de sus coeficientes de correlación) se detallan en la siguiente tabla (tabla 5):



**Tabla 5.** Coeficientes de correlación (r) más elevados entre variables y origen floral de las mieles.

EUCALIPTO		ROMERO	
Variable	r	Variable	r
F/G	0.335	F/G	-0.365
Rafinosa+ 1-kestosa	-0.297	Celobiosa	-0.308
Suma TS	-0.260	Erlosa	0.303
Isomaltotriosa	0.254	Maltotriosa	-0.297

BREZO		AZAHAR	
Variable	r	Variable	r
Rafinosa+ 1-kestosa	0.480	Sacarosa	0.592
Maltulosa	0.427	Maltosa	0.373
Celobiosa	0.413	n.i. 8	-0.363
Maltotriosa	0.337	Nigerosa	-0.259

En general las correlaciones no fueron muy elevadas. El dato más significativo es la correlación positiva que presenta la sacarosa en las **mieles de azahar** ( $r=0.592$ ), que, como se ha comentado, parece debido al alto contenido de este disacárido en mieles frescas. La maltosa presentó en estas mieles una correlación de  $r=0.373$  mientras que dos compuestos de la zona de trisacáridos y el disacárido nigerosa presentan correlaciones negativas entre  $r=-0.246$  y  $r=-0.363$ .

Las **mieles de eucalipto** no presentaron coeficientes de correlación elevados con ninguna de las variables. El valor más alto correspondió a la relación fructosa/glucosa, con un coeficiente positivo de  $r=0.335$ . La suma de rafinosa y kestosa, así como la suma de trisacáridos totales presentaron valores negativos de  $r=-0.260$  y  $r=-0.297$  respectivamente.

Tampoco se obtuvieron buenas correlaciones con las **mieles de romero**. Al igual que en las mieles de eucalipto, la mayor correlación se obtiene para la relación fructosa/glucosa, aunque en este caso se trata de una correlación negativa ( $r=-0.365$ ). Los coeficientes de celobiosa y maltotriosa también fueron negativos, mientras que para erlosa y un compuesto no identificado de la zona de trisacáridos (n.i. 3) fueron positivos. Todos ellos presentaron un valor absoluto en torno a 0.3.

En las **mieles de brezo** varios compuestos presentaron coeficientes de correlación positivos entre  $r=0.315$  y  $r=0.480$ , siendo la suma de rafinosa más 1-kestosa el más significativo.

### 2.3.3.2. Regresión lineal múltiple

Para evaluar la posibilidad de relacionar el origen floral de las mieles con los datos de composición de varios compuestos considerados de forma conjunta, se llevó a cabo una regresión múltiple por pasos considerando el origen de las mieles como variable dependiente. El análisis se repitió para los cuatro orígenes, asignando un valor de 1 a las muestras del origen considerado en cada caso, y un valor 0 a las muestras restantes.

Para poder comparar los resultados obtenidos, se emplearon siempre cuatro variables (cuatro pasos de regresión) en la predicción de cada origen floral. La tabla 6 muestra los coeficientes de correlación múltiple (R) y el error típico de la estimación (E tp.) obtenido al considerar las 4 primeras variables en cada caso. El valor R del primer paso coincide para cada tipo de miel con el valor máximo de los coeficientes de correlación individuales de la tabla 5. El valor del error típico (E tp) puede utilizarse de forma más intuitiva que R en comparación de resultados, teniendo en cuenta que el valor a predecir es siempre es 1 o 0.

**Tabla 6.** Coeficientes de correlación múltiple (R) y error típico (E. tp.) de la estimación obtenidos en la regresión múltiple por pasos para los distintos orígenes.

EUCALIPTO				ROMERO			
Paso	Variable	R	E. tp.	Paso	Variable	R	E. tp.
1	F/G	0.335	0.389	1	F/G	0.364	0.441
2	Rafinosa + 1-kestosa	0.456	0.369	2	Teanderosa	0.545	0.399
3	$\alpha,\beta$ -Trehalosa	0.486	0.364	3	Maltotriosa	0.628	0.372
4	Neokestosa	0.525	0.356	4	ni 4	0.673	0.355

BREZO				AZAHAR			
Paso	Variable	R	E. tp.	Paso	Variable	R	E. tp.
1	Rafinosa + 1-kestosa	0.480	0.412	1	Sacarosa	0.592	0.286
2	Maltulosa	0.587	0.382	2	ni 8	0.618	0.28
3	Turanosa	0.696	0.341	3	ni 9	0.642	0.274
4	Theanderosa	0.733	0.325	4	Laminaribiosa	0.655	0.272

Para la clasificación de las **mieles de cítricos (azahar)** el primer parámetro utilizado es la sacarosa, con el que se obtiene un error en la estimación relativamente bajo (s.e.=0.286). Sin embargo, las variables introducidas en los siguientes pasos (dos compuestos no identificados de la zona de trisacáridos y el disacárido laminaribiosa) apenas mejoran el coeficiente de correlación múltiple y el error de la estimación ( $R=0.665$ ; E.tp.=0.272). La maltosa, cuyo coeficiente de correlación fue relativamente elevado ( $r=0.373$ ) (tabla 5) no se incluyó en los cuatro primeros pasos de la regresión, debido a que, una vez incluida la sacarosa, la maltosa aportó menos información adicional que los parámetros considerados.

El primer parámetro empleado en las **mieles de eucalipto** fue la citada relación entre concentraciones de fructosa y glucosa, con un coeficiente de correlación múltiple de  $R=0.335$ , lo que daría un error de la estimación de s.e.=0.389. Al incluir otros parámetros, como la suma de rafinosa y 1-kestosa, la  $\alpha,\beta$ -trehalosa o la neokestosa el coeficiente de correlación múltiple solo alcanza un valor de  $R=0.525$ , y el error en la estimación apenas se ve disminuido (s.e.=0.356).

En la clasificación de las **mieles de romero** también se introduce como primer parámetro la relación fructosa/glucosa. El error obtenido (s.e.=0.441) disminuye hasta s.e.=0.355 al incluir las variables theanderosa, maltotriosa y la concentración de uno de los compuestos no identificados (n.i. 4). Con estas cuatro variables el coeficiente de correlación múltiple alcanzó un valor de  $R=0.673$ .

Las variables consideradas para las **mieles de brezo** en los cuatro primeros pasos de la regresión dieron lugar a un coeficiente de correlación múltiple de  $R=0.733$ . La primera variable considerada fue la suma de los trisacáridos rafinosa y 1-kestosa ( $R=0.480$ ), seguida de los disacáridos maltulosa, turanosa y teanderosa.

### 2.3.3.3. Análisis discriminante por pasos.

Los resultados obtenidos para el análisis discriminante por pasos son como cabría esperar coincidentes con los de la regresión múltiple, ya que en el caso de existir sólo dos grupos de clasificación los fundamentos de cálculo de ambas técnicas son similares. Las diferencias observadas corresponden al distinto significado de los parámetros utilizados en

las dos técnicas. Así, el valor F de la tabla 7, que hace referencia al poder de clasificación de cada compuesto, es cualitativamente comparable con el valor absoluto del coeficiente de correlación de la tabla 5, y las variables seleccionadas por dar lugar a una mejor clasificación en la tabla 8 son las mismas que en la tabla 6 daban lugar a un menor error típico.

**Tabla 7.** Compuestos individuales con mayor importancia en la discriminación del origen floral y valores de F obtenidos para esos compuestos.

EUCALIPTO		ROMERO	
Variable	F	Variable	F
F/G	12.9	F/G	15.6
Rafinosa + 1-kestosa	9.9	Celobiosa	10.7
Suma TS	7.4	Erlosa	10.3
Isomaltotriosa	7.1	Maltotriosa	9.9

BREZO		AZAHAR	
Variable	F	Variable	F
Rafinosa + 1-kestosa	30.6	Sacarosa	55.0
Maltulosa	22.7	Maltosa	16.5
Celobiosa	21.0	n.i. 8	15.5
Maltotriosa	13.1	Nigerosa	7.3

La tabla 8 muestra los grupos de variables consideradas en los 4 primeros pasos del análisis discriminante, que coinciden con los conjuntos de variables utilizadas en la regresión múltiple. La salida de datos del análisis discriminante muestra, además, el porcentaje de muestras clasificadas correctamente para cada origen considerado.

Como se observa en la tabla, las mejores clasificaciones globales fueron las obtenidas para brezo y azahar, con un 90.4% de muestras correctamente clasificadas en ambos casos. Para eucalipto y brezo estos porcentajes fueron ligeramente inferiores (82.7% y 83.7% respectivamente). Destacan los bajos porcentajes de muestras de eucalipto y azahar clasificadas correctamente (36.4% y 46.7% respectivamente), aunque estos porcentajes fueron muy elevados para las muestras de los demás orígenes, con un 95.1% de muestras correctamente clasificadas como “otros orígenes” en el caso del eucalipto, y un 97.8% de muestras de orígenes distintos al azahar.

**Tabla 8.** Conjuntos de variables consideradas en los 4 primeros pasos del análisis discriminante y porcentaje de muestras clasificadas correctamente a partir de ellas.

	<b>GRUPOS DE VARIABLES</b>	<b>% MUESTRAS CLASIFICADAS CORRECTAMENTE</b>		
<b>EUCALIPTO</b>	F/G Rafinosa+ 1-kestosa $\alpha,\beta$ -Trehalosa Neokestosa	36.4% Muestras eucalipto	95.1% Otros orígenes	82.7% Total de muestras
<b>ROMERO</b>	F/G Teanderosa Maltotriosa uk 4	64.7% Muestras romero	92.9% Otros orígenes	83.7% Total de muestras
<b>BREZO</b>	Rafinosa + 1-kestosa Maltulosa Turánosa Teanderosa	75.8% Muestras brezo	97.2% Otros orígenes	90.4% Total de muestras
<b>AZAHAR</b>	Sacarosa n.i. 8 n.i. 9 Laminaribiosa	46.7% Muestras azahar	97.8% Otros orígenes	90.4% Total de muestras

Los resultados conjuntos obtenidos a partir de los coeficientes de correlación y de la aplicación de la regresión lineal y del análisis multivariante indican la existencia de una relación entre concentración de carbohidratos y tipo de miel que puede interpretarse a dos niveles.

El primero de ellos indica el grado de relevancia de los distintos carbohidratos en la caracterización de un tipo de miel. Este dato tiene un gran interés, ya que puede utilizarse para orientar la realización de estudios de tipo básico, por ejemplo sobre las relaciones entre composición de néctar y de miel, o las causas de las diferencias entre las composiciones de los distintos tipos de miel.

El segundo nivel estaría relacionado con la posibilidad de utilizar datos de concentración de carbohidratos para clasificar una muestra de miel de acuerdo con su origen floral. Los resultados de la tabla 8 indica que existe una relación entre composición y origen

floral, pero que dicha relación no puede usarse con seguridad para predecir el segundo a partir de la primera. Las causas de este problema son el hecho de que las diferencias en la composición de carbohidratos entre las distintas mieles son solo cuantitativas, siendo los azúcares más importantes comunes a todas ellas, y sobre todo la diferencia en composición entre mieles de un mismo origen. Esta última característica puede ser debida en parte a la influencia de condiciones ambientales o climáticas durante la producción de la miel, pero también al hecho de que el néctar utilizado en su preparación puede tener una composición variable: mieles consideradas como uniflorales por su contenido en polen pueden tener una importante contribución de néctares de flores de diferentes especies vegetales de distinta composición.

Este problema incide negativamente en el uso de datos de concentración para la clasificación de una muestra de miel, pero también en la determinación de los carbohidratos típicos de un origen floral, que como hemos indicado presenta un interés de tipo básico. Para conseguir incrementar la validez para este objetivo de los datos obtenidos, se utilizó el enfoque que se describe a continuación

#### **2.3.3.4. Aplicación de Análisis discriminante seguido de regresión en la caracterización de compuestos relevantes de un tipo de miel.**

Los resultados de clasificación obtenidos tanto a partir de regresión como de análisis discriminante indican que el problema de diferenciación entre mieles de distinto origen floral a partir de los datos de composición de carbohidratos no puede resolverse por los métodos clásicos. El hecho de no existir muestras “de referencia” para los distintos tipos de miel fuerza a utilizar el mismo conjunto de muestras para determinar los grupos y para comprobar la validez de la clasificación. Los fallos de selección se ponen de manifiesto no sólo por la existencia de muestras clasificadas erróneamente (posiblemente alteradas o de procedencia incorrecta) sino por la presencia de numerosos casos en los que la probabilidad de asignación no es concluyente, que seguramente son debidos a mieles de origen floral mixto, problema común a prácticamente la totalidad de las mieles.

Por esta razón, para el estudio que a continuación se expone se excluyeron las muestras más sospechosas de tener una procedencia incorrecta o una mayor probabilidad de

presentar un origen mixto. Para llevar a cabo esta exclusión, los resultados cuantitativos se sometieron a análisis discriminante por pasos, en forma similar a la descrita en el apartado 2.3.3.3, pero introduciendo un total de 6 variables. Los resultados obtenidos, en la línea de los resumidos en la tabla 8, asignan a cada muestra una probabilidad entre 0 y 1 de pertenecer a los grupos definidos. Las muestras excluidas fueron aquellas que presentaron una probabilidad menor del 80% de pertenecer a su grupo.

Por otro lado, y para reflejar la muy probable existencia de muestras de origen mixto, se tomó este grado de probabilidad como una estimación de la pureza de la miel. La variable de agrupación es en este caso de tipo continuo, tomando valores entre 0.8 y 1.0 para las muestras seleccionadas para un origen dado y de entre 0 y 0.2 para las no pertenecientes a este origen, y se interpreta como la proporción del néctar de dicho origen en el total utilizado.

Al tratarse de una variable continua, no puede emplearse análisis discriminante, pero si regresión lineal múltiple, en forma similar a la descrita en el apartado 2.3.3.2. Las variables que presentaron una mayor correlación con cada origen se resumen en la tabla 9.

**Tabla 9.** Principales correlaciones (r) obtenidas entre las mieles más representativas de cada origen.

SELECCIÓN EUCALIPTO		SELECCIÓN ROMERO	
Variable	r	Variable	r
F/G	0.607	Theanderosa	0.547
Isomaltotriosa	0.556	Erlosa	0.478
Trehalulosa	0.348	F/G	-0.456
$\alpha,\beta$ -Trehalosa	0.332	Suma TS	0.363

SELECCIÓN BREZO		SELECCIÓN AZAHAR	
Variable	r	Variable	R
Rafinosa + 1-kestosa	0.666	Sacarosa	0.890
Maltulosa	0.632	Maltosa	0.529
Celobiosa	0.543	Nigerosa	-0.346
Maltotriosa	0.537	n.i. 8	-0.336

Al comparar esta tabla (tabla 9) con la tabla obtenida para la regresión utilizando todas las muestras (tabla 5) se observó tanto un aumento en la correlación de la mayoría de las

variables, como algunos cambios entre las variables seleccionadas como las más correlacionadas con algunos orígenes.

En las muestras de **eucalipto** la relación fructosa/glucosa (F/G) y la isomaltotriosa volvieron a aparecer entre las cuatro variables más correlacionadas, presentando valores muy superiores a los obtenidos al considerar todas las muestras ( $r=0.607$  y  $r=0.556$  respectivamente, frente a valores de  $r=0.335$  y  $r=0.254$  obtenidos en el caso anterior). Además, trehalulosa y  $\alpha,\beta$ -trehalosa presentaron correlaciones relativamente altas con el eucalipto, alcanzando valores por encima de 0.3. Aunque la suma de rafinosa + 1-kestosa, y la suma total de trisacáridos (Suma TS) aparecían en la primera regresión entre las variables más correlacionadas, sus coeficientes eran relativamente bajos ( $r=-0.297$  y  $r=-0.260$ ), disminuyendo incluso su valor al tener en cuenta sólo las muestras más características de este origen.

Los principales coeficientes de correlación de las mieles seleccionadas de **romero** presentaron también algunas diferencias con los obtenidos en la primera regresión. El trisacárido theanderosa, que presentó en el primer caso un coeficiente de correlación de  $r=0.285$ , alcanzó la mayor correlación ( $r=0.547$ ) al tener en cuenta solo las mieles más características. También aumentaron los coeficientes de correlación de erlosa y la relación fructosa/glucosa, con coeficientes superiores a 0.4, y se incluyó entre las variables más correlacionadas la suma total de trisacáridos ( $r=0.363$ ).

Para las mieles seleccionadas de **brezo** y **azahar** se mantuvieron las mismas variables obtenidas para todas las muestras, aunque sus coeficientes de correlación aumentaron considerablemente. En el caso del azahar, destacó el elevadísimo coeficiente de correlación de la sacarosa ( $r=0.890$ ). En las mieles de brezo las cuatro variables más correlacionadas alcanzaron valores por encima de 0.5.

Como cabía suponer, cuando se utiliza la regresión múltiple a partir de los datos seleccionados se produce un incremento en los coeficientes de correlación múltiple (R) y una disminución del error de la estimación. Los resultados se muestran en la tabla 10 sólo con propósitos ilustrativos, ya que el método empleado (combinación análisis discriminante con regresión) no debe emplearse con propósitos de clasificación al partir de datos seleccionados.



**Tabla 10.** Coeficientes de correlación múltiple ( $R$ ) y error estándar de la estimación ( $E$   $tp$ ) obtenidos en la regresión múltiple en 4 pasos de las muestras seleccionadas.

SELECCIÓN EUCALIPTO				SELECCIÓN ROMERO			
Paso	Variable	R	E tp.	Paso	Variable	R	E tp
1	F/G	0.607	0.205	1	Theanderosa	0.547	0.320
2	Rafinosa + 1-kestosa	0.671	0.193	2	F/G	0.765	0.249
3	$\alpha,\beta$ -Trehalosa	0.708	0.185	3	Maltotriosa	0.821	0.222
4	Neokestosa	0.796	0.160	4	Neokestosa	0.858	0.201

SELECCIÓN BREZO				SELECCIÓN AZAHAR			
Paso	Variable	R	E tp	Paso	Variable	R	E tp
1	Rafinosa + 1-kestosa	0.666	0.294	1	Sacarosa	0.890	0.109
2	Maltulosa	0.803	0.236	2	n.i. 9	0.902	0.104
3	Turanosa	0.888	0.183	3	n.i. 8	0.918	0.096
4	Theanderosa	0.909	0.168	4	Laminaribiosa	0.926	0.092

Sin embargo, los resultados del método han servido para poner mucho más claramente de manifiesto, tanto en su aspecto positivo como en el negativo, la relevancia de ciertos carbohidratos en la composición de la mieles de distintos tipos como se resume en la tabla 9: los compuestos que aparecen en dicha tabla serían los candidatos a ser considerados como indicadores del origen floral en el caso de poderse llevar a cabo un estudio a partir de mieles certificadas.

Los resultados obtenidos confirman en su mayor parte los obtenidos en la primera regresión, ya que en la mayoría de los casos se mantienen las variables que se apuntaban como más características al considerar todas las muestras. Sin embargo, en este caso las correlaciones obtenidas son mucho más elevadas, lo que puede ser debido, como se ha comentado, a la presencia de mieles de mezcla cuya composición en azúcares pudiera ser menos típica del origen considerado.



## CAPÍTULO 3

### EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS AZÚCARES DE LA MIEL CON EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Debido a su gran estabilidad, la miel puede ser almacenada a temperatura ambiente durante largos periodos sin dejar de ser apta para el consumo humano. Sin embargo, además de la posibilidad de que exista cristalización, y fermentación, con el tiempo se producen otros cambios en su composición química que pueden afectar a las características organolépticas y a la calidad del producto.

Uno de los grupos de compuestos que se ven afectados con por el almacenamiento son los carbohidratos. White (White *et al.* 1961) estudió el efecto del almacenamiento de la miel en la composición de carbohidratos. En dos años de almacenamiento a temperatura ambiente se observó un incremento del 69% en los disacáridos reductores y un ligero aumento de la sacarosa y otros oligosacáridos, en detrimento de los monosacáridos glucosa y fructosa, que disminuyeron en torno al 18%.

Los mecanismos responsables de estos cambios parecen ser, por un lado, la transglicosidación producida por las glucosidasas presentes en la miel, y por otro, la transformación química de los monosacáridos presentes en disoluciones concentradas en medio ácido para dar lugar a disacáridos y otros oligosacáridos (Pigman *et al.*, 1948).

Además de los cambios mencionados, el almacenamiento prolongado y el calentamiento de las mieles provocan reacciones de degradación de azúcares (Wooton, 1978), con la formación de furanos como el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF), compuestos a veces usados como indicadores del almacenamiento o el calentamiento de mieles (Sanz *et al.*, 2003b). Las altas temperaturas también favorecen la reacción de Maillard, que da lugar a compuestos como metilpirazinas, furanonas y pirroles. Por último, se ha sugerido la formación de anhidridos de fructosa (DFA) por condensación de la misma (Doner, 1978).

La degradación química de los azúcares tiene consecuencias negativas en las propiedades organolépticas del producto, por lo que debe tratar de evitarse.

La temperatura influye notablemente en estos cambios: a temperaturas bajas estas reacciones son muy lentas, pero su velocidad se incrementa notablemente con la temperatura (White, 1978). Por este motivo, deben controlarse tanto la temperatura de almacenamiento de las mieles como los calentamientos que se producen en su procesado, por ejemplo para prevenir su cristalización y fermentación (Singh *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 1992).

Para evaluar estos efectos en mieles de distintos tipos se ha llevado a cabo un estudio de la composición de carbohidratos en mieles de cítricos, brezo y roble almacenadas durante un año a distintas temperaturas, así como de los cambios producidos al someter estas mieles a distintos tratamientos térmicos.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. MUESTRAS.**

Se seleccionaron mieles artesanales recién obtenidas de azahar, brezo y roble. Se partió de muestras independientes para someterlas a los dos tratamientos de almacenamiento y calentamiento.

- Almacenamiento

Las 3 muestras destinadas al almacenamiento fueron divididas en 4 partes. La primera fue analizada como miel fresca y las otras 3 fueron almacenadas durante 1 año a temperaturas constantes de 10°, 20° y 40°C respectivamente. Tras este periodo se determinó el contenido en carbohidratos de cada una de ellas.

- Calentamiento

Las muestras de miel frescas fueron almacenadas en refrigeración (a 4°C durante 1 mes), y posteriormente divididas para someterlas a calentamientos de 40° (16 horas), 60° (16 horas) y 80°C (2, 4 y 8 horas). Se determinó la concentración de carbohidratos de todas las muestras antes y después del calentamiento.

### 3.2.2. ANÁLISIS GC.

Para la determinación de los azúcares de las distintas mieles, se prepararon sus TMS-oximas que se analizaron por Cromatografía de Gases, siguiendo el procedimiento y las condiciones cromatográficas detalladas en el capítulo 1, apartado 1.2.1.

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. ALMACENAMIENTO

Tras un año de almacenamiento a distintas temperaturas, la concentración de los carbohidratos varió considerablemente en las tres mieles estudiadas, como se observa en la tabla 1.

Todas las muestras presentaron un importante descenso de los **monosacáridos** (entre 14% y 38%), que fue más acusado cuanto más alta fue la temperatura de almacenamiento.

La miel de azahar presentó una pérdida de monosacáridos del 13.5% tras ser almacenada 1 año a 10°C, que aumentó a un 25% en el almacenamiento a 20°C y 40°C.

El comportamiento de las mieles de brezo y roble fue ligeramente distinto. En la miel de roble el almacenamiento a 10° y a 20°C dio lugar a pérdidas similares (23%), bastante inferiores a las producidas a 40°C (34%). En la miel de brezo el descenso en la concentración de monosacáridos a 40° es del 33%, aunque a 10° y 20°C fue algo más bajo (16 y 21% respectivamente).

La concentración total de los **disacáridos** mostró una tendencia ascendente con el tiempo, que también se vio influida por la temperatura de almacenamiento. Sin embargo, el comportamiento de los compuestos individuales fue variable en cada caso.

En la **miel de azahar** los disacáridos más importantes (maltulosa, nigerosa, turanosa, maltosa, kojibiosa, trehalulosa e isomaltosa) aumentaron después de un año de almacenamiento, incluso en las mieles almacenadas a 10 °C. El cambio más importante fue el experimentado por la maltosa, que pasó de un contenido inicial de 2.5 mg/g a 23.5 mg/g después de un año almacenada a 40°C. La concentración de celobiosa, laminaribiosa y

gentibiosa solo mostró un aumento importante a 40 °C. Los demás disacáridos no presentaron tendencias claras.

La **miel de brezo** presentó los mayores incrementos para las concentraciones de maltulosa, trehalulosa e isomaltosa a las tres temperaturas de almacenamiento, principalmente a 40°C. Turanosa y palatinosa parecen no verse afectados por el almacenamiento a 10°C, mientras que la mayoría de los disacáridos ( $\alpha,\alpha$ -trehalosa, celobiosa, laminaribiosa, nigerosa, maltosa y kojibiosa) solo aumentan de forma importante a 40°C.

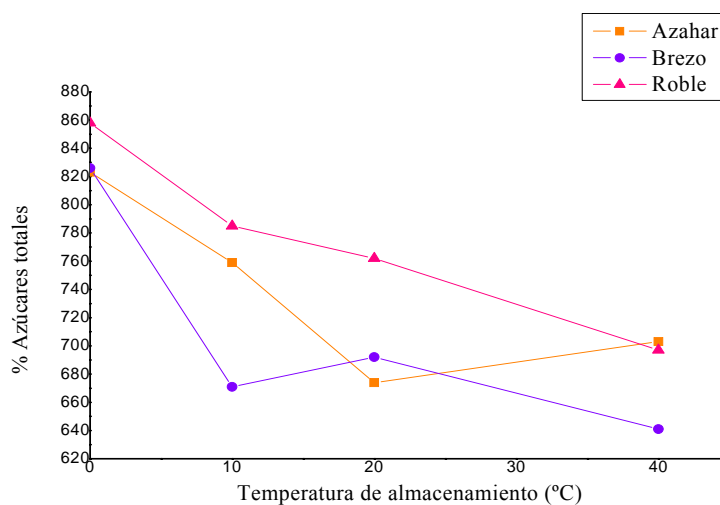
Las concentraciones de maltulosa, nigerosa, trehalulosa, palatinosa e isomaltosa muestran una tendencia ascendente con el tiempo y la temperatura en la **miel de roble**. La de gentiobiosa se mantuvo a 10° y 20°C y solo aumentó considerablemente a 40°C. El comportamiento de  $\alpha,\beta$ -trehalosa, maltosa y kojibiosa fue diferente al observado en los demás casos, ya que presentaron un aumento en su concentración en el almacenamiento a 10° y 20°C, pero un claro descenso a 40°C.

Los cambios en la composición de **trisacáridos** durante el almacenamiento son muy variables dependiendo del compuesto considerado y de la miel estudiada, lo cual, unido a las bajas concentraciones en que se encuentran, impide establecer conclusiones. Sólo la miel de brezo pareció mostrar una ligera tendencia descendente de los principales trisacáridos (rafinosa, 1-kestosa, erlosa y melecitosa) con el tiempo y la temperatura de almacenamiento.

La disminución de la concentración de los monosacáridos parece deberse en parte a la formación de oligosacáridos durante el almacenamiento (White *et al.*, 1961) que, como se ha comentado previamente, podría ser debida a la acción enzimática y a transformaciones químicas, ambas favorecidas en las condiciones de baja humedad y pH ácido de la miel. Los disacáridos reductores fueron los que experimentaron un mayor incremento, de acuerdo con los resultados obtenidos por White.

Sin embargo, la concentración total de carbohidratos disminuyó claramente en todos los casos, como se observa en la **figura 1**, lo que indica la formación de productos de degradación química, que daría lugar a derivados del furilo y ácidos, así como de compuestos asociados con la reacción de Maillard (Doner, 1978). Aunque no puede descartarse la formación de oligosacáridos con cuatro o más unidades, la cantidad que

podría formarse (que sería inferior a la de trisacáridos) justificaría solo una pequeña parte de la disminución observada.



**Figura 1.** Evolución la concentración total de carbohidratos durante el almacenamiento de mieles a diferentes temperaturas

### 3.3.2. CALENTAMIENTO

La tabla 2 muestra la concentración (mg/g) de los distintos azúcares en las mieles de azahar, brezo y roble antes y después de ser sometidas a distintos tratamientos térmicos.

En general no se observan diferencias importantes ni tendencias en los valores de concentración obtenidos, a diferencia de lo que ocurría durante el almacenamiento.

### 3.3.3. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en los apartados 3.3.1 y 3.3.2 indican que, aunque los cambios en la concentración de los azúcares durante su almacenamiento se atribuyen tanto al tiempo como a la temperatura, hay que considerar de modo muy distinto el efecto de cada uno de ellos.

El calentamiento de las mieles a temperaturas en torno a 55°C durante periodos relativamente cortos (44 días) ha sido llamado en ocasiones “almacenamiento acelerado”

(Wooton *et al.*, 1978), y ha tratado de ser utilizado para estimar la evolución de su composición química durante el almacenamiento convencional. Sin embargo, nuestros resultados parecen descartar esta posibilidad para la concentración de sus carbohidratos,, dado el distinto comportamiento frente a almacenamiento y calentamiento que se deduce de los resultados de los anteriores apartados. Una confirmación de los distintos mecanismos implicados en los cambios en la concentración de carbohidratos es la observación (Sanz *et al.*, 2003) de que mientras la reacción de Maillard (medida a través de los furoil metil aminoácidos) se produce en la miel incluso a temperaturas relativamente bajas, el HMF se forma preferentemente a temperaturas más altas.

Resulta en todo caso de interés el conocer el efecto de un calentamiento convencional sobre la composición química de las mieles debido a que, como se ha comentado previamente, este tipo de tratamiento es muy frecuente durante su procesado para evitar la cristalización de los azúcares y la fermentación.

Los tratamientos habituales suelen ser moderados; un calentamiento de la miel a 60° durante 30 minutos puede evitar la cristalización de la miel a temperatura ambiente y a 5°C durante 60 y 90 días respectivamente (Gupta *et al.*, 1992), aunque normalmente se opta por el uso de temperaturas más elevadas durante un tiempo muy corto, como la exposición de la miel a 80°C durante 30 segundos, seguido de un enfriamiento rápido. En estas condiciones no cabe esperar ningún cambio apreciable en la concentración de azúcares, según los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Sin embargo, estos resultados no permiten descartar una cierta pérdida de calidad del producto con los tratamientos térmicos aplicados. Pequeñas cantidades de azúcares pueden dar lugar a productos de degradación sin que la pérdida cuantitativa de azúcares se vea reflejada en su composición total. Algunos de estos productos, incluso en concentraciones muy bajas, pueden tener importantes repercusiones en las características organolépticas del producto. Es conveniente por tanto el estudio de otros grupos de compuestos de la miel para una evaluación más completa de las diferencias entre los efectos de la temperatura, en condiciones de almacenamiento normal y acelerado, sobre la calidad de las mieles. El capítulo 8 de esta memoria describe los resultados obtenidos en esta línea mediante el análisis de componentes volátiles, que resultan ser más concluyentes que los relacionados para los carbohidratos.



**Tabla 1.** Concentración (mg/g) de mono-, di- y trisacáridos en las 3 mieles estudiadas (azahar, brezo y roble), recién obtenidas y tras un año de almacenamiento a 10°C, 20°C y 40°C.

	AZAHAR				BREZO				ROBLE			
	Fresca	12 meses			Fresca	12 meses			Fresca	12 meses		
		10°C	20°C	40°C		10°C	20°C	40°C		10°C	20°C	40°C
Fructosa	433.7	368.4	322.8	325	383.4	286.5	295.2	264.4	387.2	319.5	309.2	266.7
Glucosa	283.4	251.7	215.3	211.1	275.7	219.5	213.1	172.9	276.5	238	215.9	180.4
<b>TOTAL MS</b>	<b>717.1</b>	<b>620.1</b>	<b>538.1</b>	<b>536.1</b>	<b>659.1</b>	<b>506</b>	<b>508.4</b>	<b>437.3</b>	<b>663.7</b>	<b>557.5</b>	<b>525.1</b>	<b>447.1</b>
Sacarosa	0.5	2.6	1.1	1.7	0.8	0.6	0.5	0.8	6.0	4.7	2.2	0.7
$\alpha,\alpha$ -Trehalosa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.0	2.8	0.0	0.8	0.0	0.8
$\alpha,\beta$ -Trehalosa	5.1	5.3	5.4	4.0	5.1	4.6	4.9	4.9	6.1	6.7	6.4	5.2
Celobiosa	1.2	1.8	1.7	5.8	1.1	1.6	1.8	3.9	2.0	2.9	2.5	2.8
Laminaribiosa	2.0	2.1	2.1	7.4	1.6	0.7	0.9	3.9	1.2	0.2	0.0	1.9
Maltulosa	16.3	17.1	18.9	19.6	25.9	28.1	32.9	36.9	28.3	33.1	35.3	47.2
Nigerosa	12.5	13.9	13.3	16.9	12.6	12.5	13.2	16.3	13.3	15.6	15.8	17.0
Turanosa	23.9	25.2	24.7	27.4	23.1	22.8	25.1	26.0	28.9	28.5	28.0	28.0
Maltosa	2.5	14.9	13.1	23.2	13.5	8.3	10.2	16.6	17.3	17.9	20.4	16.3
Kojibiosa	16.9	20.9	20.5	26.2	21.9	17.8	18.5	23.2	23.2	24.9	26.4	20.0
Trehalulosa	8.0	8.7	9.6	10.5	11.9	13.5	17.8	18.2	15.0	19.7	23.6	28.7
Palatinosa	2.0	2.5	2.7	2.5	3.0	3.9	5.1	5.3	3.5	5.5	6.4	8.6
Gentibiosa	0.1	0.1	0.1	1.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	2.3
Isomaltosa	10.8	12.4	13.4	14.2	17.1	18.7	24.4	23.2	21.8	29.9	36.9	39.4
Melibiosa	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0
<b>TOTAL DS</b>	<b>101.9</b>	<b>127.5</b>	<b>126.4</b>	<b>161</b>	<b>137.6</b>	<b>133.9</b>	<b>156.5</b>	<b>182.1</b>	<b>166.5</b>	<b>190.6</b>	<b>204.2</b>	<b>218.8</b>
ni	0.0	1.6	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Raffinosa	0.0	3.4	2.9	0.8	2.1	2.3	2.1	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
1-Kestosa	2.7	3.9	3.8	2.0	2.7	2.7	2.6	0.9	0.0	1.8	0.5	0.3
Erlosa	0.4	0.5	0.6	0.4	2.9	2.2	1.1	0.2	5.0	6.6	6.3	6.0
Melezitosa	0.7	0.4	0.4	0.4	21.1	21.4	18.8	15.5	18.4	19.4	15.6	15.1
ni	0.0	0.5	0.4	0.7	0.5	0.6	0.6	0.5	2.5	3.0	2.9	2.3
ni	0.3	1.0	0.6	0.8	0.0	0.0	0.4	1.2	1.6	1.9	2.1	1.9
Maltotriosa	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	1.6	1.6	1.9	0.0	1.2	1.1	1.0
Panosa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	0.4	0.0	2.6	3.6	3.4
ni	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	0.7
<b>TOTAL TS</b>	<b>4.2</b>	<b>11.2</b>	<b>9.1</b>	<b>5.7</b>	<b>29.3</b>	<b>31.4</b>	<b>27.8</b>	<b>21.8</b>	<b>27.5</b>	<b>37.3</b>	<b>33</b>	<b>30.7</b>
<b>TOTAL</b>	<b>823.1</b>	<b>758.9</b>	<b>673.6</b>	<b>702.9</b>	<b>826</b>	<b>671.2</b>	<b>692.6</b>	<b>641.2</b>	<b>857.7</b>	<b>785.4</b>	<b>762.3</b>	<b>696.7</b>

**Tabla 2.** Composición (mg/g) de mono-, di- y trisacáridos en las mieles estudiadas antes y después de ser sometida a tratamientos térmicos de 40°C (16horas), 60°C (16 horas) y 80°C (2,4 y 8 horas).

	AZAHAR						BREZO					ROBLE											
	Sin	40°C		60°C	80°C			Sin	40°C		60°C	80°C			Sin	40°C		60°C	80°C				
	Calent.	16 h	16 h	2 h	4 h	8 h	calent.	16 h	16 h	2 h	4 h	calent.	16 h	16 h	2 h	4 h	8 h	calent.	16 h	16 h	2 h	4 h	8 h
Fructosa	371.1	387.2	400.5	422.1	430.3	395.5	365.8	359.0	347.9	351.1	354.9	370.9	372.8	369.2	355.3	366.4	348.5	258.8	265.0	258.1	248.3	257.6	244.7
Glucosa	276.0	292.0	301.9	318.5	321.8	301.3	257.5	253.8	239.0	244.7	242.6	258.8	265.0	258.1	248.3	257.6	244.7	258.8	265.0	258.1	248.3	257.6	244.7
<b>TOTAL MS</b>	<b>647.0</b>	<b>679.2</b>	<b>702.4</b>	<b>740.6</b>	<b>752.1</b>	<b>696.8</b>	<b>623.3</b>	<b>612.8</b>	<b>586.9</b>	<b>595.7</b>	<b>597.5</b>	<b>629.7</b>	<b>637.8</b>	<b>627.3</b>	<b>603.6</b>	<b>624.0</b>	<b>593.2</b>	<b>629.7</b>	<b>637.8</b>	<b>627.3</b>	<b>603.6</b>	<b>624.0</b>	<b>593.2</b>
Sacarosa	1.9	2.4	2.1	2.6	2.5	2.3	0.5	0.5	0.0	0.7	0.0	2.7	3.0	2.7	2.9	2.5	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\alpha,\alpha$ -Trehalosa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$\alpha,\beta$ -Trehalosa	4.5	4.1	4.6	5.0	5.4	4.8	4.7	4.5	3.8	4.5	4.3	5.4	5.5	6.0	5.7	4.6	6.3	4.7	4.5	3.8	4.5	4.3	5.4
Celobiosa	2.4	2.2	1.9	2.5	3.6	3.2	2.4	2.2	3.7	2.5	2.7	7.3	4.0	4.3	3.7	4.0	5.3	2.4	2.2	3.7	2.5	3.6	3.2
Laminaribiosa	2.3	2.7	2.5	3.2	3.5	4.3	1.6	1.4	1.9	1.9	0.7	0.4	1.0	1.1	1.4	1.5	1.3	2.3	2.7	2.5	3.2	3.5	4.3
Maltulosa	15.6	15.9	16.0	17.3	19.0	15.6	31.0	28.8	26.0	28.2	29.0	33.6	32.7	35.4	33.8	29.6	31.0	15.6	15.9	16.0	17.3	19.0	15.6
Nigerosa	12.0	13.1	12.6	13.9	14.3	12.7	13.8	13.0	11.6	12.6	12.8	14.8	14.9	16.0	15.6	13.4	12.1	12.0	13.1	12.6	13.9	14.3	12.7
Turanosa	20.2	21.8	19.4	22.3	23.2	18.3	23.6	22.0	16.8	21.9	21.1	25.0	25.0	28.1	28.1	22.7	22.6	20.2	21.8	19.4	22.3	23.2	18.3
Maltosa	18.0	17.4	21.2	22.7	23.0	21.5	11.7	11.2	12.9	11.7	12.8	20.5	19.7	20.8	19.1	18.2	17.4	18.0	17.4	21.2	22.7	23.0	21.5
Kojibiosa	17.5	18.4	18.7	20.6	22.1	19.4	20.9	18.9	19.0	19.0	20.2	25.7	24.1	26.3	25.2	23.1	20.8	17.5	18.4	18.7	20.6	22.1	19.4
Trehalulosa	6.6	7.1	6.8	7.4	8.1	6.5	13.9	12.8	11.6	12.5	12.7	17.0	16.7	18.6	18.6	15.4	11.1	6.6	7.1	6.8	7.4	8.1	6.5
Palatinosa	1.8	1.6	1.7	2.0	2.1	1.4	3.6	3.3	3.3	3.2	3.7	4.4	3.7	5.3	5.2	3.8	2.3	1.8	1.6	1.7	2.0	2.1	1.4
Gentibiosa	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Isomaltosa	8.5	7.8	8.6	10.0	10.7	8.8	18.1	17.4	11.5	16.9	16.3	21.8	22.3	25.0	24.0	19.1	16.1	8.5	7.8	8.6	10.0	10.7	8.8
<b>SUMA DS</b>	<b>111.2</b>	<b>114.9</b>	<b>116.1</b>	<b>129.5</b>	<b>137.5</b>	<b>118.8</b>	<b>145.8</b>	<b>136.1</b>	<b>122.2</b>	<b>136.3</b>	<b>136.3</b>	<b>178.7</b>	<b>172.7</b>	<b>189.7</b>	<b>183.3</b>	<b>158.0</b>	<b>148.2</b>	<b>111.2</b>	<b>114.9</b>	<b>116.1</b>	<b>129.5</b>	<b>137.5</b>	<b>118.8</b>
ni	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Raffinosa	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	1.6	1.5	1.6	1.8	0.7	0.4	0.8	1.6	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-Kestosa	2.1	2.4	2.1	2.4	2.2	1.6	2.1	2.0	1.8	1.9	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	2.4	2.1	2.4	2.2	1.6
Erlosa	3.6	3.0	3.5	4.2	4.3	3.6	1.3	1.2	1.2	1.6	2.8	3.7	4.4	4.3	4.2	2.9	1.9	3.6	3.0	3.5	4.2	4.3	3.6
Melezitosa	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	18.3	17.2	16.6	16.4	14.2	9.4	10.6	8.1	6.7	8.4	8.0	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6
ni	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.8	0.5	0.5	0.5	1.2	2.1	2.2	2.2	2.3	0.3	0.0	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
ni	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.0	0.3	0.0	1.3	1.3	1.2	0.9	1.5	1.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Maltotriosa	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.5	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Panosa	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>SUMA TS</b>	<b>6.5</b>	<b>6.3</b>	<b>6.4</b>	<b>7.4</b>	<b>7.4</b>	<b>6.0</b>	<b>25.4</b>	<b>23.9</b>	<b>21.7</b>	<b>22.3</b>	<b>21.1</b>	<b>17.1</b>	<b>18.9</b>	<b>16.6</b>	<b>15.6</b>	<b>14.0</b>	<b>11.4</b>	<b>6.5</b>	<b>6.3</b>	<b>6.4</b>	<b>7.4</b>	<b>7.4</b>	<b>6.0</b>
<b>TOTAL</b>	<b>764.8</b>	<b>800.3</b>	<b>824.9</b>	<b>889.1</b>	<b>885.5</b>	<b>821.6</b>	<b>794.4</b>	<b>772.8</b>	<b>730.8</b>	<b>754.4</b>	<b>754.9</b>	<b>825.5</b>	<b>829.4</b>	<b>833.6</b>	<b>802.6</b>	<b>796.0</b>	<b>752.8</b>	<b>764.8</b>	<b>800.3</b>	<b>824.9</b>	<b>889.1</b>	<b>885.5</b>	<b>821.6</b>

## CAPÍTULO 4

# COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MIEL PARA SU DETERMINACIÓN POR GC-MS

### 4.1. INTRODUCCIÓN

En el análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases, su fraccionamiento constituye la etapa más crítica de la determinación. Las técnicas más utilizadas para llevarlo a cabo se basan en las diferencias de volatilidad y polaridad entre los analitos de interés y la matriz de la muestra.

En las técnicas basadas en la volatilidad de los compuestos, como el **análisis del espacio de cabeza**, el principal inconveniente es la diferencia entre la recuperación de los distintos compuestos, que puede llegar a ser muy baja y afectar a la sensibilidad global.

Las técnicas de **extracción con disolventes orgánicos**, basadas en las diferencias de polaridad entre los compuestos volátiles y la matriz no volátil, pueden presentar problemas en la determinación de los compuestos más volátiles, en la extracción de componentes de baja volatilidad y en la baja recuperación de compuestos volátiles poco solubles.

Estos inconvenientes se han tratado de resolver, al menos parcialmente, mediante diferentes técnicas.

La **extracción-destilación simultánea** (SDE) consigue extractos libres de compuestos no volátiles, al ser el destilado, y no la muestra, el que entra en contacto con el disolvente. Además, con ella se mejoran las recuperaciones obtenidas por la extracción con disolventes. Sin embargo, las altas temperaturas necesarias para la destilación de la muestra y la presencia de agua producen la alteración de los compuestos termolábiles, con formación de productos de degradación.

El desarrollo de unos dispositivos de **extracción-destilación simultánea a presión reducida** (Maignial *et al.* 1992), permitió disminuir considerablemente la temperatura

necesaria para la destilación (Blanch *et al.*, 1996). Sin embargo, estos dispositivos presentan problemas en su aplicación a la extracción de compuestos volátiles de la miel, ya que los disolventes más ligeros pueden evaporarse totalmente debido a la baja presión, mientras que el uso de disolventes con puntos de ebullición más altos provocaría la pérdida de la mayor parte de compuestos volátiles en la etapa de concentración de la muestra.

Para evitar estos problemas causados por la simultaneidad de los dos procesos, se ha propuesto un fraccionamiento en dos etapas: **destilación a vacío** de la muestra seguida de su **extracción con un disolvente orgánico** adecuado (Lee. *et al.*, 2001).

En los últimos años la **microextracción en fase sólida (SPME)** ha sido ampliamente utilizada para el fraccionamiento de compuestos volátiles en muestras muy variadas, como frutas, verduras, leche, cerveza o agua, entre otras (Ceballos *et al.*, 2005; Perkins *et al.*, 2005; Pinho *et al.*, 2006; Quintana *et al.*, 2006). Con ella se evitan los problemas asociados con el uso de disolventes y de altas temperaturas. Además se trata de una técnica sencilla, rápida, económica y muy versátil, debido a la variedad de fibras existentes comercialmente. El mayor inconveniente atribuido a la SPME es la baja precisión de los resultados cuantitativos, debido a problemas asociados con su recuperación y con el empleo de patrón interno. Sin embargo, la precisión mejora notablemente cuando se utilizan datos de concentración relativos (Soria *et al.*, 2003).

La elección de la técnica de fraccionamiento más adecuada depende de la muestra a analizar (tanto de la matriz no volátil como de los compuestos de interés) y de los objetivos del estudio. Los trabajos detallados en esta memoria, tienen como principal objetivo la caracterización de muestras a partir de su composición volátil y la evaluación del potencial de esta caracterización para la diferenciación de distintas muestras. En este tipo de estudios la precisión de los resultados es mucho más importante que su exactitud, y, en consecuencia, no se requiere la determinación cuantitativa absoluta de cada compuesto individual. Sin embargo, es importante la obtención de datos para el mayor número posible de componentes y el evitar la formación de compuestos no presentes inicialmente en la muestra.

Para seleccionar la técnica de fraccionamiento a emplear en los siguientes trabajos se llevó a cabo un estudio comparativo de las dos técnicas que, partiendo de las

consideraciones anteriores, parecían mostrar mayores ventajas: la microextracción en fase sólida y la destilación a vacío seguida de la extracción líquido-líquido.

Para el fraccionamiento por SPME se utilizó un método previamente desarrollado y validado en nuestro laboratorio para la determinación de compuestos volátiles en miel (Soria *et al.*, 2003), mientras que la destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido fue una modificación del método utilizado por Lee (Lee *et al.*, 2001).

En ambos casos se utilizaron datos cuantitativos relativos, ya que estudios preliminares revelaron una mayor dispersión de los datos, para ambos métodos, con el empleo de patrón interno.

La comparación de ambos métodos se llevó a cabo poniendo especial atención en el número y tipo de compuestos recuperados en cada caso, tanto para la evaluación de la técnica más adecuada como para estudiar la posibilidad del uso conjunto de las dos técnicas para conseguir una caracterización más completa de las muestras.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. MUESTRAS**

Se adquirieron 11 mieles artesanales de azahar (3 muestras), trébol (6) y zarzamora (2) producidas en distintas zonas de California durante 2004.

### **4.2.2. FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS VOLÁTILES**

#### **4.2.2.1. Destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido**

Se pesaron 50 g de cada muestra de miel en un matraz de fondo redondo de 500 ml con 50 ml de agua destilada. La disolución fue destilada a presión reducida (95mm Hg) a 55° C durante 45 minutos.

El destilado obtenido fue sometido a extracción líquido-líquido en un extractor en continuo con 25 ml de diclorometano durante 3 horas.

El extracto fue secado con sulfato sódico anhidro y concentrado primero en un rotavapor (RE-47), a 40° C hasta un volumen final de 5 ml, después bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 500 µl, del que se inyectó 1 µl en el cromatógrafo de gases.

#### 4.2.2.2. Microextracción en fase sólida (SPME)

El fraccionamiento de compuestos volátiles por SPME se seleccionó una fibra de polaridad media (C/PDMS, Supelco), compuesta de Carboxen (un tamiz molecular de carbono) y polidimetilsiloxano con un espesor de fase de 75µm. Esta fibra se acondicionó a 280° durante 1 hora para eliminar los posibles compuestos retenidos.

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el método puesto a punto por Soria (Soria *et al.* 2003). Para ello, se diluyeron 2 g de miel con 1ml de agua Milli-Q en un vial de 5ml con tapón perforado y septum recubierto de teflón. Tras introducir el vial en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos, se pasó a un baño de silicona a 60 °C en el que se mantuvo en agitación durante 15 minutos, tiempo necesario para alcanzar el **equilibrio** termodinámico entre la fase líquida y la fase gaseosa del espacio de cabeza.

A continuación se expuso la fibra al espacio de cabeza del vial un tiempo de **extracción** de 30 minutos, tras lo cual se inyectó la fibra en el Cromatógrafo de Gases durante 2 minutos, con el inyector a 280 °C, para la **desorción** térmica de los compuestos volátiles.

Después de cada inyección, la fibra se acondicionó a 280 °C durante 15 minutos y se realizó un blanco para comprobar la ausencia de compuestos aun retenidos en la misma.

#### 4.2.3. ANÁLISIS GC-MS.

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890) acoplado a un espectrómetro de masas con detector de cuadrupolo (Agilent 5973). Se utilizó un inyector Merlin (Supelco, Bellefonte, USA) para evitar la aparición de compuestos volátiles interferentes procedentes del septum. La inyección se llevó a cabo en modo splitless durante los 2 minutos de desorción de la fibra, tras lo cual se empleó una relación de split de 30:1.

Se usó una columna de Carbowax 20M, de dimensiones (50m x 0.2mm d.i. x 0.2µm espesor de fase). Se utilizó Helio (pureza 99.999 %) como gas portador, a una velocidad lineal de 25 cm·s<sup>-1</sup>.

La temperatura inicial del horno, que se mantuvo durante 2 min fue de 40°C. Después se incrementó a razón de 4°C min.<sup>-1</sup> hasta 190°C, manteniéndose a dicha temperatura durante 30 min.

La ionización fue producida por impacto electrónico (70ev), registrándose un intervalo de masas entre 35-350 m/z. Las temperaturas de la interfase y de la cámara fueron 280 °C y 230 °C respectivamente.

Para la adquisición y tratamiento de datos se utilizó el software HP G1034C v.C.01.05 MS ChemStation. La identificación de los picos se realizó por comparación con la biblioteca de espectros Wiley/NBS Registry (F.W. McLafferty, D.B. Stauffe, New York, 1989) y se confirmó, en los casos en que fue posible, mediante el cálculo de los índices lineales de retención (Van der Dool *et al.*, 1963) tras la inyección de mezclas de alcanos desde n-heptano a n-pentacosano disueltos en pentano.

Los valores relativos de las áreas se obtuvieron directamente de la integración del registro total de iones (TIC).

Todos los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

### 4.3. RESULTADOS

El anexo 1 muestra los 107 compuestos identificados en las muestras de miel analizadas por destilación a vacío seguida de extracción con disolventes (D+E) y por microextracción en fase sólida (SPME), así como las concentraciones relativas obtenidas por cada técnica.

En la tabla 1 figuran los datos relativos medios de concentración obtenidos para cada origen por las dos técnicas, lo que nos permitió la comparación de los tipos de perfiles obtenidos a partir de cada una. El ácido acético, furfural y 5-metilfurfural aparecen en las

mieles en concentraciones muy variables, que pueden ser muy elevadas en algunos casos. Debido a que estas grandes variaciones pueden estar más relacionadas con problemas de almacenamiento que con el tipo de miel (v. Capítulo 8), se decidió no incluir estos compuestos en la tabla 1. En consecuencia, las concentraciones relativas medias de la tabla 1 aparecen ligeramente modificadas con respecto a las del anexo IV.

**Tabla 1.** Concentraciones promedio obtenidas para cada origen por SPME y destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido (D+E).

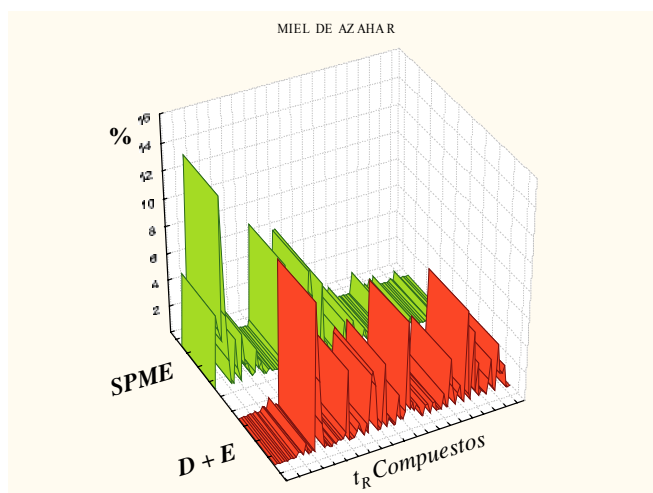
COMPUESTOS	t <sub>R</sub>	AZAHAR		TREBOL		ZARZAMORA	
		D+E	SPME	D+E	SPME	D+E	SPME
Sulfuro de dimetilo	4.1	0.0	5.3	0.0	9.9	0.0	15.1
Acetona	4.8	0.0	4.2	0.0	9.9	0.0	9.5
Acetato de etilo	5.8	0.0	3.4	0.0	6.3	0.0	0.0
Etanol	6.7	0.0	13.7	0.0	7.5	0.0	5.7
2,3-Butanodiona	7.8	0.0	5.1	0.0	6.2	0.0	14.1
n.i. (97, 55, 85)	8.3	0.0	1.7	0.0	0.2	0.0	0.0
Acetonitrilo	9.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0
Tolueno	10.1	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0
Disulfuro de dimetilo	10.6	0.0	3.2	0.0	1.5	0.0	0.0
Butanol o metilpropanol	11.2	0.3	1.0	0.3	1.3	0.0	0.0
4-Metil-3-Penten-2-ona	12.8	0.3	0.0	0.7	0.1	0.3	0.0
n.i. (110, 137)	15.3	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metil-1-butanol	15.3	0.8	1.1	0.0	2.9	0.0	2.2
n.i. (110, 137)	16.5	0.0	1.1	0.0	0.5	0.0	0.0
3-Metil-3-buten-1-ol	17.1	0.0	0.4	0.1	0.5	0.0	0.0
Dihidro-2-metil-3(2H)-Furanona	17.6	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
4-Cianobuteno	17.9	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Acetoina	18.4	10.6	1.9	3.5	0.7	3.1	0.0
Hidroxiopropanona	19.0	5.0	0.5	5.4	0.8	7.8	1.4
2-Hidroxiopropanoato de etilo	20.3	1.9	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0
4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	21.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-Hidroxi-2-butanona	21.6	0.2	0.0	0.4	0.0	0.9	0.0
3-Hexen-1-ol	21.7	0.0	0.2	0.6	0.6	0.0	0.0
Trisulfuro de dimetilo	22.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 45	22.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
4-Penten-2-ol	22.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
Nonanal	22.1	0.3	0.0	1.3	0.0	0.3	0.0
2-Butoxi-etanol	22.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 59,93	22.5	0.2	0.0	0.4	0.0	0.5	0.0
4,4-Dimetilheptano (85,113,128)	23.6	0.6	0.4	0.0	0.3	0.0	0.0
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	23.8	5.0	7.4	3.1	4.1	3.8	4.8



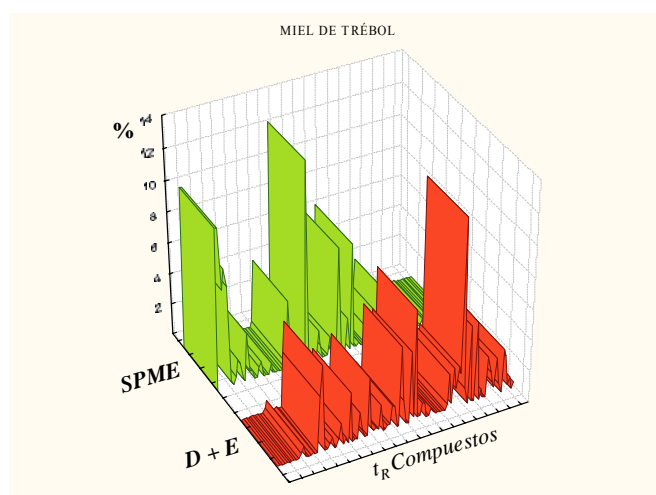
COMPUESTOS	t <sub>R</sub>	AZAHAR		TREBOL		ZARZAMORA	
		D+E	SPME	D+E	SPME	D+E	SPME
1-Metoxi-4-metilbenceno	24.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	1.6
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	24.7	2.1	1.9	1.7	1.6	3.6	1.1
2-metil-1,3-dioxolano	25.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
2-Etil-1-hexanol	25.3	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0
Decanal	25.8	0.5	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0
1-(2-Furanil)etanona	26.2	0.9	1.1	0.5	1.1	1.8	12.0
(3,9-Epoxi- $\Delta$ -menteno)	26.5	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
1-(1,4-dimetil-3-ciclohexenil)etanona	26.7	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Benzaldehido	26.9	0.7	3.3	3.7	12.1	3.1	4.7
$\alpha$ -terpinoleno	27.2	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
aldehido de lila 1	27.3	4.1	6.5	0.2	0.7	2.3	9.1
aldehido de lila 2	27.8	4.4	6.5	0.3	1.0	0.4	0.8
aldehido de lila 3	28.1	3.3	4.5	0.2	0.7	0.6	0.4
Ácido 2-metilpropanoico	28.2	0.0	0.0	1.7	1.7	1.6	0.4
Dimetilsulfóxido	28.5	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
n.i. (71,113)	28.7	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
aldehido de lila 4	28.9	4.7	5.2	0.3	0.7	0.3	0.6
hexadecano	29.1	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
isoforona	29.2	0.7	0.7	1.4	1.0	1.0	1.7
hotrienol	29.3	0.3	0.1	1.3	0.4	3.5	1.9
n.i. (79,94) isómero 1	29.8	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (79,94) isómero 2	29.9	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Ácido butanoico	30.1	2.1	1.7	5.0	6.5	4.2	3.5
Decanoato de etilo	30.2	0.3	0.0	1.6	0.0	0.7	0.0
5-Metil-2-(1-metiletil)ciclohexanol	30.4	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
2(3H)-Furanone, dihidro-	30.6	0.7	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0
Fenilacetaldhido	30.8	7.1	1.9	4.4	2.0	4.4	1.6
2-Furanmetanol	31.1	0.8	0.3	0.3	0.0	1.8	0.0
Ácido 3-metilbutanoico	31.4	1.2	0.9	7.0	6.5	3.8	3.5
5-Etenildihidro-5-metil-2-(3H)furanona	31.7	0.6	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0
n.i. (79,94,152)	32.0	1.0	1.8	0.2	0.0	0.0	0.0
$\alpha$ -terpineol + Oxoisoforona	32.3	0.7	0.4	0.9	0.2	1.8	1.3
Heptadecano	32.3	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0
Dodecanal	32.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (111,93,155)	33.1	0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Eucarvona	33.5	0.7	0.9	0.4	0.9	0.0	0.0
Epoxilinalol	33.5	0.0	0.1	0.1	0.0	1.0	0.0
n.i. (111,93,155)	33.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,4,5-Trimetilfenol	34.1	0.7	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Epoxilinalol	34.1	0.0	0.0	0.0	1.7	1.6	0.0
7-Etil-1,4-Dimetilazuleno	34.9	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
2,2,6-Trimetil-1,4-Ciclohexanediona	35.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0

COMPUESTOS	t <sub>R</sub>	AZAHAR		TREBOL		ZARZAMORA	
		D+E	SPME	D+E	SPME	D+E	SPME
n.i. (111,93,155)	35.0	1.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
n.i. (60,87)	35.1	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0
Octadecano	35.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
n.i. (115,126,140,159)	36.2	3.4	0.0	2.5	0.0	3.4	0.0
Ácido hexanoico	36.6	1.4	1.5	1.2	2.3	1.0	2.4
p-cimen-1-ol	36.8	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0
n.i. (71, 89, 173)	37.2	0.8	0.0	2.1	0.0	1.1	0.0
Alcohol bencílico	37.7	1.3	0.1	11.7	0.8	3.8	0.0
n.i. (71, 89, 173)	37.8	0.2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (93,119,134)	38.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Feniletanol	38.7	6.5	0.4	4.9	0.1	5.6	0.0
n.i. (117,146)	39.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ácido heptanoico	39.6	0.0	0.6	0.0	0.7	0.0	0.5
2-Metoxi-6-metil-piracina	40.8	4.8	0.3	5.0	0.1	0.0	0.0
p-Menta-1(7),8(10)-dien-9-ol	40.9	0.5	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
Fenol	41.4	2.5	0.1	0.6	0.5	0.0	0.0
p-Menta-1(7),8(10)-dien-9-ol	41.8	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Furancarboxilato de metilo	42.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4-Metoxibenzaldehido	42.2	0.2	0.0	2.5	0.4	20.1	0.0
3-Fenil-2-Propenal	42.7	0.0	0.0	1.5	0.0	1.1	0.0
n.i. (60,73,131)	42.7	1.0	0.0	0.8	0.1	0.0	0.0
n.i. (71,87,107)	45.9	2.5	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
Ácido nonanoico	46.6	0.3	0.1	2.2	0.1	0.0	0.0
2-Metoxi-4-(2-propenII)fenol	47.1	0.0	0.0	0.6	0.0	1.8	0.0
Antranilato de metilo	50.6	3.3	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Ácido decanoico	51.6	1.2	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0
n.i. (112,183,201)	53.3	1.2	0.0	2.2	0.0	1.9	0.0
n.i. (71,67,119,137)	53.8	1.6	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
Alcano	54.3	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0
Ácido hexadecanoico	55.3	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0
Alcano	59.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0

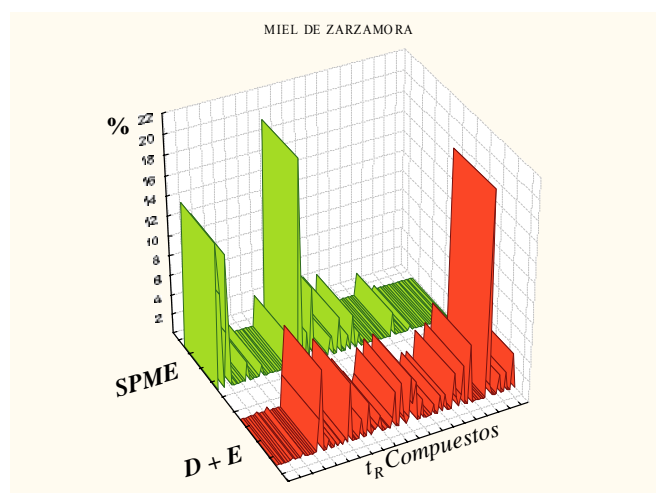
En las figuras 1, 2 y 3 se muestra un perfil gráfico para el conjunto de los compuestos obtenidos por las dos técnicas de fraccionamiento utilizadas, en el que se representan sus concentraciones relativas promediadas para cada uno de los orígenes estudiados (azahar, trébol y zarzamora).



**Figura 1.** Concentraciones relativas medias de los compuestos volátiles de las mieles de azahar obtenidos por destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido (D+E) y por microextracción en fase sólida (SPME).



**Figura 2.** Concentraciones relativas medias obtenidas para los compuestos volátiles determinados en las mieles de TRÉBOL por las dos técnicas estudiadas (D+E y SPME).



**Figura 1.** Concentraciones relativas medias obtenidas para los compuestos volátiles determinados en las mieles de ZARZAMORA por las dos técnicas estudiadas (D+E y SPME).

Los resultados muestran que las dos técnicas permiten la determinación de un elevado número de compuestos, cuya recuperación es muy variable dependiendo de la técnica de fraccionamiento elegida. La microextracción en fase sólida (SPME) recupera en mayor proporción relativa los compuestos de más rápida elución en los cromatogramas, mientras que con la destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido se obtienen en mayor proporción los compuestos de índices de retención más elevados.

Comparando los datos para compuestos individuales, la **SPME** mostró una recuperación relativa más elevada para los alcoholes isoamílicos, benzaldehído, aldehídos de lila y ácidos hexanoico y heptanoico. Compuestos muy volátiles tales como la 2,3-butanodiona, y el sulfuro, el disulfuro y el trisulfuro de dimetilo, entre otros, se detectaron sólo mediante técnica. Los compuestos con azufre se han señalado como característicos de algunas mieles, como las mieles de eucalipto (Bouseta *et al.*, 1992), al igual que la 2,3-butanodiona (Bouseta *et al.*, 1996). Los aldehídos de lila parecen característicos del origen floral de azahar (Alissandrakis *et al.*, 2003). Los alcoholes isoamílicos y el benzaldehído están presentes en algunas mieles en concentraciones relativamente altas. Los ácidos hexanoico y heptanoico no suelen aparecer en concentraciones altas en la miel, por lo que algunas técnicas de fraccionamiento no los detectarán.

Con la **destilación a vacío** seguida de **extracción líquido-líquido** se obtienen recuperaciones más elevadas de varias hidroxiketonas (acetoina, hidroxipropanona y 1-hidroxi-2-butanona), aldehídos lineales (nonanal y decanal), fenilacetaldehído, alcohol bencílico, 2-feniletanol y antranilato de metilo, entre otros. Todos estos compuestos parecen estar relacionados con el origen floral (White, 1966; Piasenzotto *et al.*, 2003; Serra-Bonheví *et al.*, 2003), y algunos de ellos han sido relacionados con el aroma típico de la miel (Belitz y Groch, 1987). Sin embargo, todos ellos también se detectaron mediante SPME.

Es de notar la presencia de los ácidos nonanoico y decanoico únicamente en los extractos obtenidos a partir de la destilación, ya que la recuperación relativa de otros ácidos de menor peso molecular (ácidos hexanoico y heptanoico) por esta técnica fue, como se ha comentado, inferior a la obtenida por SPME.

Algunos alcanos y un compuesto no identificado (n.i. [112,183,201]) con tiempo de retención  $t_R=53.3\text{min}$  sólo se detectaron mediante destilación y extracción líquido-líquido, la posterior realización de un blanco mediante la concentración del mismo volumen de disolvente reveló que se trataba de impurezas del disolvente.

#### 1.4. CONCLUSIONES

Los resultados preliminares obtenidos en este estudio muestran que las dos técnicas utilizadas pueden resultar adecuadas para una caracterización con fines comparativos a partir de la composición volátil de la miel. Además, ambas técnicas pueden utilizarse conjuntamente en los casos en que sea requerida una caracterización más completa de las muestras, debido a que aportan información complementaria en las distintas zonas de elución del cromatograma.

La obtención de algunos compuestos con elevados índices de retención en proporción superior a la conseguida mediante SPME constituye la principal ventaja de la **destilación a vacío** seguida de **extracción líquido-líquido**. Sus principales inconvenientes son la pérdida de los compuestos más volátiles, la aparición de compuestos que no están presentes inicialmente en la muestra, y su mayor lentitud con relación a la SPME, ya que tiene lugar en tres etapas (destilación, extracción líquido-líquido y concentración del extracto), cada una de las cuales requieren un tiempo considerable.

A pesar de la ausencia de algunos compuestos obtenidos en la destilación con extracción líquido-líquido, las fracciones obtenidas mediante **SPME** muestran recuperaciones suficientes para la mayoría de los compuestos, destacando especialmente las correspondientes a los compuestos de mayor volatilidad, de difícil obtención por otras técnicas. Además, la rapidez y sencillez del fraccionamiento, y la ausencia de compuestos interferentes en el análisis hacen aun más recomendable el empleo del SPME, por lo que esta técnica fue seleccionada para llevar a cabo los estudios posteriores, mediante la utilización del método descrito, desarrollado y validado previamente en nuestro laboratorio (Soria *et al.*, 2003).



## CAPÍTULO 5

### EMPLEO DE DATOS CUALITATIVOS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA MIEL FRACCIONADOS POR SPME

#### 5.1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de separación de componentes volátiles de una matriz, frecuentemente empleadas con el objetivo de llevar a cabo su posterior análisis por GC o GC-MS, pueden basarse en la recuperación de parte del contenido de estos compuestos (técnicas de fraccionamiento), o en el aislamiento de su cantidad total en la muestra (técnicas de extracción exhaustiva).

En el estudio de muestras complejas es muy frecuente el uso de técnicas de fraccionamiento, donde la recuperación de cada compuesto, definida como el cociente entre la cantidad extraída y la presente en la muestra, es muy variable dependiendo de sus características y de la técnica empleada. Para conocer con exactitud la concentración de cada compuesto es necesaria la determinación del valor de dicha recuperación.

Cuando una muestra es sometida a varias etapas sucesivas de extracción parcial, la cantidad extraída, al depender de la concentración del compuesto remanente en la muestra, decrece en cada etapa con una velocidad diferente para cada compuesto. La suma de las cantidades extraídas en la totalidad de etapas necesarias para obtener una respuesta analítica nula correspondería a la cantidad total de compuesto presente originalmente en la muestra. Este fraccionamiento en múltiples etapas ha sido utilizado por diferentes autores (Kolb *et al.*, 1982, 1984, 1990a,b, 1991; Vitenberg *et al.*, 1984; Venema *et al.*, 1986, 1988, 1990; Kostianem *et al.*, 1994) en la extracción por arrastre de vapor con gas inerte.

Las ventajas que presenta la microextracción en fase sólida para la determinación de compuestos volátiles con fines comparativos se han consignado en el capítulo 4. Se trata de un método de extracción parcial, por lo que para conseguir estimar el contenido total de un compuesto podría llevarse a cabo un fraccionamiento por etapas. Sin embargo, la aplicación

de este tipo de fraccionamiento en la forma en que se ha descrito para el fraccionamiento por arrastre con gas inerte presenta como principal inconveniente la menor recuperación de los compuestos en la SPME, lo que conllevaría un número de etapas muy elevado.

Como la recuperación de los compuestos depende de las características de cada uno de ellos, su valor debe estar relacionado con la estructura de cada analito. En este capítulo se describe un estudio en el que se trata de relacionar la recuperación obtenida experimentalmente con algunos parámetros cualitativos, como el peso molecular, la presencia de varios grupos funcionales y los índices de retención del compuesto en distintas fases cromatográficas. La identificación de los compuestos volátiles fraccionados por SPME seguido de GC-MS suele ser sencilla, ya que se trata frecuentemente de grupos de bajo peso molecular poco funcionalizados: conocida su estructura, la definición de parámetros como presencia o número de ciertos grupos funcionales o peso molecular es inmediata. El análisis de estos proporciona también sus datos de retención, que en la forma de índices de retención dependen muy poco de las condiciones de análisis y encierran información estructural, sobre todo cuando se obtienen para más de una fase estacionaria.

A partir de la recuperación obtenida para 30 patrones presentes en concentraciones conocidas en un sistema modelo de características similares a la miel, y de parámetros cualitativos característicos de estos patrones, se ha estudiado la posibilidad de estimar los valores de recuperación para los distintos compuestos volátiles de la miel, empleando modelos matemáticos lineales, no lineales y redes neuronales.



## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. PATRONES

Los patrones empleados, todos de calidad analítica y de pureza adecuada para GC, fueron los siguientes: 3-hexen-1-ol, ácido decanoico, ácido octanoico, antranilato de metilo, carvacrol,  $\alpha$ -pineno, p-1-Menten-9-ol, hexanol y linalol de Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania; benzaldehido de PolyScience Corp., Niles, IL, USA.; óxido de linalilo (mezcla de isómeros *cis* y *trans*), 1-heptanol, 2,3-butanodiol, 2,3-butanodiona, 2-etil-1-hexanol, 3-metil-2-butanol, limoneno, nonanal, fenilacetaldehido, terpinen-4-ol y terpineno de Fluka Chemie, Buchs, Suiza; 1-nonanol, 2-heptanona, disulfuro de dimetilo y 2-feniletanol, de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; acetoina de Merck, Darmstadt, Alemania; y alcohol bencílico de Scharlau Chemie, Barcelona.

### 5.2.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

Se prepararon 3 disoluciones con 10 patrones cada una correspondientes a compuestos presentes habitualmente en la miel. Los compuestos y sus concentraciones en los 3 sistemas modelo preparados (SM 1, SM 2 y SM 3) se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Sistemas modelo preparados para el estudio de la recuperación de los patrones.

DISOLUCIÓN A		DISOLUCIÓN B		DISOLUCIÓN C	
COMPUESTOS	$\mu\text{g/ml}$	COMPUESTOS	$\mu\text{g/ml}$	COMPUESTOS	$\mu\text{g/ml}$
Ácido octanoico	9.4	Acetoina	10.3	Ácido decanoico	9.7
Antranilato de metilo	13.5	Alcohol bencílico	9.8	Carvacrol	12.4
2,3-Butanodiol	9.4	Benzaldehido	9.2	2-Etil-1-hexanol	11.7
2,3-Butanodiona	12.7	Disulfuro de dimetilo	11.7	2-Heptanona	11.1
Fenilacetaldehido	22.1	1-Heptanol	9.5	3-Hexen-1-ol	9.4
2-Feniletanol	25.8	$\beta$ -Ionona	10.4	p-1-Menten-9-ol (I)	10.0
Hexanol	9.7	Limoneno	12.3	p-1-Menten-9-ol (II)	
3-Metil-2-butanol	10.7	Linalol	10.1	$\alpha$ -Pineno	9.4
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	10.2	Nonanal	10.3	Terpineno	11.1
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	10.4	1-Nonanol	9.4	Terpinen-4-ol	10.5

### **5.2.3. CÁLCULO DE LA RECUPERACIÓN DE LOS PATRONES.**

#### **5.2.3.1. Preparación de los sistemas modelo.**

Se prepararon varios viales con 1.5g de fructosa diluidos en 1.5ml de agua, simulando la composición de las muestras utilizadas en el método de fraccionamiento de compuestos volátiles en miel por SPME. 200 $\mu$ l de cada una de las disoluciones de patrones de la tabla 1 se añadieron a tres de estos viales por separado para evitar la posible coelución entre compuestos; las concentraciones resultantes oscilaron entre 0.92 y 2.6  $\mu$ g/g miel para cada patrón. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado. Las muestras fueron ultrasonificadas durante 5min para conseguir su homogenización.

#### **5.2.3.2. Fraccionamiento de compuestos volátiles por SPME**

El fraccionamiento de los compuestos volátiles de la miel por SPME se llevó a cabo siguiendo el método desarrollado por Soria (Soria *et al.*, 2003) y detallado en el Capítulo 4, apartado 4.2.3 de la presente memoria

#### **5.2.3.3. Análisis GC-MS**

Las condiciones cromatográficas, así como el análisis cualitativo y cuantitativo de los cromatogramas obtenidos se realizaron tal y como se indica en el capítulo 4, apartado 4.2.4.

#### **5.2.3.4. Cálculo de los índices de retención de los compuestos.**

Se inyectaron mezclas desde *n*-heptano a *n*-pentacosano disueltos en *n*-pentano para calcular los índices de retención lineales (a temperatura programada) de los distintos compuestos en las dos fases estacionarias utilizadas: metilpolisiloxano y polietilenglicol.

### **5.2.4. MODELOS QUE RELACIONAN LA RECUPERACIÓN CON LA ESTRUCTURA MOLECULAR MEDIANTE PARÁMETROS CUALITATIVOS.**

Como una primera aproximación a un estudio de la relación entre la recuperación y la estructura de los compuestos se propusieron varios modelos matemáticos, con el fin de encontrar el más adecuado para predecir la recuperación de los compuestos.

Los datos de partida fueron los resultados experimentales de recuperación de los 30 compuestos estudiados en los sistemas modelo, más los siguientes parámetros cualitativos de cada uno de ellos:

- **Indices de Retención (IR)** en dos fases estacionarias distintas: polietilenglicol 20M y metilpolisiloxano.
- **Peso molecular** del compuesto.
- Otros descriptores moleculares basados en la estructura: presencia de **grupos alcohol, ácidos, grupos aromáticos, número de carbonos, de hidrógenos y suma de oxígeno, azufre y nitrógeno.**

Los modelos utilizados se basan en la expresión:

$$R_{x,c} = f(P_{i,x,c}) \quad [1]$$

Donde  $R_{x,c}$ , la recuperación del compuesto  $x$  en las condiciones  $c$ , viene dada como una función de diversos parámetros de tipo cualitativo  $P_{i,x,c}$ , cuyo valor depende del compuesto y condiciones de análisis empleadas. Se plantearon 3 modelos:

- **Modelo MR1**

Supone una relación lineal aditiva, expresada por la ecuación:

$$R_{x,c} = \Sigma(C_{i,c} \cdot P_{i,x,c}) \quad [2]$$

donde  $C_{i,c}$  representa las contribución a la recuperación de cada descriptor  $P_{i,x,c}$ .

El valor de la recuperación siempre está comprendido en el intervalo (0,1), mientras que los valores de esta expresión aditiva no están limitados a este intervalo. El efecto de los descriptores sobre la recuperación debe según esto no ser lineal, lo que conduciría a errores elevados en la predicción de la recuperación mediante el modelo MR1. Sin embargo, dicho modelo presenta como ventaja el que permite obtener una primera aproximación mediante una expresión sencilla, con resultados fáciles de interpretar.

- **Modelo MR2**

Los inconvenientes del modelo MR1 podrían subsanarse empleando funciones  $f$  de tipo sigmoïdal, cuyo resultado se limite al intervalo  $[0,1]$ :

$$R_{x,c} = f(\Sigma(C_{i,c} \cdot P_{i,x,c})) \quad [3]$$

Entre ellas se ha elegido:

$$R_{x,c} = 1 / (1 + P1 \cdot \exp(\Sigma(C_{i,c} \cdot P_{i,x,c}))) \quad [4]$$

que presenta el problema, común a cualquier expresión no lineal definida a partir de [3], de requerir para el ajuste métodos de regresión múltiples no lineales. Sin embargo, una transformación permite obtener a partir de [4] la expresión lineal [5]:

$$\text{Log}(1/R_{x,c} - 1) = \Sigma(C_{i,c} \cdot P_{i,x,c}) + \text{cte} \quad [5]$$

a la que puede aplicarse la regresión lineal múltiple por mínimos cuadrados para la obtención de los parámetros  $P_{i,x,c}$  y a partir de ellos de los valores estimados de  $R_{x,c}$ .

- **Modelo MR3:** La tercera posibilidad utilizada en este trabajo ha consistido en el empleo de redes neuronales utilizando los valores de  $P_{i,x,c}$  como elementos de entrada y la recuperación  $R_{x,c}$  como única salida.

### 5.2.5. MÉTODOS DE CÁLCULO

Para los ajustes de los anteriores modelos se utilizaron los siguientes métodos y programas de cálculo:

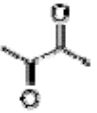


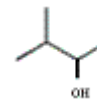



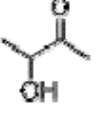



- Regresión lineal múltiple: Subprograma de Regresión Múltiple, modalidad por pasos, de STATISTICA (STATSOFT, versión 7.1).
- Redes neuronales: Tipo perceptrón multicapa (MLP), con retropropagación de error. Programa NNDT para Windows (NNDT, versión 1.40).

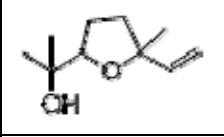

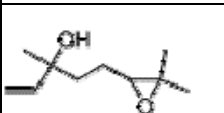
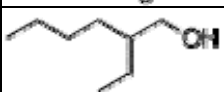
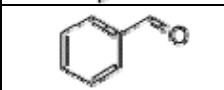
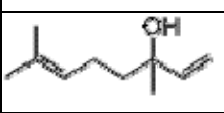
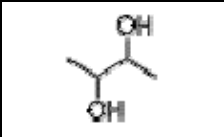
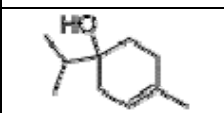
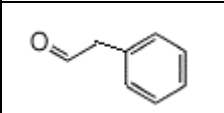
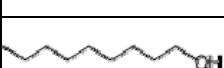
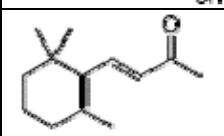
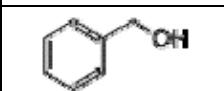
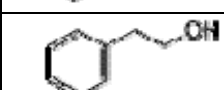
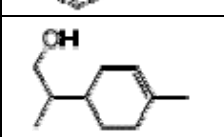
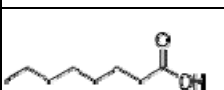
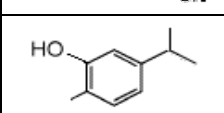
### 5.3. RESULTADOS

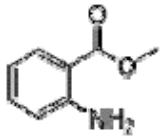

#### 5.3.1. DETERMINACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Los datos de recuperación de los distintos compuestos, así como los distintos parámetros usados se muestran en tabla 2.

**Tabla 2.** Datos experimentales de recuperación (% Rec) de los compuestos volátiles considerados y parámetros cualitativos utilizados: índices de retención en Carbowax 20M (IR C20M) y metilsilicona (IR MeSi), peso molecular (PM), grupos alcohol (-OL), ácidos (-AC), compuestos aromáticos (-AR), número de carbonos (R), hidrógenos (H), suma de oxígeno, azufre y nitrógeno (OSN) y diferencia entre los valores (IR<sub>C20M</sub> – IR<sub>MeSi</sub>) (INC).

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	R <sub>exp</sub>	IR <sub>C20M</sub>	IR <sub>MeSi</sub>	INC	PM	-OL	-AC	-AR	C	H	OSN
2,3-Butanodiona		18.83	977	655	322	86	0	0	0	4	6	2
α-Pineno		15.91	1027	926	101	136	0	0	0	10	16	0
Disulfuro de dimetilo		20.83	1063	725	338	94	0	0	0	2	6	2
3-Metil-2-butanol		4.27	1103	720	383	88	1	0	0	5	12	1
2-Heptanona		55.59	1172	872	300	114	0	0	0	7	14	1
Limoneno		46.67	1192	1013	179	136	0	0	0	10	16	0
γ-Terpineno		9.68	1230	1058	172	136	0	0	0	10	16	0
Acetoina		0.00	1279	701	578	88	1	0	0	4	8	2
1-Hexanol		6.60	1334	858	476	102	1	0	0	6	14	1
3-Hexen-1-ol		5.67	1345	844	501	100	1	0	0	6	12	1
Nonanal		5.29	1379	1079	300	142	0	0	0	9	18	1

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	R <sub>exp</sub>	IR <sub>C20M</sub>	IR <sub>MeSi</sub>	INC	PM	-OL	-AC	-AR	C	H	OSN
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )		1.68	1423	1071	352	170	1	0	0	10	18	2
1-Heptanol		12.92	1433	945	488	116	1	0	0	7	16	1
Linalool ox. ( <i>trans</i> )		1.47	1452	1089	363	170	1	0	0	10	18	2
2-Etil-1-Hexanol		14.75	1466	1015	451	130	1	0	0	8	18	1
Benzaldehido		8.70	1513	943	570	106	0	0	1	7	6	1
Linalol		3.28	1523	1085	438	154	1	0	0	10	18	1
2,3-Butanodiol		0.00	1555	789	766	90	2	0	0	4	10	2
Terpinen-4-ol		5.82	1583	1182	401	154	1	0	0	10	18	1
Fenilacetaldehido		0.11	1634	1004	630	120	0	0	1	8	8	1
1-Nonanol		7.37	1636	1137	499	144	1	0	0	9	20	1
β-Ionona		11.15	1808	1466	342	182	0	0	0	13	20	1
Alcohol bencílico		0.20	1869	1117	752	108	1	0	1	7	8	1
2-Feniletanol		0.08	1905	1080	825	122	1	0	1	8	10	1
p-ment-1-en-9-ol I		0.67	1922	1469	453	154	1	0	0	10	18	1
p-ment-1-en-9-ol II		0.66	1925	1472	453	154	1	0	0	10	18	1
Ácido octanoico		0.25	2033	1262	771	144	0	1	0	8	16	2
Carvacrol		0.66	2203	1276	927	150	1	0	1	10	12	1

COMPUESTOS	ESTRUCTURA	R <sub>exp</sub>	IR <sub>C20M</sub>	IR <sub>MeSi</sub>	INC	PM	-OL	-AC	-AR	C	H	OSN
Antranilato de metilo		0.09	2229	1320	909	151	0	0	1	8	9	3
Ácido decanoico		0.00	2242	1356	886	172	1	1	0	10	20	2

5.3.2. ESTIMACIÓN DE LA RECUPERACIÓN MEDIANTE LOS MODELOS MR1, MR2 Y MR3.

- **Modelo MR1**

El cálculo de la recuperación siguiendo el modelo lineal MR1 se llevó a cabo mediante regresión lineal múltiple utilizando el programa STATISTICA 7.1. (Stat. Soft., Inc. 1984-2005).

Los coeficientes de correlación (r) entre los distintos descriptores y la recuperación de cada compuesto se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación de los parámetros cualitativos utilizados con la recuperación

VARIABLES	r
<b>IR<sub>C20M</sub></b>	-0.533
<b>IR<sub>MeSi</sub></b>	-0.314
<b>INC</b>	-0.545
<b>PM</b>	-0.181
<b>-OL</b>	-0.463
<b>-AC</b>	-0.175
<b>-AR</b>	-0.272
<b>C</b>	-0.079
<b>H</b>	0.008
<b>O+S+N</b>	-0.346

Por lo general, las variables están correlacionadas negativamente con la recuperación. Los coeficientes de correlación más significativos se obtienen para la diferencia entre

índices de retención *INC* ( $r = -0.545$ ), para el índice de retención en Carbowax 20M ( $r = -0.533$ ), para la presencia de grupos alcohol (*-OH*) ( $r = -0.463$ ) y para el número de átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre presentes en la molécula (*O+H+N*) ( $r = -0.346$ ).

Suponiendo que la contribución de algunos de estos parámetros a la recuperación podía ser aproximadamente aditiva de acuerdo con el modelo MR1, se llevó a cabo un ajuste por regresión lineal múltiple por pasos utilizando la recuperación como variable dependiente y los mencionados parámetros como variables independientes, limitando a cuatro su número máximo. En la tabla 3 figuran los coeficientes de los parámetros incluidos en el ajuste según el modelo MR1.

**Tabla 3.** Coeficientes de las variables incluidas en el ajuste del modelo MR1

VARIABLES	COEFICIENTES
<b>IR<sub>C20M</sub></b>	-0.013
<b>-OL</b>	-8.023
<b>O+S+N</b>	-3.130
<b>INC</b>	-0.002
<b>Ord. Origen</b>	39.59

Los porcentajes de recuperación experimentales ( $\%R_{exp}$ ), los calculados por el modelo MR1 ( $\%R_{teor}$ ) y los residuos ( $\%R_{exp} - \%R_{teor}$ ) se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Valores de la recuperación experimentales ( $R_{exp}$ ), estimados mediante el modelo MR1 ( $R_{teor}$ ) y residuos obtenidos para cada compuesto.

COMPUESTOS	$\%R_{exp}$	$\%R_{teor}$	$\%R_{exp} - \%R_{teor}$
2.3-Butanodiona	18.8	19.4	-0.6
$\alpha$ -Pinoeno	15.9	25.5	-9.6
Disulfuro de dimetilo	20.8	18.2	2.6
3-Metil-2-butanol	4.3	12.7	-8.4
2-Heptanona	55.6	20.0	35.6
Limoneno	46.7	23.1	23.5
$\gamma$ -Terpinoeno	9.7	22.6	-13.0
Acetoina	0.1	6.7	-6.6
1-Hexanol	6.6	9.4	-2.8
3-Hexen-1-ol	5.7	9.2	-3.5
Nonanal	5.3	17.2	-11.9



COMPUESTOS	%R <sub>exp</sub>	%R <sub>teor</sub>	%R <sub>exp</sub> -%R <sub>teor</sub>
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	1.7	5.3	-3.7
1-Heptanol	12.9	8.0	4.9
Linalool ox. ( <i>trans</i> )	1.5	4.9	-3.5
2-Etil-1-Hexanol	14.8	7.7	7.1
Benzaldehido	8.7	14.8	-6.1
Linalol	3.3	6.9	-3.6
2.3-Butanodiol	0.1	-5.4	5.5
Terpinen-4-ol	5.8	6.2	-0.4
Fenilacetaldehido	0.1	13.0	-12.9
1-Nonanol	7.4	5.3	2.1
β-Ionona	11.1	11.3	-0.2
Alcohol bencílico	0.2	1.5	-1.3
2-Feniletanol	0.1	0.9	-0.8
p-Ment-1-en-9-ol I	0.7	1.5	-0.9
p-Ment-1-en-9-ol II	0.7	1.5	-0.8
Ácido octanoico	0.3	4.2	-3.9
Carvacrol	0.7	-3.4	4.0
Antranilato de metilo	0.1	-1.9	2.0
Ácido decanoico	0.1	-6.9	7.0

• **Modelo MR2.**

Una transformación de la variable dependiente que convierte la ecuación [4] en la ecuación [5] permite aproximar el ajuste no lineal de la ecuación [4] mediante regresión lineal. En la tabla 5 se presentan los coeficientes de correlación (r) entre los distintos descriptores y la variable transformada de la recuperación según la ecuación [5].

**Tabla 5.** Coeficientes de correlación (r) entre los descriptores utilizados y la transformada de la recuperación

VARIABLES	r
<b>IR<sub>C20M</sub></b>	0.692
<b>IR<sub>MeSi</sub></b>	0.320
<b>INC</b>	0.798
<b>PM</b>	0.102
<b>-OL</b>	0.399
<b>-AC</b>	0.333
<b>-AR</b>	0.464
<b>C</b>	-0.019
<b>H</b>	-0.204
<b>O+S+N</b>	0.497

En este caso, la variable dependiente es  $\log(100/y - 1)$ , donde  $y$  es la recuperación en %. Los valores más significativos son la diferencia entre índices de retención  $INC$  ( $r=0.798$ ), el índice de retención en Carbowax 20M ( $r=0.692$ ) y el número de átomos de oxígeno, nitrógeno y de azufre presentes en la molécula ( $r=0.497$ ).

Para evaluar las posibilidades de estimación de la recuperación mediante este modelo, se llevó a cabo una regresión lineal múltiple por pasos limitando a cuatro el número máximo de variables independientes como en el anterior modelo MR1. En la tabla 6 figuran los coeficientes de los parámetros incluidos en el ajuste según el modelo MR2.

**Tabla 6.** Coeficientes de las variables incluidas en el ajuste del modelo MR2.

VARIABLES	COEFICIENTES
INC	0.002
-OL	0.987
IR <sub>C20M</sub>	0.003
H	-0.128
Ord. Origen	-0.963

A partir de los valores de estos parámetros, se calculan los estimados para  $\log(100/y-1)$  y de aquí los valores de la recuperación que en la tabla 7 que se listan como  $\%R_{teor}$  para su comparación con  $\%R_{exp}$ .

**Tabla 4.** Valores de la recuperación experimentales ( $R_{exp}$ ), estimados mediante el modelo MR2 ( $R_{teor}$ ) y residuos obtenidos para cada compuesto ( $(\%R_{exp}-\%R_{teor})$ ).

COMPUESTOS	$\%R_{exp}$	$\%R_{teor}$	$\%R_{exp}-\%R_{teor}$
2,3-Butanodiona	18.8	12.1	6.7
$\alpha$ -Pino	15.9	41.1	-25.2
Disulfuro de dimetilo	20.8	9.3	11.6
3-Metil-2-butanol	4.3	6.1	-1.9
2-Heptanona	55.6	18.1	37.5
Limoneno	46.7	26.1	20.6
$\gamma$ -Terpineno	9.7	24.2	-14.5
Acetoina	0.1	1.5	-1.4
1-Hexanol	6.6	3.3	3.3
3-Hexen-1-ol	5.7	2.3	3.3

COMPUESTOS	%R <sub>exp</sub>	%R <sub>teor</sub>	%R <sub>exp</sub> -%R <sub>teor</sub>
Nonanal	5.3	16.4	-11.1
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	1.7	5.4	-3.7
1-Heptanol	12.9	3.0	9.9
Linalool ox. ( <i>trans</i> )	1.5	4.8	-3.4
2-Etil-1-Hexanol	14.8	3.8	10.9
Benzaldehido	8.7	1.5	7.2
Linalol	3.3	3.3	-0.1
2,3-Butanodiol	0.1	0.2	-0.1
Terpinen-4-ol	5.8	3.0	2.8
Fenilacetaldehido	0.1	1.2	-1.1
1-Nonanol	7.4	2.7	4.7
β-Ionona	11.2	5.8	5.3
Alcohol bencílico	0.2	0.2	0.0
2-Feniletanol	0.1	0.2	-0.1
p-ment-1-en-9-ol I	0.7	1.0	-0.3
p-ment-1-en-9-ol II	0.7	1.0	-0.3
Ácido octanoico	0.3	0.7	-0.5
Carvacrol	0.7	0.1	0.6
Antranilato de metilo	0.1	0.1	0.0
Ácido decanoico	0.1	0.2	-0.1

- **Modelo MR3.**

Como se ha comentado previamente, la recuperación presenta valores entre 0 y 1, por lo que su relación con los descriptores utilizados no puede ser lineal.

Las redes neuronales se han aplicado frecuentemente en la resolución de problemas no lineales, por lo que se ha utilizado un modelo basado en una red neuronal (MR3) para estimar los valores de recuperación ( $R_{teor}$ ) de los compuestos.

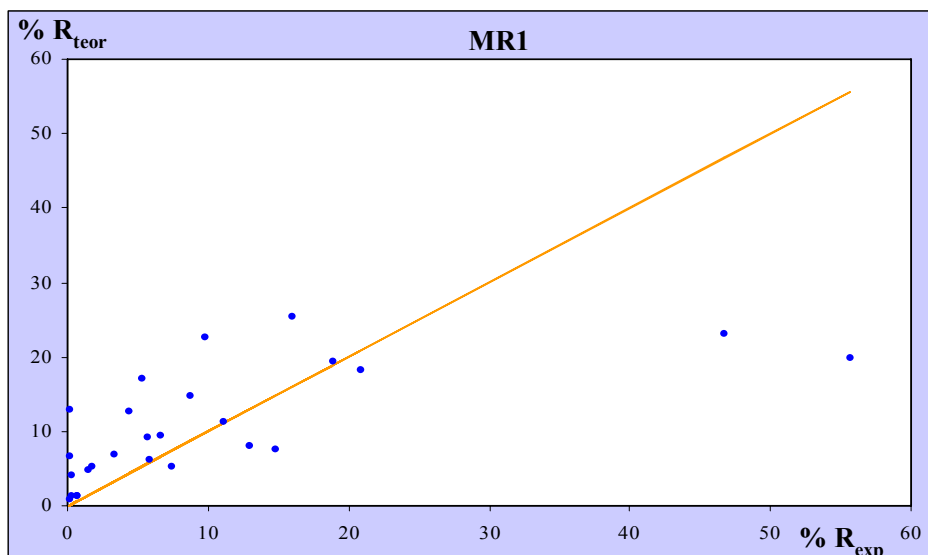
En la selección del modelo de red se buscó sobre todo su sencillez, dado el escaso número de datos disponibles. Los resultados que se exponen a continuación se obtuvieron con una configuración con sólo tres nodos de entrada, correspondientes a los parámetros peso molecular ( $PM$ ), grupos alcohol ( $-OL$ ) y diferencia entre los valores  $IR_{C20M}$  e  $IR_{MeSi}$  ( $INC$ ). Se empleó una capa oculta con cuatro nodos, mientras que el nodo único de salida correspondió a la recuperación. Las funciones de actuación fueron lineales para entrada y salida y logaritmoide simétrica para la capa oculta.

Los valores de recuperación estimados por este modelo ( $R_{teor}$ ) se detallan en la tabla 8, junto con los valores experimentales ( $R_{exp}$ ) y los residuos obtenidos ( $R_{exp}-R_{teor}$ ).

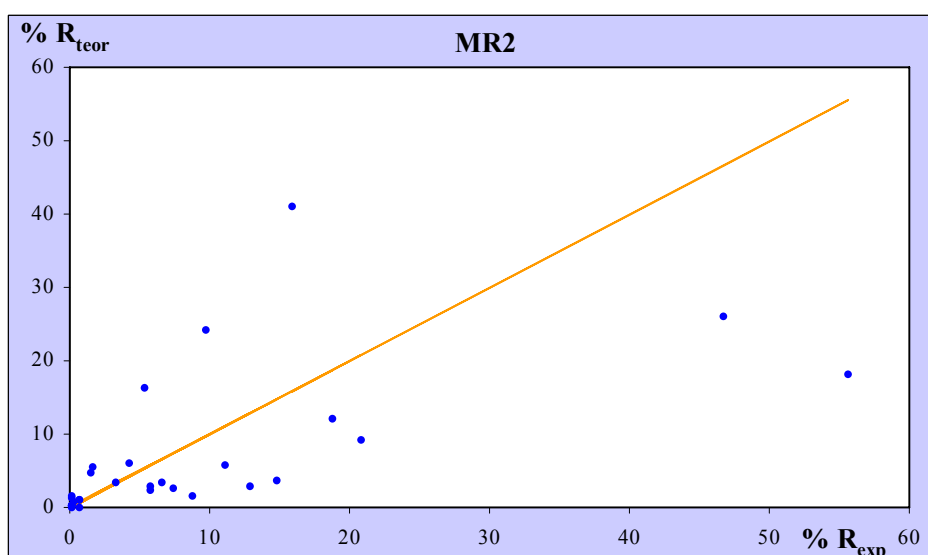
**Tabla 8.** Recuperación observada experimentalmente ( $R_{exp}$ ), estimada por el modelo MR3 ( $R_{teor}$ ) y residuos obtenidos para cada compuesto.

COMPUESTOS	$R_{exp}$	$R_{teor}$	$R_{exp}-R_{teor}$
2,3-Butanodiona	18.8	22.1	-3.3
$\alpha$ -Pino	15.9	10.6	5.3
Disulfuro de dimetilo	20.8	14.1	6.7
3-Metil-2-butanol	4.3	9.2	-4.9
2-Heptanona	55.6	53.3	2.3
Limoneno	46.7	46.6	0.1
$\gamma$ -Terpineno	9.7	15.8	-6.1
Acetoina	0.1	0.9	-0.8
1-Hexanol	6.6	9.0	-2.4
3-Hexen-1-ol	5.7	5.7	0
Nonanal	5.3	14.6	-9.3
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	1.7	2.0	-0.3
1-Heptanol	12.9	9.2	3.7
Linalool ox. ( <i>trans</i> )	1.5	2.0	-0.5
2-Etil-1-Hexanol	14.8	9.2	5.6
Benzaldehido	8.7	4.5	4.2
Linalol	3.3	2.6	0.7
2,3-Butanodiol	0.1	-1.6	1.7
Terpinen-4-ol	5.8	2.5	3.3
Fenilacetaldhido	0.1	3.6	-3.5
1-Nonanol	7.4	8.9	-1.5
$\beta$ -Ionona	11.2	4.4	6.8
Alcohol bencílico	0.2	0.7	-0.5
2-Feniletanol	0.1	0.6	-0.5
p-ment-1-en-9-ol I	0.7	2.6	-1.9
p-ment-1-en-9-ol II	0.7	2.6	-1.9
Ácido octanoico	0.3	2.1	-1.8
Carvacrol	0.7	0.3	0.4
Antranilato de metilo	0.1	1.3	-1.2
Ácido decanoico	0.1	0.1	0

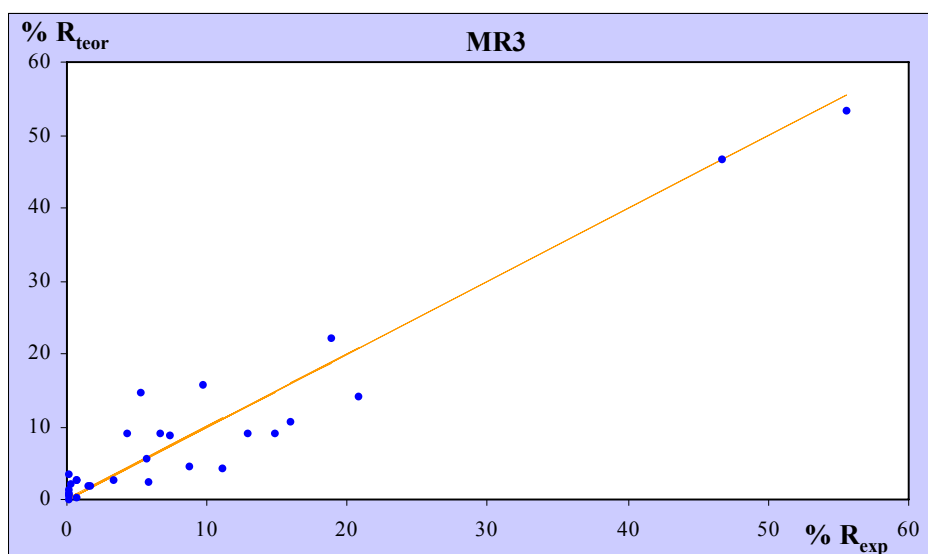
Las figuras 1, 2 y 3 muestran la representación gráfica de los valores de recuperación experimentales ( $\% R_{exp}$ ) frente a los valores teóricos ( $\% R_{teor}$ ) estimados por los modelos MR1, MR2 y MR3, respectivamente.



**Figura 1.** Valores porcentuales de recuperación experimental ( $\% R_{exp}$ ) frente a recuperación estimada por el modelo MR1 ( $\% R_{teor}$ ).



**Figura 2.** Valores porcentuales de recuperación experimental ( $\% R_{exp}$ ) frente a recuperación estimada por el modelo MR2 ( $\% R_{teor}$ ).



**Figura 3.** Valores porcentuales de recuperación experimental ( $\% R_{exp}$ ) frente a recuperación estimada por el modelo MR3 ( $\% R_{teor}$ ).

La tabla 9 muestra los coeficientes de correlación ( $r$ ), error medio y error cuadrático medio (RMS) obtenidos para cada uno de los tres modelos considerados.

**Tabla 9.** Coeficiente de correlación ( $r$ ), error medio y error cuadrático medio obtenidos por los modelos MR1, MR2 y MR3.

	MR1	MR2	MR3
<b>r</b>	0.660	0.604	0.960
<b>Error medio</b>	6.290	6.273	2.707
<b>RMS</b>	9.667	10.583	3.623

### 5.3.3. RELACIÓN ENTRE PARAMETROS CUALITATIVOS Y RECUPERACIÓN.

La recuperación de un compuesto en una técnica de fraccionamiento depende de su estructura. Si es posible caracterizar la estructura de un compuesto a partir de los parámetros cualitativos que son relevantes en el proceso de fraccionamiento, estos parámetros pueden permitirnos una estimación de la recuperación del compuesto en la técnica considerada.

Un primer paso para la evaluación de esta posibilidad es comprobar dicha relevancia. El mecanismo de fraccionamiento de volátiles en mieles mediante SPME está basado en el reparto de los compuestos entre espacio de cabeza y fibra. La recuperación, por tanto, debe estar favorecida para compuestos de baja polaridad, y se establecerá más fácilmente para los compuestos más volátiles, por lo que suponemos que los parámetros cualitativos más relevantes serán los más relacionados con la volatilidad y la polaridad del compuesto.

- **Modelo MR1**

Al aplicar el modelo MR1, los parámetros considerados presentaron en general correlaciones negativas con la recuperación (tabla 2), siendo los más importantes la diferencia de los índices de retención en metilpolisiloxano y polietilenglicol (*INC*), el índice de retención en polietilenglicol y la presencia de grupos alcohol. Estos parámetros son los más claramente relacionados con la polaridad del compuesto.

Las contribuciones también negativas aunque de menor valor absoluto de otros parámetros menos relacionados con la polaridad (índice de retención en metilsilicona, peso molecular, número de átomos de carbono o hidrógeno, presencia de grupos aromáticos) indica la influencia, aunque en menor medida, de la volatilidad en la recuperación: un mayor número de grupos implica un mayor peso molecular, y tanto éste como la retención en metilsilicona son inversamente proporcionales a la volatilidad de un compuesto.

- **Modelo MR2**

En el modelo 2 la variable utilizada es una transformación de la recuperación (ecuación [5]), en la que ésta figura de forma inversa. Los parámetros cualitativos empleados presentan ahora coeficientes positivos como se muestra en la tabla 5, y los más correlacionados con la recuperación coinciden con los indicados en el modelo MR1, como la diferencia entre índices de retención (*INC*), el índice de retención en Carbowax 20M y el número de átomos de oxígeno y de azufre presentes en la molécula.

A pesar del notable incremento observado en los coeficientes de correlación (hasta  $r = 0.798$  para el parámetro *INC* frente a  $r = -0.545$  obtenido para el mismo en el modelo MR1), éste no puede considerarse significativo, ya que los valores de  $r$  dependen del intervalo de

valores de la variable, y la función de transformación utilizada en el modelo MR2 introduce un elemento de distorsión.

- **Modelo MR3**

Dada la especial índole de las redes neuronales, es imposible el asignar un significado a los valores relacionados con los parámetros utilizados. Sin embargo, la selección de estos parámetros constituye también una medida de su relevancia. Los mejores resultados se han conseguido con INC, con el índice de retención en polietilenglicol y con el peso molecular, lo que incluye parámetros muy característicos de polaridad y volatilidad, los más relevantes también como hemos comentado desde un punto de vista físico.

Sin embargo, no es posible descartar que otro conjunto de parámetros pudiera dar lugar a mejores resultados en la estimación de la recuperación.

#### 5.3.4. ESTIMACIÓN DE LA RECUPERACIÓN.

Con el fin de comparar los modelos MR1 y MR2, las regresiones utilizadas emplean sólo cuatro variables en ambos casos. A pesar de ello, los valores de los coeficientes obtenidos para los parámetros empleados no son comparables: dada la interrelación entre ellos, su contribución en una regresión múltiple depende muy marcadamente de los que hayan sido previamente introducidos, por lo que los resultados de las tablas 3 y 6 son difíciles de interpretar.

Sin embargo, es fácil deducir de los residuos de las tablas 4 y 7, y de las figuras 1 y 2, que ambos modelos son muy similares: aunque los valores de los residuos son distintos, su signo y magnitud relativa son comparables en muchos de los compuestos.

También es comparable la calidad de los ajustes obtenidos, que figura en la tabla 9. El modelo MR2 es algo superior al MR1 cuando se utiliza como medida de esta calidad el error medio, pero ligeramente inferior cuando se emplean el coeficiente de correlación o el valor RMS. Aunque esta similitud podría explicarse porque ambos modelos están basados en una expresión común, cabría esperar unos mejores valores de ajuste con los datos de recuperación para el modelo MR2, en el que dicha expresión se ha tratado de ajustar al comportamiento experimental de la recuperación.



El hecho de que no sea así parece ser debido al cambio de variable necesario para convertir una relación no lineal en una lineal, que al invertirse en el cálculo de las recuperaciones da lugar a que la solución obtenida no sea óptima desde el criterio de mínimos cuadrados para los datos experimentales. Este hecho explicaría el comportamiento observado en la figura 2, donde se observa para los valores de muy baja recuperación una estimación mucho mejor que para los restantes, que así contribuyen en una mayor proporción que los primeros al criterio de mínimos cuadrados.

Hay que señalar sin embargo que los valores obtenidos, de alrededor de un 6% para el error medio y de un 10% para el error RMS en la predicción de la recuperación, son prometedores desde un punto de vista teórico e interesantes desde un punto de vista práctico, ya que la recuperación que se estima a partir de parámetros cualitativos solo podría conocerse con una exactitud comparable disponiendo del patrón y llevando a cabo medidas laboriosas.

Mientras que el modelo MR2 no ha dado lugar a las ventajas previstas de su carácter no lineal, no se puede decir lo mismo del modelo MR3 basado en redes neuronales. La calidad del ajuste obtenido es muy superior a los de MR1 y MR2, siendo inferior al 3% el error medio y ligeramente superior a este valor el error RMS, valores que en ciertos casos pueden ser incluso inferiores al error experimental. La figura 3 expresa gráficamente estos resultados, pudiendo observarse la ventajosa comparación a lo largo de toda la escala de valores con las figuras 1 (MR1) y 2 (MR2).

El modelo de redes neuronales MR3 es por tanto el más prometedor desde un punto de vista práctico, tanto por los resultados presentados como por el margen de mejora que proporciona el hecho de haber utilizado sólo tres de los posibles parámetros cualitativos. Sin embargo, los problemas de sobredimensión de los modelos de redes neuronales indican que antes de su aplicación a casos prácticos este modelo debería validarse mediante su aplicación a un número más elevado de muestras.

#### 5.4. CONCLUSIONES.

La relación entre la recuperación de un compuesto en SPME y los parámetros cualitativos que caracterizan su estructura puede expresarse según varios tipos de modelos.

El modelo lineal múltiple tiene la ventaja de la fácil interpretación de sus resultados, que concuerdan con el conocimiento actual del mecanismo del fraccionamiento por SPME. Es de notar que en los ajustes cuyos resultados se presentan, obtenidos a partir de cuatro parámetros, dos de ellos son medidas de retención cromatográfica, que responden a un mecanismo similar al citado, y sólo dos a parámetros directamente relacionados con la estructura molecular, debiendo incrementarse este número para conseguir mejores ajustes.

El modelo no lineal, a pesar de ser más recomendable desde un punto de vista teórico, no da lugar a una mejora en la calidad de la estimación, por lo que sería de interés la prueba de modelos basados en otras fórmulas compatibles con el comportamiento de la recuperación.

El modelo de redes neuronales es el más recomendable por sus resultados prácticos y su flexibilidad, aunque dada la dificultad de asignar un significado físico a sus resultados su indispensable validación requiere el empleo de un número más elevado de valores de recuperación obtenidos para otros compuestos.

## CAPÍTULO 6

### CARACTERIZACIÓN DE MIELES UNIFLORALES ESPAÑOLAS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE SUS COMPUESTOS VOLÁTILES POR SPME-GC-MS.

#### 6.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado anteriormente en esta memoria, la caracterización de las mieles uniflorales tiene una gran importancia tanto por la repercusión económica de la certificación del origen como por su empleo en el control de la calidad. Los compuestos volátiles de la miel presentan un interés doble en relación con estos objetivos. En primer lugar, dependen fundamentalmente de las flores o plantas de las que procede la miel (Maga, 1983; Bouseta *et al.*, 1992;), por lo que su presencia debe ser relevante en la clasificación de las mieles según su origen botánico. Por otro lado, los compuestos responsables del aroma de la miel se encuentran entre sus componentes volátiles, por lo que de éstos depende también la aceptación de una miel por parte del consumidor.

Los estudios de la composición volátil de la miel se han llevado a cabo normalmente por GC-MS, lo que requiere un paso previo de fraccionamiento y/o enriquecimiento. La microextracción en fase sólida ha mostrado ser un método muy adecuado para el fraccionamiento de los compuestos volátiles (Guidotti *et al.*, 1998; Soria *et al.*, 2003), y se ha utilizado para el control de calidad de mieles (Piasenzotto *et al.*, 2003), la clasificación de mieles (Pérez *et al.*, 2002; Soria *et al.*, 2004), la cuantificación de componentes responsables del aroma (Zhou *et al.*, 2002) y para establecer la proporción de mielato en mieles de mezcla (Soria *et al.*, 2005).

En la mayoría de los casos la caracterización de las mieles mediante la determinación de compuestos individuales no es de utilidad, ya que la mayoría de los compuestos volátiles están presentes, en mayor o menor concentración, en distintas mieles. Este hecho, junto con la variabilidad que presentan las mieles de un mismo origen, hace muy difícil establecer unos rangos de concentración válidos para determinar un origen floral. Para este tipo de muestras, la evaluación de grupos de parámetros mediante el uso de técnicas

estadísticas multivariantes aporta una mayor fiabilidad a la determinación (Soria *et al.*, 2003).

Los datos cuantitativos obtenidos mediante el fraccionamiento por SPME y análisis por GC-MS, han sido usados por distintos autores para la clasificación de mieles uniflorales mediante análisis multivariante. En un estudio llevado a cabo por Ampuero (Ampuero *et al.*, 2004) la composición volátil de 167 mieles uniflorales de acacia, castaño, diente de león, tilo, colza y abeto, la aplicación del análisis de componentes principales y análisis discriminante permitieron la clasificación correcta del 98% de las muestras estudiadas.

La determinación de los compuestos volátiles de 20 mieles de azahar, eucalipto, romero, espliego y tomillo por SPME-GC-MS fue utilizada por Pérez *et al.* (Pérez *et al.*, 2002) para establecer los compuestos más característicos de las mieles de estos orígenes, mediante la aplicación del análisis discriminante canónico y análisis discriminante por pasos a los datos de concentración obtenidos para cada compuesto.

Soria *et al.*, aplicó el análisis “Cluster” a los datos de varias mieles de néctar y mielatos, para determinar las variables más características de cada tipo de muestras. Además, los resultados obtenidos permitieron establecer una estimación del porcentaje de cada uno de estos tipos de miel en mieles de mezcla (Soria *et al.*, 2004, 2005).

Este trabajo está encuadrado en el subproyecto “Determinación de compuestos volátiles” del proyecto “Caracterización de mieles uniflorales españolas”. En él se ha llevado a cabo la caracterización de la composición volátil de 104 mieles artesanales de los orígenes más habituales en España: azahar (*Citrus sp.*), romero (*Rosmarinus officinalis*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*, principalmente *E. globulus* y *E. camaldulensis*) y brezo (géneros *Erica* y *Calluna*), mediante su fraccionamiento por SPME y su posterior determinación por GC-MS.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a técnicas estadísticas multivariantes con el fin de encontrar los compuestos volátiles más relacionados con cada origen y evaluar la utilidad de estos compuestos para la clasificación de las mieles estudiadas.

Las dos principales dificultades de la aplicación de métodos estadísticos sobre este tipo de muestras son la ausencia de muestras de referencia, y la probable presencia de muestras de orígenes mezclados. Para minimizar este problema se propuso un método de análisis

estadístico en dos etapas; en la primera etapa se utilizó el análisis discriminante por pasos para seleccionar como “muestras de referencia” aquellas que presentaran una mayor o una menor probabilidad de pertenecer al origen considerado. El valor de la probabilidad asociada al resultado del análisis discriminante se tomó como estimación de la proporción en la muestra del tipo de miel, y se utilizó como variable dependiente, en lugar de la asignación o no a un grupo, en el tratamiento mediante regresión múltiple de las mieles seleccionadas. Este procedimiento permitió una identificación más fiable de los compuestos más relacionados con cada origen, y, suponiendo la existencia habitual de mieles de mezcla, proporcionó para cada muestra una estimación del “contenido” en ella de miel de un determinado origen.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.2.1. MUESTRAS**

Se recogieron 104 mieles de distintas zonas geográficas españolas, de los 4 orígenes seleccionados: 21 muestras de eucalipto (*Eucalyptus sp.*), 35 de romero (*Rosmarinus sp.*), 33 de brezo (*Calluna vulgaris* y *Erica arborea*) y 15 muestras de azahar (*Citrus sp.*).

### **6.2.2. FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR SPME**

La extracción de compuestos volátiles se llevó a cabo siguiendo el método puesto a punto por Soria *et al* (Soria *et al.*, 2003) y descrito en el Capítulo 4, apartado 4.2.2.2.

### **6.2.3. ANÁLISIS GC-MS**

Las condiciones del análisis llevado a cabo en un Cromatógrafo de Gases (Agilent 6890) acoplado a un espectrómetro de masas con detector de cuadrupolo (Agilent 5973), se detallan en el Capítulo 4, apartado 4.2.3.

#### 6.2.4. CLASIFICACIÓN DE MIELES SEGÚN SU ORIGEN FLORAL

Para los cálculos multivariantes y de correlación se empleó el paquete de programas BMDP en su versión BMDPDYN para PC. Los coeficientes de correlación se obtuvieron como salida intermedia del programa 4M de análisis factorial. Para el análisis discriminante por pasos se empleó el programa 7M, mientras que para la regresión lineal múltiple se utilizó el programa 2R.

Todos los cálculos fueron también llevados a cabo empleando los subprogramas de Regresión lineal múltiple por pasos y Análisis discriminante por pasos del programa STATISTICA (STATSOFT, versión 7.1).

### 6.3. RESULTADOS

#### 6.3.1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE MIELES DE AZAHAR, BREZO, ROMERO Y EUCALIPTO.

El fraccionamiento por SPME y el análisis por GC-MS dieron lugar a perfiles de volátiles muy complejos, de los que se identificaron un total de 78 compuestos y se caracterizaron otros 5 (n.i.) a partir de los principales fragmentos de sus espectros de masas ( $m/z$ ) y sus datos de retención ( $IR$ ). La tabla 1 muestra los compuestos identificados y los 5 no identificados (n.i.), junto con sus datos de retención, expresados como tiempos de retención ( $t_R$ ) y como índices lineales de retención o ( $IR$ ).

**Tabla 1.** Compuestos volátiles identificados en las mieles estudiadas.

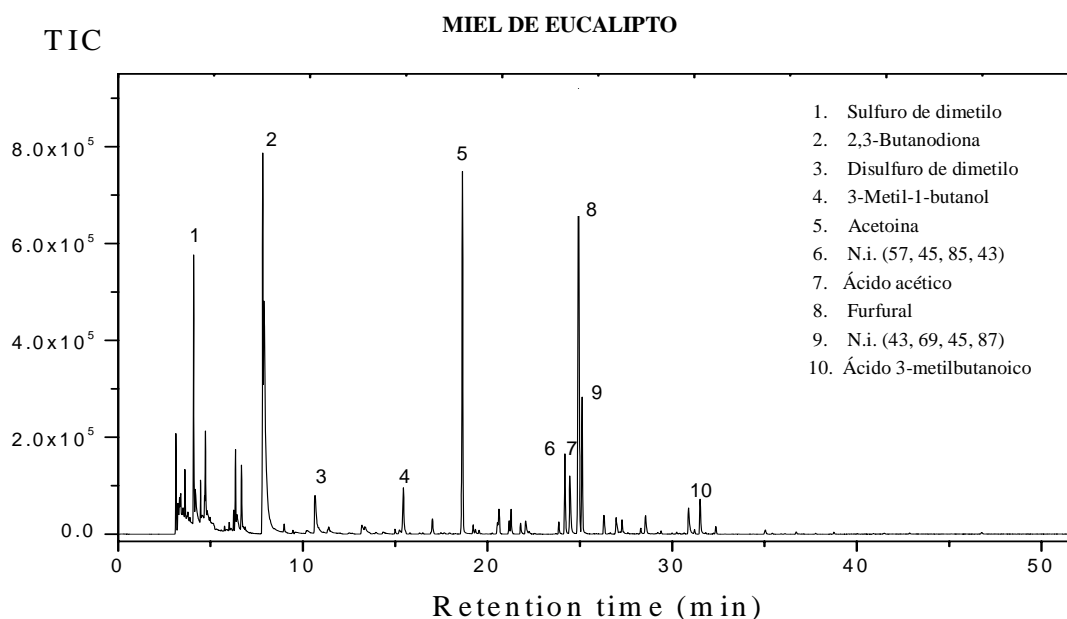
COMPUESTOS	$t_R$	IR
Sulfuro de dimetilo	4.18	
Etanol	6.71	928
2,3-Butanodiona	7.8	971
Acetonitrilo	8.6	1002
Tolueno	9.29	1026
2,3-Pentanodiona	10.14	1055
Disulfuro de dimetilo	10.65	1072

COMPUESTOS	t <sub>R</sub>	IR
2-Metil-2-butenal	11.26	1093
β-Pineno	11.48	1101
Etilbenceno	12.06	1116
3-Metilbutanonitrilo	12.41	1125
3-hexen-2-ona	12.53	1128
Hexanal	13.51	1154
Limoneno	14.01	1167
3-Metil-butan-1-ol	15.71	1212
3-Metil-3-buten-1-ol	17.31	1256
Estireno	16.68	1239
Acetoina	19.49	1317
2-Metil-2-buten-1-ol	19.53	1318
3-Metil-2-buten-1-ol	19.53	1318
1-Hidroxi-2-propanona	20.35	1340
1-Hexanol	20.56	1346
3-Hidroxi-2-pentanona	20.68	1349
Etilbenceno	20.84	1354
n.i. m/z (45,57,59,102)	21.2	1363
Nonanal	21.53	1372
1-Hidroxi-2-butanona	21.82	1380
Trisulfuro de dimetilo	21.51	1372
3-Hexen-1-ol (Z)	22.09	1388
Ciclohexanol	22.87	1410
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	23.78	1436
1-Heptanol	24.23	1449
n.i. m/z (57, 45, 85, 43)	24.25	1449
Ácido acético	24.55	1458
Furfural	24.86	1467
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	24.65	1461
n.i. m/z (43, 69, 45, 87)	25.14	1475
1-(2-Furanyl)-etanona	26.15	1504
Alcanfor	26.58	1517
Benzaldehido	26.78	1524
2,3-Butanodiol ( <i>threo</i> )	27.07	1532
Linalol	27.14	1535
Aldehido de lila (I)	27.21	1537
Ácido propanoico	27.39	1542
Aldehido de lila (II)	27.69	1551
Aldehido de lila (III)	27.98	1560
2,3-Butanediol ( <i>erythro</i> )	28.2	1567
Ácido 2-metilpropanoico	28.27	1569
Aldehido de lila (IV)	28.78	1585
Isoforona	29.05	1593

COMPUESTOS	t <sub>R</sub>	IR
Hotrienol	29.16	1596
n.i. <i>m/z</i> (94,79,67)	29.82	1618
n.i. <i>m/z</i> (94,79,67)	29.92	1621
Ácido butanoico	30.21	1631
Dihidro-2(3H)-furanona	30.62	1644
1-Nonanol	30.71	1647
Fenilacetaldehido	30.74	1648
2-Furanmetanol	31.07	1659
Benzoato de etilo	31.02	1657
2-Hidroxi-3,5,5-trimetilciclohexanona	30.97	1656
Ácido 3-metilbutanoico	31.4	1670
α-Terpineol	32.09	1693
4-Oxoisoforona	32.11	1693
2,6,6-Trimetil-2,4-cicloheptadien-1-ona	33.16	1730
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	33.66	1747
Acetato de etilbenzeno	34.6	1780
Mirtenol	34.77	1786
β-Damascenona	35.82	1823
Ácido hexanoico	36.63	1852
Alcohol benílico	37.57	1885
2,6-Bis(1,1-dimetil)-4-metilfenol	38.38	1914
2-feniletanol	38.46	1917
Benzenacetonitrilo	39.29	1946
1-Dodecanol	39.77	1963
Fenol	41.42	2017
Ácido octanoico	42.48	2047
Ácido nonanoico	46.14	2153
2-Metil-5-(1-metiletil)fenol	47.32	2189
Antranilato de metilo	50.68	2247
Ácido decanoico	51.21	2256
Trimetilfenol	56.94	2347
Ácido benzoico	62.64	2425
5-Hidroximetilfurfural	67.98	2482

Las figuras 1,2,3 y 4 representan perfiles típicos de la composición volátil de mieles de eucalipto, romero, brezo y azahar, respectivamente.



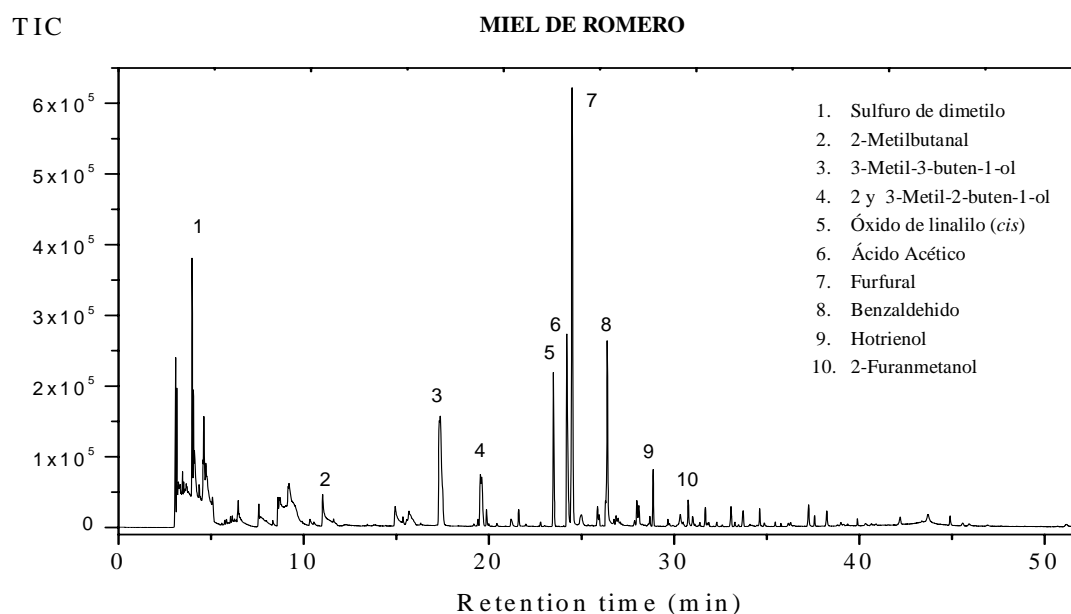


**Figura 1.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de eucalipto.

De la figura 1 destacan las elevadas proporciones relativas de 2,3-butanodiona (2) y acetoina (5). Ambos compuestos se han sugerido como posibles marcadores de las mieles de eucalipto (Bouseta *et al.* 1992; Graddon *et al.*, 1979; Radovic *et al.*, 2001). Sin embargo, la proporción de estos compuestos es muy variable en las distintas muestras de eucalipto, así como en las muestras de otros orígenes, y no es posible una clasificación fiable de las mieles de eucalipto basándonos únicamente en estos compuestos.

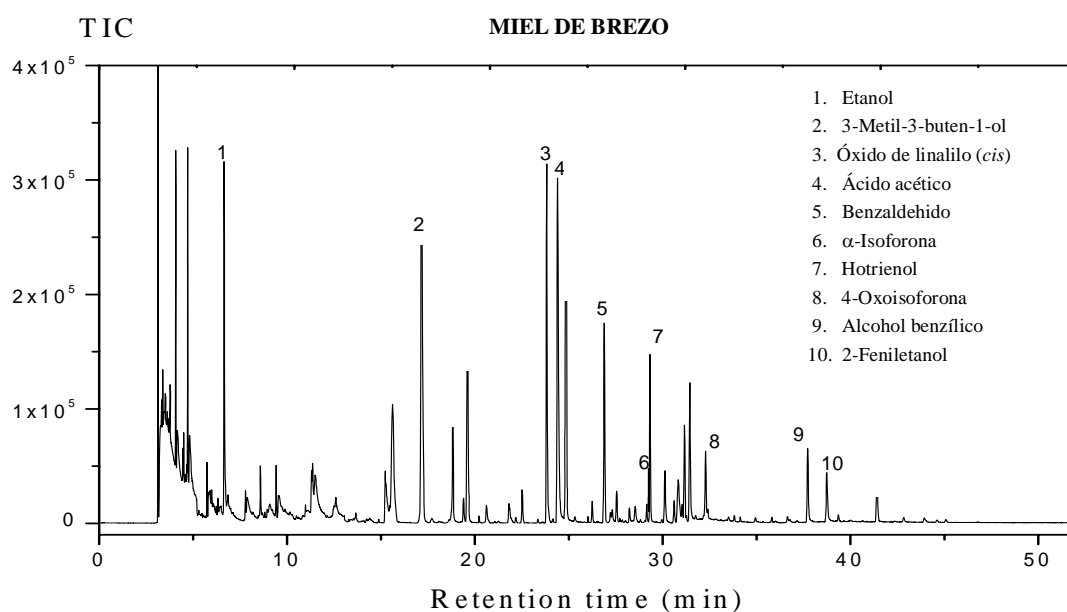
A pesar de que el furfural (8) aparece también como uno de los picos mayoritarios de la miel representada en la figura 1, su presencia en concentraciones elevadas fue común a la mayoría de las muestras estudiadas. Además, este compuesto parece estar más relacionado con ciertas condiciones del procesado, como el calentamiento, que con el origen de la miel, por lo que no se tuvo en cuenta en la posterior cuantificación.

La presencia de dos compuestos no identificados hasta el momento (6 y 9) en todas las muestras de eucalipto despertó un gran interés debido a su ausencia en las muestras de miel de los restantes orígenes, por lo que se estudiaron de forma específica, como se describe en el capítulo 9 de la presente Memoria, con el fin de identificarlos y evaluar su utilidad como marcadores de este origen floral.



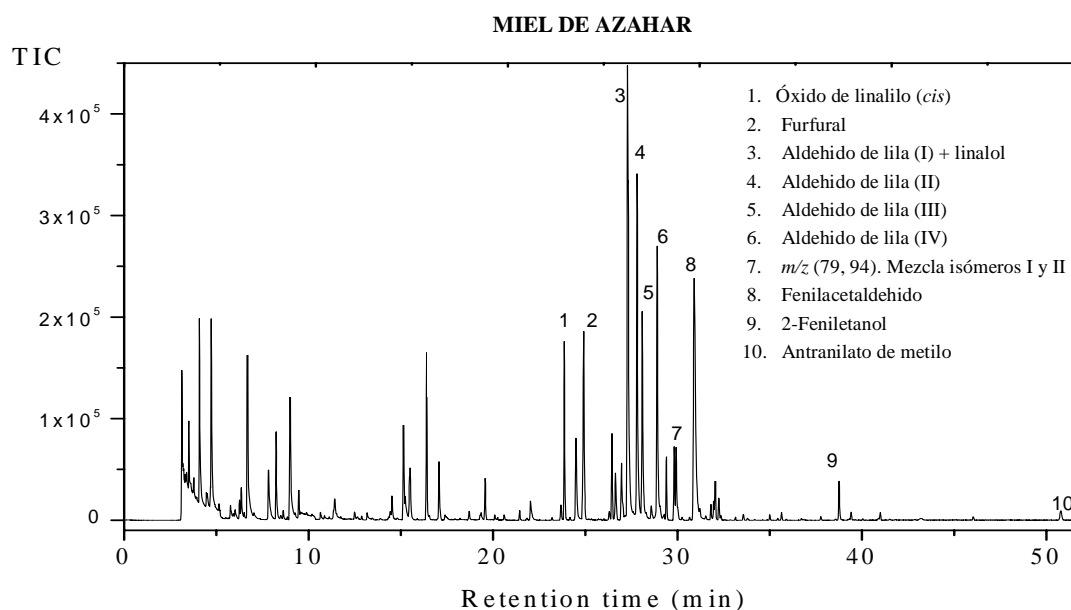
**Figura 2.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de romero.

Los perfiles de volátiles de las mieles de romero presentaron una gran variabilidad. Además del furfural (7), la figura 2 muestra elevadas proporciones de 3-metil-3-buten-1-ol (3), óxido de linalilo (*cis*) (5), ácido acético (6) o benzaldehido (8), pero es necesario el análisis estadístico multivariante de sus datos cuantitativos para evaluar la relevancia de estos compuestos en relación con las mieles de este origen.



**Figura 3.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de brezo.

Aunque etanol, 3-metil-3-buten-1-ol, óxido de linalilo (*cis*) y ácido acético aparecen como los compuestos mayoritarios en la figura 3, podrían destacarse otros compuestos, como  $\alpha$ -isoforona (6) o 4-oxoisoforona (8), que han sido citados como característicos de mieles de brezo (Guyot *et al.*, 1999) o de la familia de las ericáceas (Bianchi *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de azahar.

Como vemos en la figura 4, las mieles de azahar presentaron los perfiles más característicos, debido fundamentalmente a la presencia de los aldehidos de lila (3-6). Estos compuestos, considerados como derivados de linalol, han sido identificados en trabajos previos en las flores de cítricos y en las mieles de azahar (Alissandrakis *et al.*, 2003). El antranilato de metilo (10), considerado como marcador de estas mieles (Ferrerres *et al.*, 1994), aparece en concentraciones bajas con respecto al total de volátiles, probablemente debido a una baja recuperación de este compuesto en la fibra elegida para el fraccionamiento.

### 6.3.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Se calcularon para 33 compuestos de los listados en la tabla 1, seleccionados por su mayor concentración en las mieles estudiadas, las proporciones relativas frente al total de compuestos volátiles a partir de la señal de corriente total de iones (TIC). No se consideraron para este cálculo los compuestos presentes en menores concentraciones ni los de procedencia dudosa, como el furfural, 5-metilfurfural, ácido acético y etanol, posiblemente más relacionados con otros factores que con el origen floral.

El 2-metil-2-buten-1-ol y el 3-metil-2-buten-1-ol figuran en la tabla como un solo compuesto ya que, debido a la similitud de su retención y de sus espectros de masas, sus señales no pudieron integrarse por separado: la concentración de la tabla corresponde a la suma de ambos.

En la cuantificación se incluyeron 2 compuestos no identificados detectados en las mieles de eucalipto y caracterizados por sus índices de retención ( $IR_1=1449$  e  $IR_2=1475$ ) y por sus espectros de masas ( $m/z_1=[57, 45, 85, 43]$  y  $m/z_2=[43, 69, 45, 87]$ ), debido al interés de estos compuestos para la caracterización de las mieles de eucalipto y a su posible utilidad en un estudio posterior.

La tabla 2 muestra los valores de concentración media y desviaciones típicas de los 33 compuestos en los 4 tipos de miel considerados. Los resultados obtenidos para las 104 mieles estudiadas se detallan en el **anexo V** de la presente memoria.

La reproducibilidad o precisión del método fue similar a la mostrada por Soria (Soria *et al.*, 2003), con valores de desviación típica relativa (RSD) aproximada del 10% para la mayoría de los compuestos.

**Tabla 2.** Valores medios (media) y desviación estandar (S.D.) de los compuestos seleccionados en las mieles de eucalipto, romero, brezo y azahar.

COMPUESTOS	EUCALIPTO		ROMERO		BREZO		AZAHAR	
	MEDIA	S.D.	MEDIA	S.D.	MEDIA	S.D.	MEDIA	S.D.
2,3-Butanodiona	26.1	13.7	8.0	15.4	3.3	4.5	6.4	5.4
2,3-Pentanodiona	1.4	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metillbutanonitrilo	0.8	2.7	1.5	4.6	1.1	2.3	0.1	0.5
3-Metil-1-butanol	6.4	5.0	19.2	19.4	14.6	12.7	9.2	19.2
3-Metil-3-buten-1-ol	2.3	2.1	15.6	10.1	8.2	4.9	4.9	3.5
Acetoina	22.4	12.1	1.6	2.5	5.5	5.3	1.7	2.2
2 y 3-Metil-2-buten-1-ol	0.7	0.8	5.6	6.0	3.2	3.2	1.2	1.4
1-Hexanol	0.3	0.5	1.2	2.0	1.6	6.4	0.1	0.3
3-Hidroxi-2-pentanona	3.5	4.3	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	6.8	8.2	2.7	2.8	6.9	10.3	4.8	2.4
n.i. <i>m/z</i> (57, 45, 85, 43)	2.3	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	2.0	2.1	1.3	2.5	3.8	5.6	2.0	4.9
n.i. <i>m/z</i> (43, 69, 45, 87)	3.5	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-(2-Furanil)-etanona	0.6	0.6	1.7	1.4	1.9	5.8	1.2	1.7
Benzaldehido	5.0	4.5	13.4	11.3	10.4	6.5	5.6	3.5
2,3-Butanodiol ( <i>threo</i> )	0.3	0.7	0.4	2.4	2.7	4.3	0.0	0.0
Linalol	0.9	1.3	0.7	1.3	0.2	0.6	3.2	3.8
Aldehido de lila (I)	1.0	2.1	2.5	5.8	0.0	0.1	13.2	5.8
Aldehido de lila (II)	1.0	2.1	2.8	5.9	0.0	0.2	12.9	6.0
Aldehido de lila (III)	0.6	1.3	1.5	3.3	0.0	0.1	8.9	3.6
2,3-Butanediol ( <i>erythro</i> )	0.3	0.7	0.6	2.3	6.4	9.2	0.0	0.0
Aldehido de lila (IV)	1.1	3.0	2.0	4.4	0.2	1.1	10.8	4.8
$\alpha$ -Isoforona	0.6	0.8	1.3	2.2	4.1	5.5	0.4	0.9
Hotrienol	2.2	3.8	4.5	11.9	4.1	6.1	0.6	0.7
Benzeneacetaldehido	4.2	4.3	6.6	9.8	8.5	9.5	7.2	6.2
2-Furanmetanol	0.7	1.0	1.3	1.6	3.1	3.1	0.7	1.0
Benzoato de etilo	0.4	1.4	0.8	2.1	0.5	1.5	0.2	0.6
2-Hidroxi-3,5,5-trimetilciclohexanona	0.3	0.7	0.2	0.4	0.7	2.1	0.1	0.2
4-Oxoisoforona	1.1	0.8	1.3	1.9	2.8	3.0	1.2	2.6
Acetato de etilbenzeno	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.9	0.0	0.0
Alcohol benzílico	0.2	0.3	0.4	0.8	1.4	1.2	0.2	0.3
2-Feniletanol	0.8	1.1	1.1	1.2	3.9	5.4	1.4	1.2
Antranilato de metilo	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.2

Como se puede observar en la tabla, algunos compuestos presentaron un valor medio relativamente alto para un determinado tipo de miel. Sin embargo, esto no implica que esos compuestos sean los más relacionados con ese tipo de miel, ya que esta relación depende también de la distribución estadística de sus valores individuales.

Cada muestra queda caracterizada por 33 valores de concentración relativa correspondiente a los diferentes compuestos. Para relacionar la composición volátil de las distintas mieles con su origen botánico se llevó a cabo un tratamiento estadístico multivariante del conjunto de datos obtenido.

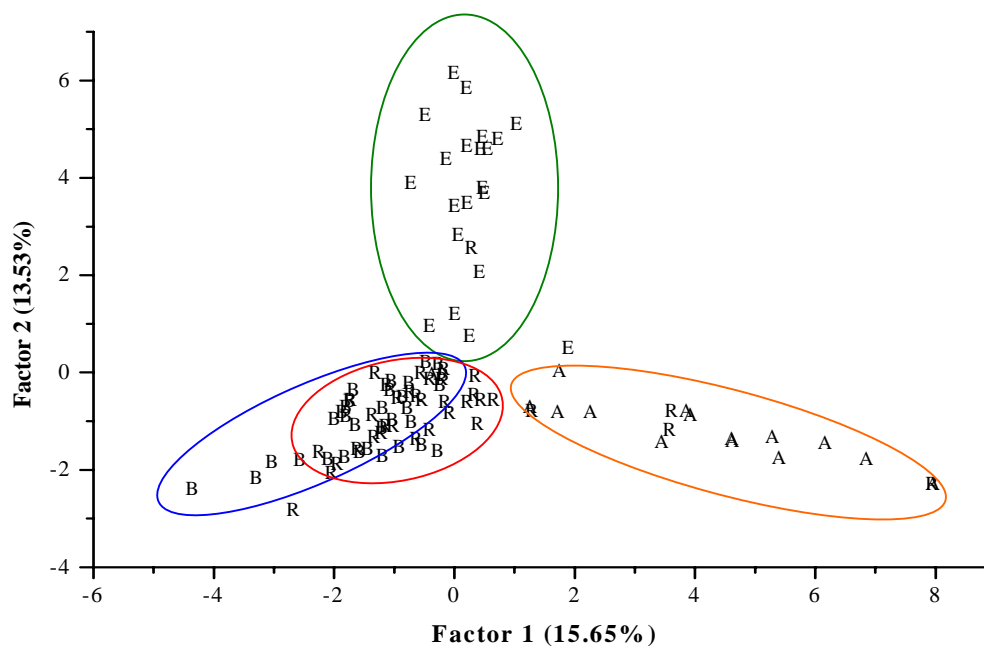
### 6.3.3. CLASIFICACIÓN DE MIELES SEGÚN SU ORIGEN: ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Para el procesado de los datos se elaboró a partir de la tabla 1 una matriz con 104 casos, correspondientes a las muestras estudiadas, y 33 variables, correspondientes a las concentraciones relativas de los compuestos cuantificados.

#### **6.3.3.1. Análisis de Componentes Principales.**

Se aplicó el Análisis de Componentes Principales con el fin de investigar la posible existencia de agrupaciones naturales entre las muestras. Tras factorizar la matriz de correlación se representó el primer componente principal (F1) frente al segundo (F2), como muestra la figura 5.

El primer componente principal explicó el 15.65% de la varianza, y está relacionado principalmente con los aldehidos de lila y el linalol. Al segundo componente principal contribuyeron especialmente los compuestos acetoina, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, 3-hidroxi-2-pentanona y los dos isómeros desconocidos encontrados en las mieles de eucalipto (I.R.=1449 y  $m/z$  [57, 45, 85, 43]) y n.i.2 (I.R.=1475 y  $m/z$  [43, 69, 45, 87]).



**Figura 5.** Representación de los componentes principales F1 y F2 de las 104 mieles analizadas de eucalipto (E), romero (R), brezo (B) y azahar (A).

El gráfico (figura 5) muestra varias tendencias en la composición de las muestras. La mayoría de mieles de eucalipto se caracterizan por elevados valores positivos del segundo componente, mientras que las mieles de azahar forman un grupo a la derecha del gráfico al presentar los mayores valores del primer componente (valores positivos mayores que 1). El gráfico refleja, por tanto, las concentraciones relativamente altas de cetonas y cetoalcoholes en las mieles de eucalipto, así como la presencia de aldehídos de lila y linalol en las muestras de azahar. Las mieles de brezo y romero presentaron valores bajos de ambos componentes, y similares en los dos tipos de miel, por lo que aparecen solapados en el gráfico.

Los componentes tercero, cuarto y quinto explicaron el 7.5% y 6.6% y 5.3% de la varianza respectivamente, lo que suma solo un 49% de la varianza con los 5 primeros componentes. Este dato refleja la elevada dispersión existente en la composición de las muestras.

### 6.3.3.2. Regresión Lineal Múltiple.

Con el fin de estudiar tanto la correlación individual de las variables con cada tipo de miel como los grupos de variables que puedan permitir una mejor clasificación de los distintos orígenes, se aplicó la regresión lineal múltiple para cada tipo de miel, considerando que la variable dependiente toma valor 1 para las muestras del origen considerado y valor 0 para el resto de los orígenes. Las variables que presentaron las correlaciones más elevadas con cada origen se resumen en la tabla 3.

Como podía deducirse del análisis de componentes principales, las variables más correlacionadas con la miel de eucalipto fueron las concentraciones de la acetoina, de los dos compuestos no identificados con n.i.1 (I.R.=1449 y  $m/z$  [45, 57, 59, ] y n.i.2 (I.R.=1475 y  $m/z$  [43, 69, 45, 87]), de la 3-hidroxi-2-pentanona y de la 2,3-butanodiona. Los cinco compuestos presentaron elevadas correlaciones (0.588-0.824) con este origen. Por su parte, los aldehidos de lila aparecieron como los compuestos más correlacionados con las mieles de azahar, con coeficientes de correlación entre  $r=0.683$  y  $r=0.745$ .

Las concentraciones de los componentes de las mieles de romero y brezo no presentaron correlaciones tan elevadas. Las mieles de romero mostraron valores máximos de  $r=0.460$  y  $r=0.319$ , para los compuestos 3-metil-3-buten-1-ol, y la suma de 2- y 3-metil-2-buten-1-ol respectivamente, mientras que en las mieles de brezo destacaron las correlaciones obtenidas para los alcohol bencílico y furfúrico (2-furanmetanol), así como para los dos isómeros del 2,3-butanodiol, todas ellas comprendidas entre  $r=0.394$  y  $r=0.515$ .

**Tabla 3.** Principales coeficientes de correlación ( $r$ ) obtenidos para los 4 orígenes estudiados.

EUCALIPTO		ROMERO	
Variable	r	Variable	r
Acetoina	0.824	3-Metil-3-buten-1-ol	0.469
n.i. 1 $m/z$ (45,57,59,102)	0.755	2- y 3-Metil-2-buten-1-ol	0.319
n.i. 2 $m/z$ (43, 69, 45, 87)	0.723	Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	-0.280
3-Hidroxi-2-pentanona	0.598	Acetoina	-0.385
2,3-Butanodiona	0.588	Benzaldehido	0.215



BREZO		AZAHAR	
Variable	r	Variable	r
Alcohol bencílico	0.515	Aldehido de lila (III)	0.745
2-Furanmetanol	0.498	Aldehido de lila (IV)	0.702
2,3-Butanodiol ( <i>erythro</i> )	0.488	Aldehido de lila (I)	0.692
2,3-Butanodiol ( <i>threo</i> )	0.394	Aldehido de lila (II)	0.683
2-Feniletanol	0.379	Linalol	0.465

La regresión lineal por pasos añade de forma sucesiva a la regresión las variables que permiten una mejor estimación del origen de las muestras. La tabla 4 muestra los conjuntos de variables resultantes de este procedimiento, con los coeficientes de correlación múltiple (R) y los errores estándar de la estimación (s.e.) obtenidos al introducir cada una de ellas en la regresión lineal múltiple por pasos.

En las mieles de eucalipto, el primer parámetro empleado fue la concentración de acetoina, con un coeficiente de correlación elevado ( $R=0.824$ ) como ya se indicó en la tabla 3. Sin embargo, este coeficiente no mejora mucho al introducir las siguientes variables (2,3-butanodiona, “n.i. 1” y 2,3-pentanodiona), lo que indica una elevada correlación entre todas ellas. El conjunto de las 4 variables presentó un coeficiente de correlación múltiple de  $R=0.893$ , y un error estándar de la estimación de  $s.e.=0.185$ .

Un caso similar se produjo con las mieles de azahar, donde la concentración del aldehido de lila (II) mostró un coeficiente de correlación de  $R=0.745$ , y este coeficiente solo aumentó hasta  $R=0.813$  al introducir los aldehidos de lila (I) y (III) y el linalol.

En las mieles de romero, las variables seleccionadas fueron las concentraciones del 3-metil-3-buten-1-ol, del alcohol bencílico, de la acetoina y del óxido de linalilo (*cis*), con un coeficiente de correlación múltiple  $R=0.642$  y un error de la estimación  $s.e.=0.371$ .

El conjunto de las concentraciones de alcohol bencílico, *erythro*-2,3-butanodiol 2-furanmetanol y 4-oxoisoforona presentó un coeficiente de correlación múltiple de  $R=0.749$  para las mieles de brezo, con un error estándar de la estimación de  $s.e.=0.316$ .

Los coeficientes de correlación de las mieles de romero y brezo, más bajos que los obtenidos para los otros dos orígenes, son el resultado de una mayor dispersión en los datos cuantitativos de las mieles de estos orígenes.

**Tabla 4.** Resultados de la regresión múltiple por pasos para los 4 orígenes considerados: coeficientes de correlación múltiple (R) y error estándar de la estimación en los 4 primeros pasos.

EUCALIPTO			
Paso	Variable	R	s.e.
1	Acetoina	0.824	0.230
2	2,3-Butanodiona	0.848	0.216
3	n.i. 1 <i>m/z</i> (57, 45, 85, 43)	0.868	0.204
4	2,3-Pentanodiona	0.893	0.185

ROMERO			
Paso	Variable	R	s. e.
1	3-Metil-3-buten-1-ol	0.469	0.421
2	Alcohol benzílico	0.556	0.399
3	Acetoina	0.614	0.380
4	Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	0.642	0.371

BREZO			
Paso	Variable	R	s.e.
1	Alcohol benzílico	0.515	0.403
2	2,3-Butanediol ( <i>erythro</i> )	0.638	0.364
3	2-Furanmetanol	0.703	0.338
4	4-Oxoisoforona	0.749	0.316

AZAHAR			
Paso	Variable	R	s. e.
1	Aldehído de lila (III)	0.745	0.237
2	Aldehído de lila (I)	0.787	0.220
3	Linalol	0.798	0.216
4	Aldehído de lila (II)	0.813	0.209

### 6.3.3.3. Análisis discriminante por pasos

También se llevó a cabo el análisis discriminante por pasos para cada origen botánico considerando, al igual que en apartado anterior, dos grupos de muestras en cada caso (una correspondiente al origen considerado y otro con el resto de las muestras). Los valores individuales de F (tabla 5), que indican el peso de cada variable en la clasificación de las muestras entre los dos grupos, coinciden con los parámetros que presentaron una mayor correlación (*r*) en la regresión múltiple por pasos.

En el análisis discriminante por pasos, las variables que más contribuyen a una correcta clasificación de las muestras se van introduciendo de forma sucesiva. La tabla 6 muestra, para cada origen considerado, los grupos de variables obtenidos para los cuatro primeros pasos del análisis discriminante, junto con los porcentajes de muestras clasificadas correctamente.

**Tabla 5.** Compuestos individuales con mayor importancia en la discriminación del origen floral y valores de F obtenidos para esos compuestos

	VARIABLES	F
<b>EUCALIPTO</b>	Acetoina	215.2
	2,3-Butanodiona	129.3
	n.i. 1 <i>m/z</i> (45,57,59,102)	101.4
	2,3-Pentanodiona	97.3
<b>ROMERO</b>	3-Metil-3-buten-1-ol	28.8
	Alcohol bencílico	22.5
	Acetoina	20.1
	Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	17.4
<b>BREZO</b>	Alcohol bencílico	36.8
	2,3-Butanodiol ( <i>erythro</i> )	34.7
	2-Furanmetanol	32.6
	4-Oxoisoforona	31.6
<b>AZAHAR</b>	Aldehido de lila III	126.9
	Aldehido de lila I	82.3
	Linalol	58.5
	Aldehido de lila II	48.4

Puede observarse que los grupos obtenidos en la tabla 6 son los mismos que proporcionó la regresión lineal por pasos que se listan en la tabla 4. Ello se debe a que ambos métodos son equivalentes en la información que aportan acerca de las variables; pero se presentan sus resultados ya que el análisis discriminante proporciona como información adicional la probabilidad de clasificación de cada muestra en cada uno de los grupos previamente definidos, así como el porcentaje de muestras correctamente clasificadas que figura en la tabla.

**Tabla 6.** Grupos de variables seleccionadas en los 4 primeros pasos del análisis discriminante junto con los % de muestras (del origen considerado, de los restantes orígenes y totales) clasificadas correctamente.

	GRUPOS DE VARIABLES	% MUESTRAS CLASIFICADAS CORRECTAMENTE		
<b>EUCALIPTO</b>	Acetoina	81.0 % Muestras de eucalipto	100 % Otros orígenes	96.2 % Total de muestras
	2,3-Pentanodiona 2,3-Butanodiona n.i. 1 <i>m/z</i> (45,57,59,102)			
<b>ROMERO</b>	3-Metil-3-buten-1-ol	68.6% Muestras de romero	92.8% Otros orígenes	84.6 Total de muestras
	Alcohol bencílico			
	Acetoina			
	Aldehido de lila I			
<b>BREZO</b>	Alcohol bencílico	81.8% Muestras de brezo	98.6% Otros orígenes	93.3% Total de muestras
	2,3-Butanodiol (erythro)			
	2-Furanmetanol			
	4-Oxoisoforona			
<b>AZAHAR</b>	Aldehido de lila III	73.3% Muestras de azahar	98.9% Otros orígenes	95.2% Total de muestras
	Aldehido de lila I			
	Aldehido de lila II			
	Linalol			

Al dividir las muestras en “muestras de eucalipto” y “otros orígenes”, el grupo de variables obtenido consiguió clasificó como “eucalipto” el 81.0% de las muestras de eucalipto, mientras que el 100% de las muestras restantes fue correctamente incluido en el grupo de “otros orígenes”: en total, un 96.2% del total de las muestras fue clasificado correctamente. Cuando la división de los grupos vino definida por las muestras de romero, azahar y brezo los porcentajes de muestras correctamente clasificadas fueron de 84.6%, 93.3% y 95.2% respectivamente.

#### 6.3.3.4. Aplicación de Análisis discriminante seguido de regresión en la caracterización de compuestos relevantes de un tipo de miel

La fiabilidad de un proceso de predicción o de asignación depende de la correcta asignación del valor de la variable dependiente o de clasificación para cada muestra. En el

caso de las mieles este paso resulta imposible debido a la ausencia de muestras de referencia de mieles de cada origen, y a que es muy común la presencia de mieles de mezcla etiquetadas como mieles uniflorales. El análisis discriminante presenta problemas básicos en su empleo, ya que no se cumplen los requisitos exigidos por su teoría (existencia de un conjunto de muestras de asignación segura, ausencia de muestras mixtas, distribución normal de los valores). El análisis mediante regresión múltiple permite incluir en el modelo de predicción la posibilidad de muestras de asignación mixta, pero también requiere el disponer de muestras de referencia cuyos valores se puedan utilizar como variable dependiente, lo que también es imposible.

Para tratar de paliar en parte este problema, se ha recurrido a un enfoque en dos pasos, en el que se parte de reconocer la existencia tanto de mieles mal clasificadas como de mieles de origen mixto, bien por la procedencia del néctar o por la existencia de mezclados posteriores, y se trata de evitar la influencia de estas mieles en los resultados del tratamiento multivariante.

El primer paso utiliza la probabilidad de asignación a cada grupo de mieles para cada muestra obtenida mediante el análisis discriminante con cuatro pasos. Se seleccionaron las muestras que presentaron una probabilidad  $P > 0.999$  o  $P = 0$  de pertenecer a los grupos de eucalipto y azahar, y probabilidades  $P > 0.75$  y  $P > 0.55$  o  $P = 0$  para los grupos de brezo y romero respectivamente: los distintos niveles utilizados en la selección se deben a existir en el caso de brezo y romero un menor número de muestras con probabilidades elevadas de pertenecer a estos orígenes.

La probabilidad obtenida se utilizó como un estimador de la pureza de cada muestra. Así, muestras con probabilidad 0 o 1 de pertenecer a un grupo dado se consideraron como de un contenido del 0 y del 100% respectivamente de miel de ese grupo. Cuando, como en el caso de diversas muestras de brezo o romero, se encontraron valores de  $P$  de entre 0 y 1, se supuso que la muestra era mixta y contenía un  $100 * P$  % del tipo considerado.

Este estimador de la pureza de la muestra puede utilizarse como variable independiente en una regresión lineal múltiple, en la forma descrita en el apartado 6.3.3.2., pero utilizando sus valores en lugar de los de 0 y 1 empleados en dicho apartado.

La tabla 7 muestra las variables a las que corresponden los mayores coeficientes de correlación (r) obtenidos.

**Tabla 7.** Principales coeficientes de correlación (r) de las muestras seleccionadas

EUCALIPTO		ROMERO	
Variable	r	Variable	r
Acetoina	0.905	3-Metil-3-buten-1-ol	0.793
n.i. 1 m/z (45,57,59,102)	0.832	2- y 3-Metil-2-buten-1-ol	0.510
2,3-Butanodiona	0.831	Acetoina	-0.498
n.i. 2 m/z (43, 69, 45, 87)	0.785	Benzaldehido	0.376
3-Hidroxi-2-pentanona	0.632	Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	-0.376

BREZO		AZAHAR	
Variable	r	Variable	r
Alcohol bencílico	0.756	Aldehido de lila (III)	0.938
2-Furanmetanol	0.642	Aldehido de lila (IV)	0.906
2,3-Butanodiol ( <i>erythro</i> )	0.598	Aldehido de lila (II)	0.906
2-Feniletanol	0.462	Aldehido de lila (I)	0.906
4-Oxoisoforona	0.440	Linalol	0.640

Todos los coeficientes de correlación (tabla 7) aumentaron notablemente con respecto a los obtenidos en la primera regresión (tabla 3), siendo más fácil la comparación de la relevancia de los distintos compuestos en la composición de un determinado grupo de mieles y la interpretación de las diferencias que se obtienen entre los valores propios de distintos grupos.

En la tabla 8 figuran los resultados de la regresión múltiple por pasos para los 4 orígenes al considerar las mieles seleccionadas.

**Tabla 8.** Resultados de la regresión múltiple por pasos de las mieles seleccionadas: coeficientes de correlación múltiple (R) y error estándar de la estimación en los 4 primeros pasos para los 4 orígenes estudiados.

EUCALIPTO			
Paso	Variable	R	s.e.
1	Acetoina	0.905	0.151
2	2,3-Butanodiona	0.957	0.104
3	n.i. 1 <i>m/z</i> (57, 45, 85, 43)	0.971	0.087
4	2,3-Pentanodiona	0.986	0.061

ROMERO			
Paso	Variable	R	s. e.
1	3-Metil-3-buten-1-ol	0.793	0.1919
2	Alcohol benzílico	0.887	0.1464
3	Acetoina	0.924	0.1218
4	Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	0.948	0.1025

BREZO			
Paso	Variable	R	s.e.
1	Alcohol benzílico	0.756	0.258
2	2-Furanmetanol	0.842	0.214
3	2,3-Butanediol ( <i>erythro</i> )	0.896	0.177
4	4-Oxoisoforona	0.953	0.122

AZAHAR			
Paso	Variable	R	s. e.
1	Aldehido de lila (III)	0.938	0.101
2	Aldehido de lila (I)	0.956	0.085
3	Aldehido de lila (II)	0.976	0.064
4	Linalol	0.981	0.058

Los coeficientes de regresión múltiple obtenidos usando como variable dependiente la probabilidad de las muestras más representativas de cada origen presentaron una mejora muy importante con respecto a los considerados inicialmente, alcanzando coeficientes de regresión múltiple  $R > 0.98$  para las mieles de eucalipto y azahar y valores en torno a  $R = 0.95$  para las mieles de romero y brezo.

#### 6.4. CONCLUSIONES

El enfoque descrito en este apartado permite de acuerdo con estos resultados una selección más fiable de los compuestos relacionados con un determinado tipo de miel, con una valoración cuantitativa de su posible uso como marcadores, evitando en parte los problemas mencionados derivados de la aplicación directa del análisis discriminante. Por otro lado, proporciona para cada muestra una estimación del “porcentaje” de miel pura de un cierto tipo que contiene. Este valor sin embargo debe considerarse como simplemente orientativo y no debe utilizarse para una clasificación, teniendo en cuenta que en su cálculo se ha partido una preselección orientada de muestras.





---

## CAPÍTULO 7

### DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE MIELES DE ORIGEN POCO COMÚN

#### 7.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios llevados a cabo hasta el momento sobre la composición volátil de la miel se han centrado en las mieles de mayor producción, como son las mieles de eucalipto, brezo, lavanda, azahar, romero, tilo o diversos mielatos (Graddon *et al.*, 1979; Serra-Bonheví *et al.*, 1987; Pérez-Arquillué *et al.*, 1994; Bouseta *et al.*, 1996; Guyot *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2002; Alissandrakis *et al.*, 2003; Soria *et al.*, 2005). Sin embargo, la flora característica de algunas zonas geográficas da lugar a una pequeña proporción de otras mieles, algunas de las cuales se producen solo en unas regiones determinadas, cuya fracción volátil apenas ha sido estudiada. En España, un caso especial es el de las mieles procedentes de Canarias, donde la abundante flora endémica da lugar a mieles uniflorales únicas de esta región (Serra Bonvehí *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio detallado de la composición volátil de mieles de orígenes poco comunes producidas en España, como son las mieles de abeto, aguacate, ajedrea, albaida, almendro, encina, madroño, níspero, pitera y sauce; así como de algunas mieles específicas de Canarias, como las de retama, tajinaste o multiflorales canarias.

Aunque resultaría necesario el estudio de un gran número de muestras de cada origen para poder establecer de modo concluyente la composición de estos tipos de miel, los datos obtenidos para 26 muestras de 13 orígenes constituyen una primera aproximación a la caracterización de estas mieles, aportando información de gran interés para posteriores estudios.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1. MUESTRAS.

Se adquirieron, en varios establecimientos especializados, cinco muestras de miel de aguacate, dos de encina, dos de madroño, tres de níspero, dos de retama, tres de tajinaste, y una muestra de cada uno de los siguientes orígenes: abeto, ajedrea, albaida, almendro, pitera y sauce (tabla 1). Además se incluyeron tres mieles multiflorales canarias debido a que la flora local debe aportar néctares procedentes de diversos endemismos.

**Tabla 1.** Código (CÓD), origen geográfico nombre común, nombre botánico y familia de las mieles estudiadas.

Nº	CÓD.	ORIGEN	NOMBRE COMÚN	NOMBRE BOTÁNICO	FAMILIA
1	ABE	Desconocido	Abeto	Abies spp	Pinaceae
2	AG	Canarias	Aguacate	Persea americana	Lauraceae
3	AG	Canarias	Aguacate	Persea americana	Lauraceae
4	AG	Granada	Aguacate	Persea americana	Lauraceae
5	AG	Malaga	Aguacate	Persea americana	Lauraceae
6	AG	Malaga	Aguacate	Persea americana	Lauraceae
7	AJE	Granada	Ajedrea	Satureja montana	Lamiaceae
8	ALB	Lleida	Albaida	Anthyllis cytisoides	Fabaceae
9	ALM	Desconocido	Almendro	Prunus amygdalus	Rosaceae
10	ENC	Aragón	Encina	Quercus ilex	Fagaceae
11	ENC	La Alcarria	Encina	Quercus ilex	Fagaceae
12	MAD	Cordoba	Madroño	Arbutus unedo	Ericaceae
13	MAD	Madrid	Madroño	Arbutus unedo	Ericaceae
14	MF	Canarias	Multifloral (costa)		
15	MF	Canarias	Multifloral (costa)		
16	MF	Canarias	Multifloral (montaña)		
17	NIS	Granada	Níspero	Eriobotrya japonica	Rosaceae
18	NIS	Alicante	Níspero	Eriobotrya japonica	Rosaceae
19	NIS	Alicante	Níspero	Eriobotrya japonica	Rosaceae
20	PIT	Canarias	Pitera	Agave spp	Agavaceae
21	RET	Canarias	Retama	Spartocytisus supranubius	Fabaceae
22	RET	Canarias	Retama	Spartocytisus supranubius	Fabaceae
23	SAU	Alicante	Sauce	Salix spp	Salicaceae
24	TAJ	Canarias	Tajinaste	Echium wildpretii	Boraginaceae
25	TAJ	Canarias	Tajinaste	Echium wildpretii	Boraginaceae
26	TAJ	Canarias	Tajinaste	Echium wildpretii	Boraginaceae

### 7.2.2. FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS VOLÁTILES.

La técnica utilizada para el fraccionamiento de los compuestos volátiles de las muestras fue la microextracción en fase sólida (SPME), siguiéndose el procedimiento detallado en el capítulo 4, apartado 4.2.2.2

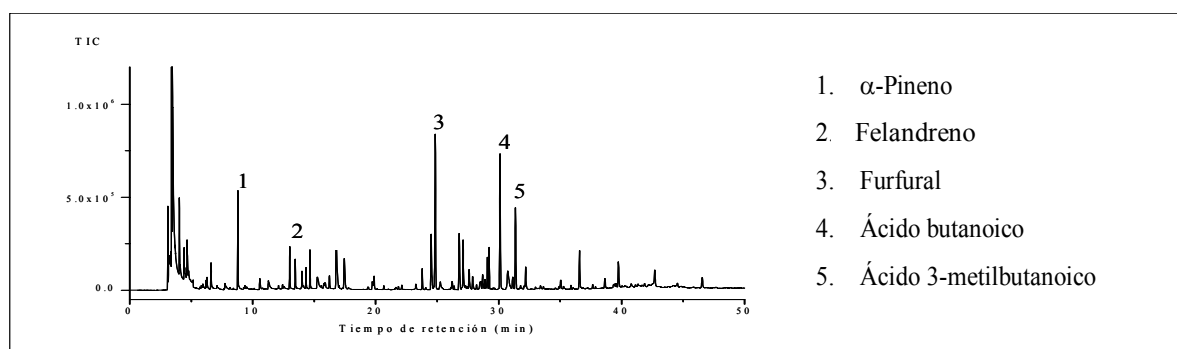
### 7.2.3. ANÁLISIS GC-MS.

Las condiciones cromatográficas, así como la metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo se detallan en el capítulo 4, apartado 4.2.3.

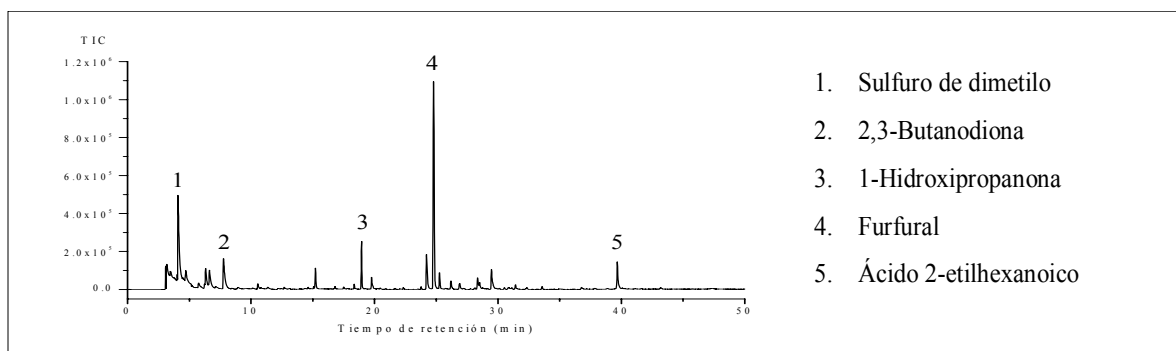
## 7.3. RESULTADOS

### 7.3.1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE MIELES DE ORIGEN POCO COMÚN.

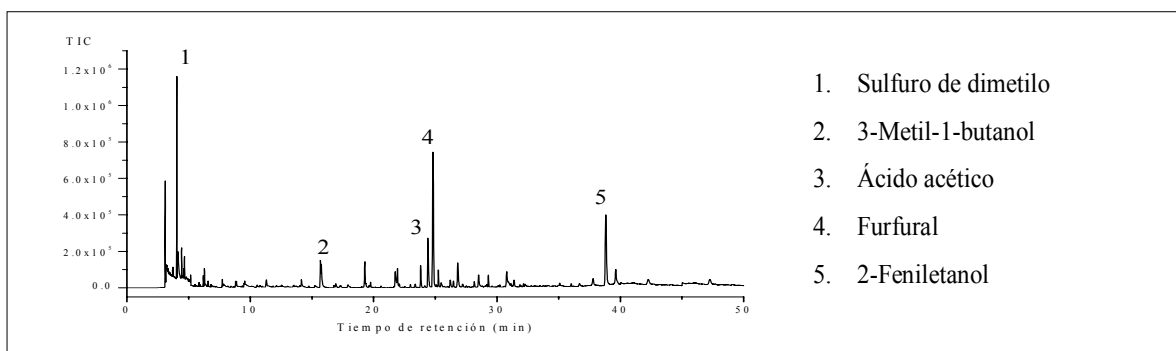
Las figuras 1-13 muestran los perfiles obtenidos en las mieles de cada origen, y destacan los compuestos mayoritarios presentes en cada muestra.



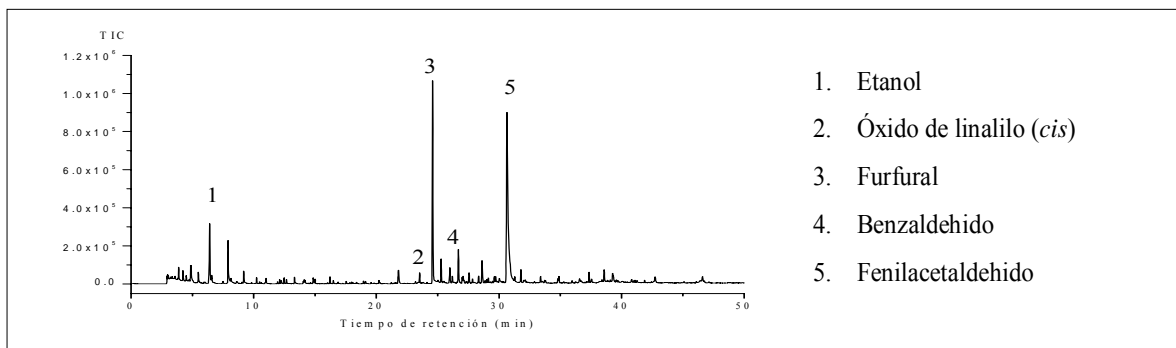
**Figura 1.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **ABETO**.



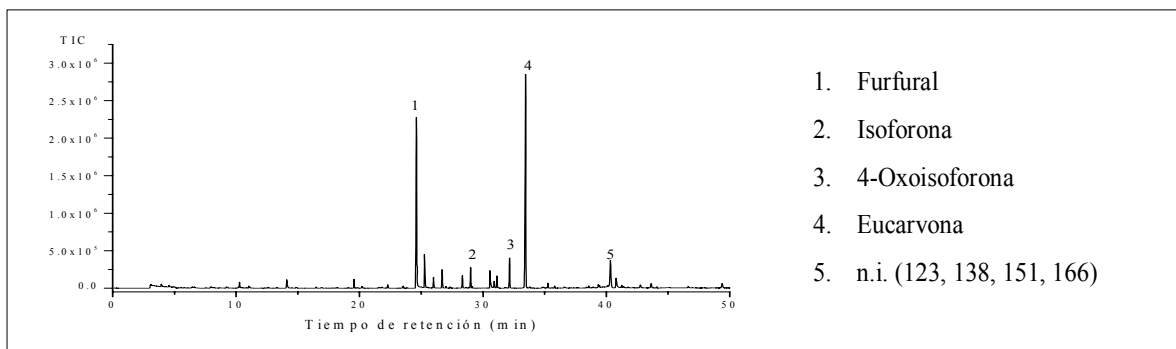
**Figura 2.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **AGUACATE**.



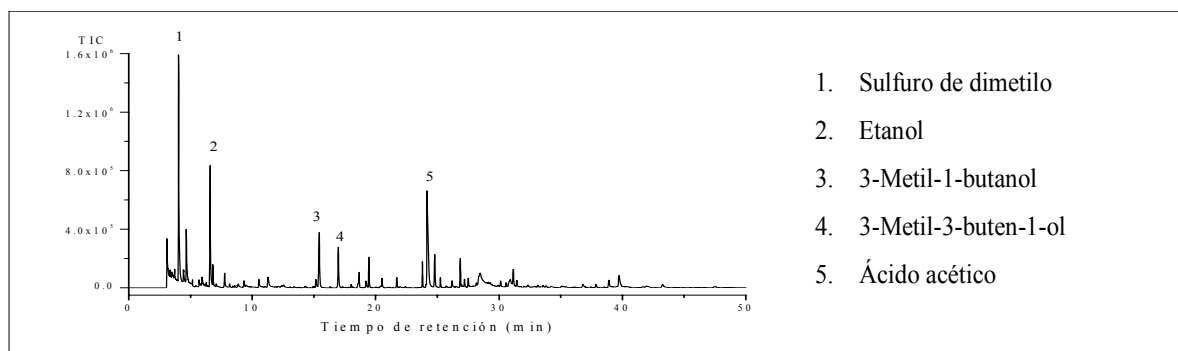
**Figura 3.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **AJEDREA**.



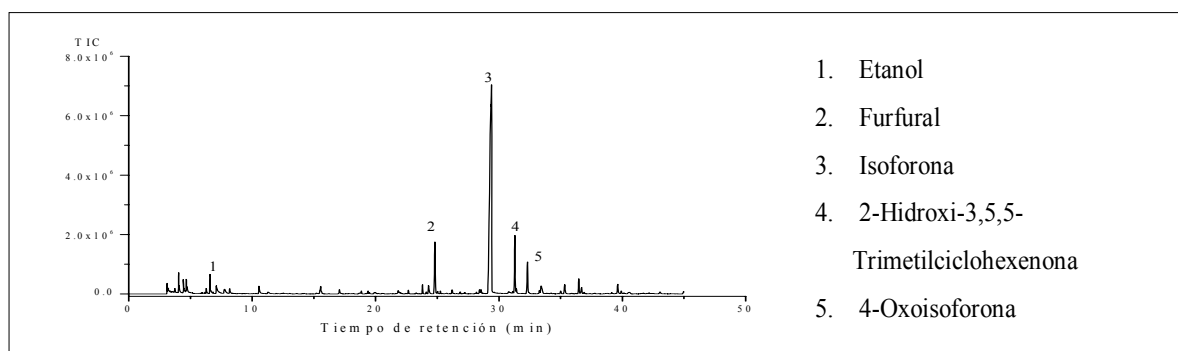
**Figura 4.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **ALBAIDA**.



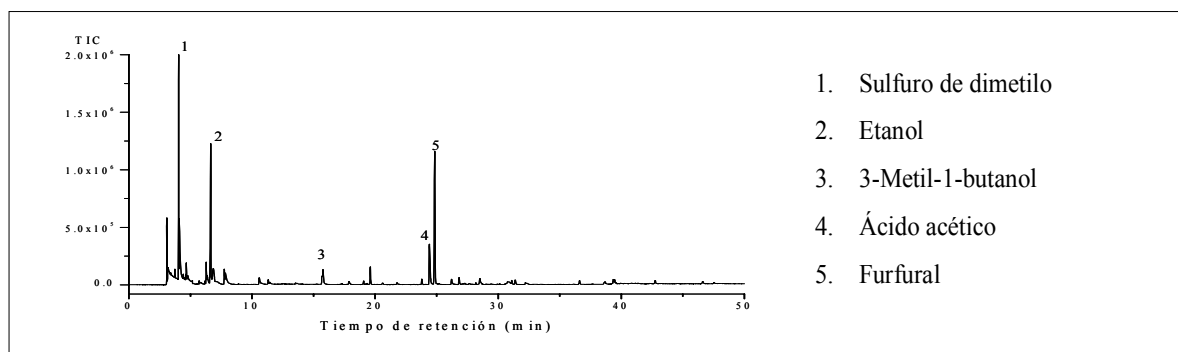
**Figura 5.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **ALMENDRO**.



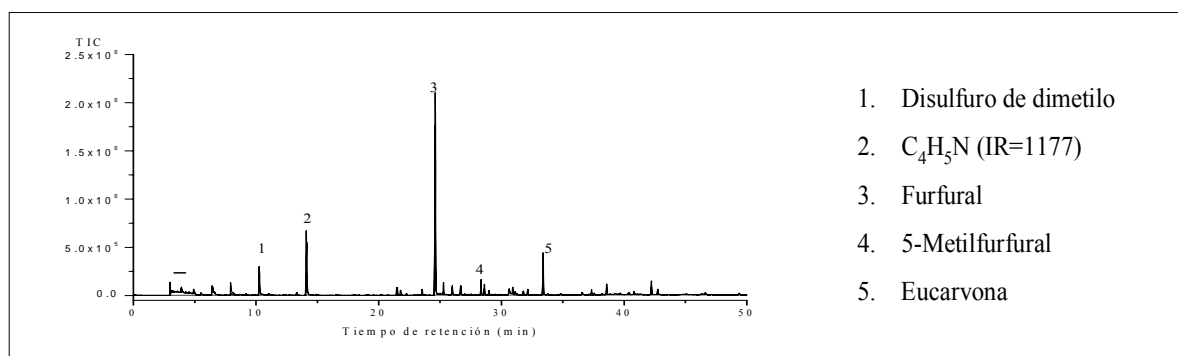
**Figura 6.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **ENCINA**.



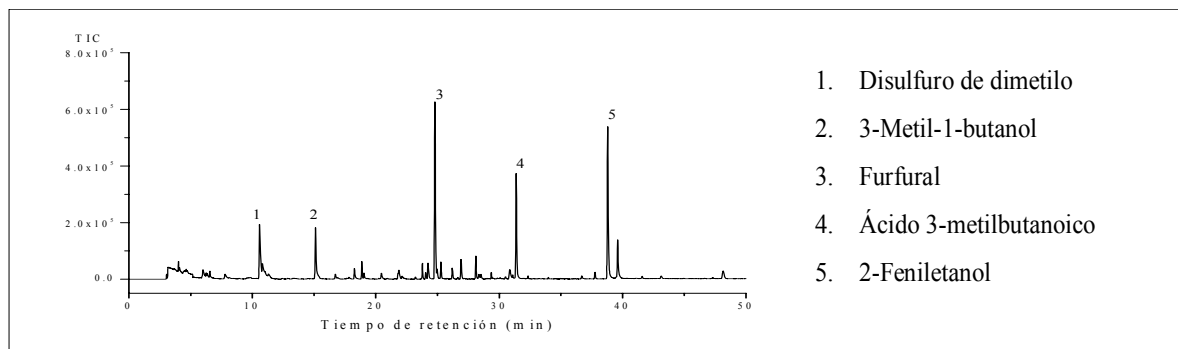
**Figura 7.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **MADROÑO**.



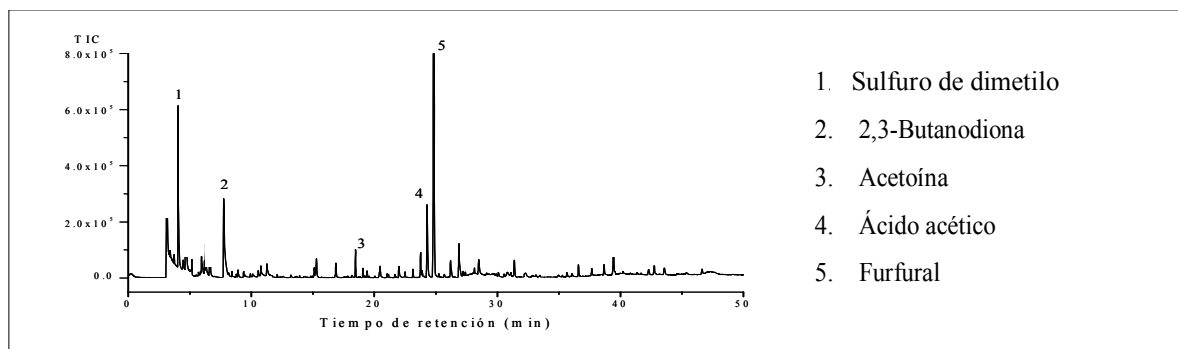
**Figura 8.** Perfil de compuestos volátiles de una miel **MULTIFLORAL CANARIA**.



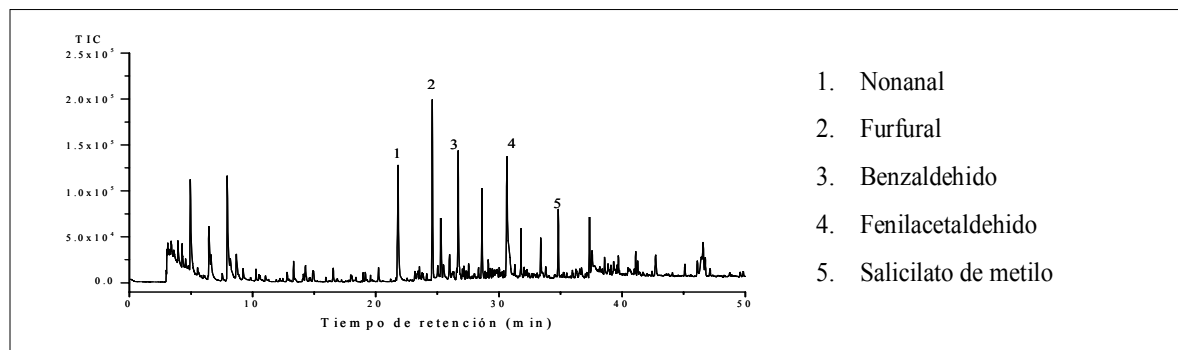
**Figura 9.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **NÍSPERO**.



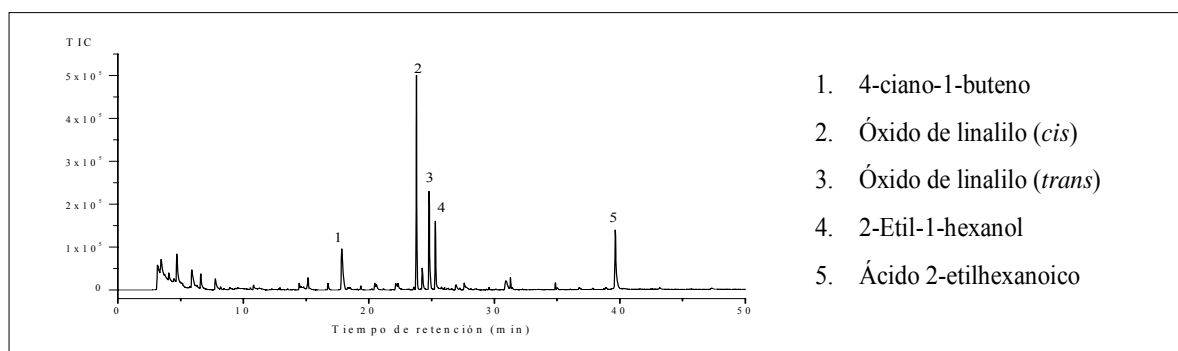
**Figura 10.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **PITERA**.



**Figura 11.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **RETAMA**.



**Figura 12.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **SAUCE**.



**Figura 13.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de **TAJINASTE**.

Las figuras muestran perfiles muy diferentes para cada tipo de miel, mientras que las muestras de un mismo origen presentaron importantes coincidencias. El furfural aparece como uno de los compuestos mayoritarios en la mayoría de las muestras, aunque este compuesto parece estar más relacionado con el calentamiento y almacenamiento de la miel que con su origen floral. El resto de los compuestos presenta una concentración muy variable dependiendo del origen considerado.

Entre todas las muestras analizadas se identificaron los 74 compuestos listados en la tabla 2, en la que para cada uno se indica su tiempo de retención, su índice de retención y los tipos de miel en los que ha sido detectado. Muchos de ellos son comunes a la mayoría de las muestras, mientras que otros solo aparecen en las mieles de un determinado origen.

**Tabla 2.** Tiempos de retención ( $t_R$ ) e índices de retención lineales (IR) de los 74 compuestos identificados en las distintas mieles.

IR	$t_R$	COMPUESTOS	ABE	AG	AJE	ALB	ALM	ENC	MAD	MF	NIS	PIT	RET	SAU	TAJ
	4.2	Sulfuro de dimetilo	X	X	X			X	X	X	X		X		
	5.6	Acetato de etilo		X	X						X				
904	6.1	2-Metilbutanal		X	X				X		X				
912	6.3	3-Metilbutanal		X					X	X	X		X		X
923	6.6	Etanol		X				X	X	X	X		X		
975	7.9	2,3-Butanodiona		X	X				X	X	X	X	X		X
987	8.2	2,3-Pentanodiona							X						
1016	9.0	$\alpha$ -Pino	X												
1057	10.2	Disulfuro de dimetilo	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X
1085	11.0	2-Metil-1-propanol			X						X				
1093	11.3	$\beta$ -Pino											X		
1095	11.3	2-Metil-2-butenal						X							
1099	11.4	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N									X				
1156	13.6	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N									X				
1140	13.0	Felandreno	X												
1153	13.5	$\alpha$ -Terpino	X												
1167	14.0	Limoneno	X												
1177	14.4	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N					X				X				
1174	14.3	Sabineno	X												
1185	14.7	1,8-Cineol	X												
1190	14.9	3-Metil-1-butanol		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
1234	16.5	3-Metil-3-buten-1-ol	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1276	18.0	4-Ciano-1-buteno													X
1317	19.5	Acetoina		X				X	X	X		X	X		X
1304	19.0	1-Hidroxi-2-propanona		X					X	X	X	X	X		X
1309	19.2	2-Metil-2-buten-1-ol				X		X	X	X	X		X	X	

IR	t <sub>R</sub>	COMPUESTOS	ABE	AG	AJE	ALB	ALM	ENC	MAD	MF	NIS	PIT	RET	SAU	TAJ
1344	20.5	1-Hexanol	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X
1372	21.5	Trisulfuro de dimetilo					X				X	X			
1388	22.1	3-Hexen-1-ol	X	X				X		X					X
1385	22.0	Nonanal			X					X	X	X	X	X	X
1396	22.4	Ciclohexanol		X				X		X			X		X
1436	23.8	Óxido de linalilo (cis)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1449	24.2	1-Heptanol													
1458	24.6	Ácido acético		X	X			X	X	X	X	X	X		X
1459	24.6	Furfural	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1461	24.7	Óxido de linalilo (trans)			X			X	X						X
1479	25.3	2-Etilhexanol		X	X			X	X	X		X	X		X
1484	25.5	Decanal			X										
1501	26.1	1-(2-Furanyl)etanona		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1524	26.8	Benzaldehido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1532	27.1	2,3-Butanodiol ( <i>threo</i> )						X							
1535	27.1	Linalol	X	X		X		X							
1537	27.2	Aldehido de lila (I)	X												
1551	27.7	Aldehido de lila (II)	X												
1560	28.0	Aldehido de lila (III)	X												
1567	28.2	2,3-Butanodiol ( <i>erythro</i> )						X							
1569	28.3	Ácido 2-Metilpropanoico			X					X		X	X		
1570	28.3	Dimetilsulfóxido	X	X	X					X	X	X	X		X
1576	28.5	5-Metilfurfural	X	X	X	X	X		X	X	X	X			X
1585	28.8	Aldehido de lila (IV)	X												
1591	29.0	Isoforona	X	X			X	X	X		X				
1594	29.1	Hotrienol	X	X	X			X			X				
1601	29.3	2-Acetil-2-metilfurano													X
1644	30.6	Dihidro-2(3H)Furanona		X											
1631	30.2	Ácido butanoico	X								X		X		
1647	30.7	Bencenacetaldhido	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X
1653	30.9	2-Furanmetanol		X	X		X	X	X	X	X		X		
1656	31.0	2-Hidroxi-3,5,5-Trimetil-2-Ciclohexanona	X				X	X	X		X				
1667	31.3	Ácido metilbutanoico	X	X	X			X		X	X	X	X		X
1702	32.3	4-Oxoisoforona	X	X			X	X	X	X	X				
1721	32.9	n.i. (93,111,155)						X							
1742	33.5	n.i. (93,111,155)						X							
1738	33.4	Eucarvona		X			X		X		X			X	
1789	34.2	Salicilato de metilo												X	
1852	36.6	Ácido hexanoico	X	X				X		X	X		X		X
1886	37.6	Alcohol bencílico	X		X			X	X	X	X		X	X	
1922	38.6	2-Feniletanol	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
1946	39.3	Bencenacetnitrilo								X					
1960	39.7	Ácido 3-etilhexanoico		X				X	X	X	X	X	X		X
1981	40.3	n.i. (123,138,151,166)					X								
2047	42.5	4-Metoxibenzaldehido									X				
2166	46.6	3,4,5-Trimetilfenol						X							
2365	58.0	Ftalato de etilo		X		X					X		X	X	



### 7.3.2. COMPOSICIÓN CUANTITATIVA DE LAS MIELES ESTUDIADAS.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo se seleccionaron los compuestos considerados más relevantes, descartándose los compuestos minoritarios y aquellos que, a pesar de aparecer en concentraciones relativamente altas en algunas muestras, no parecieron estar relacionados con el origen botánico de las mieles.

Este último es el caso del **ftalato de etilo**, conocido plastificante, cuya presencia en varias muestras en concentraciones relativamente altas parece ser debido a una contaminación del envase.

El origen de algunos **trimetilfenoles** tampoco es muy claro, a pesar de que este compuesto se ha identificado previamente en algunas mieles (Castro-Vázquez *et al.*, 2003).

La presencia de **etanol** y **furfural** tampoco parece estar relacionada con el origen botánico de la miel.

Aunque el **ácido acético** ha sido considerado como un indicador de las mieles de mielato (Campos *et al.*, 2000; Soria *et al.*, 2005), este compuesto parece estar relacionado también con otros factores, por lo que tampoco fue tenido en cuenta en la cuantificación.

El origen del **ácido 2-etilhexanoico** también es dudoso. Aunque este compuesto se ha identificado entre los compuestos volátiles de vinos y cervezas (Hawtorne *et al.*, 1987) y en la planta *Cephalophora aromatica* de Irán (Sefidkon *et al.*, 2004), se trata de un producto industrial ampliamente usado como estabilizador, plastificante, lubricante, refrigerante, colorante, antiséptico y es además un metabolito de los ftalatos (Lampen *et al.*, 2004), por lo que tampoco se tuvo en cuenta en la determinación cuantitativa.

El **anexo VI** muestra la composición cuantitativa relativa de los compuestos seleccionados en todas las muestras estudiadas. Los compuestos mayoritarios obtenidos para cada origen se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3.** Rango de concentración relativa (%) de los compuestos más importantes presentes en las muestras de los distintos orígenes.

MUESTRAS	COMPUESTOS	RANGO (%)
ABE (n=1)	Ácido butanoico	16.5
	Ácido 3-metilbutanoico	10.1
	α-Pineno	8.2
	1-Felandreno	3.4
	1,8-Cineol	3.1
AG (n=5)	Sulfuro de dimetilo	38.5-74.4
	1-(2-Furanyl)etanona	0.0-27.9
	3-Metil-1-butanol	4.2-7.7
	Benzaldehido	1.5-12.0
	2,3-Butanodiona	0.0-14.8
AJE (n=1)	2-Feniletanol	24.4
	Sulfuro de dimetilo	22.8
	3-metil-1-butanol	9.6
	Benzaldehido	6.5
	Nonanal	4.3
ALB (n=1)	Fenilacetaldehido	80.7
	Benzaldehido	6.9
	1-(2-Furanyl)etanona	3.3
	2-Feniletanol	2.8
	Óxido de linalilo (cis)	1.9
ALM (n=1)	Eucarvona	63.7
	IR=1981; (123,138,151,166)	8.4
	4-Oxoisoforona	8.3
	Isoforona	5.1
	Benzaldehido	4.5
ENC (n=2)	Sulfuro de dimetilo	7.4-33.7
	3-Metil-1-butanol	6.3-12.3
	3-Metil-3-buten-1-ol	7.7-10.7
	Óxido de linalilo (cis)	3.4-8.6
	Isoforona	0.6-10.9
MAD (n=2)	Isoforona	76.2-81.1
	2-hidroxi-3,5,5-trimetil-2-ciclohexenona	6.8-7.0
	4-Oxoisoforona	2.5-4.7
	2-Furanmetanol	0.0-2.3
	Sulfuro de dimetilo	0.0-2.2
MF (n=3)	Sulfuro de dimetilo	0.9-65.7
	Óxido de linalilo (cis)	0.4-35.5
	2,3-Butanodiona	4.4-17.5
	3-Metil-1-butanol	7.0-8.3
	2-Fenilacetaldehido	0.4-13.0

MUESTRAS	COMPUESTOS	RANGO (%)
NIS (n=3)	IR=1177; C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N	0.0-27.2
	Sulfuro de dimetilo	3.2-25.9
	Benzaldehido	0.9-28.0
	Disulfuro de dimetilo	0.0-17.1
	Eucarvona	0.0-16.6
PIT (n=1)	2-Feniletanol	26.8
	Ácido butanoico	19.3
	Disulfuro de dimetilo	18.1
	Butirato de metilo	11.7
	3-Metil-1-butanol	10.2
RET (n=2)	2,3-Butanodiona	24.6-31.7
	Sulfuro de dimetilo	0.0-25.2
	Benzaldehido	8.3-9.9
	3-Metil-1-butanol	4.2-13.2
	2-Feniletanol	2.3-7.7
SAU (n=1)	Fenilacetaldehido	25.3
	Benzaldehido	22.3
	Salicilato de metilo	11.1
	Eucarvona	7.4
	Alcohol bencílico	6.1
TAJ (n=3)	Óxido de linalilo (cis)	2.2-48.2
	2,3-Butanodiona	4.1-21.0
	Fenilacetaldehido	4.9-13.9
	2-Etil-1-hexanol	0.0-16.0
	3-Metilbutanal	0.0-16.3

Las **mieles de aguacate** presentaron concentraciones muy elevadas de sulfuro de dimetilo (38.5-74.4%). Éste compuesto ha sido identificado en otras mieles en concentraciones inferiores (Bouseta *et al.*, 1992), y puede ir acompañado de pequeñas cantidades de dimetil sulfóxido, que podría formarse por la acción del peróxido de hidrógeno generado por la glucosa oxidasa sobre el sulfuro de dimetilo (Castro-Vazquez *et al.*, 2003). Varias muestras presentaron también disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo, aunque su contenido no se correlacionó con la concentración de sulfuro de dimetilo.

Las **mieles de encina** mostraron elevadas concentraciones de sulfuro de dimetilo, 3-metil-1-butanol y 3-metil-3-buten-1-ol. Aunque el ácido acético no se cuantificó en las mieles estudiadas, los perfiles de estas mieles mostraron una gran proporción de este

compuesto, y en este caso parece probable su relación parcial con el origen floral, al haberse descrito que esta planta emite ácido acético a la atmósfera (Kesselmeier *et al.*, 1998).

La composición volátil de las **mieles de madroño** se caracterizó por unas concentraciones de isoforona excepcionalmente altas (superiores al 75% en las dos muestras analizadas). Otros compuestos relacionados, como el 2-hidroxi-3,5,5-trimetil-2-ciclohexenona, un hidroxido derivado de la isoforona, o la 4-oxoisoforona aparecieron también en concentraciones relativamente altas. Bianchi (Bianchi *et al.*, 2005) sugirieron el uso de algunos norisoprenoides ( $\alpha$ - y  $\beta$ -isoforona y 4-oxoisoforona) como compuestos marcadores de las mieles de madroño, tras el análisis de 10 muestras de este origen producidas en la isla de Cerdeña. Además, estos compuestos han sido considerados como marcadores florales de las mieles de Ericaceas (Guyot *et al.*, 1999), familia a la que pertenece el madroño. Sin embargo, se han detectado concentraciones variables de derivados de isoforona en mieles de diferentes orígenes florales, y sería necesario el estudio de un número más amplio de muestras para evaluar la utilidad de estos compuestos como marcadores, y establecer, si fuera posible, unos intervalos de concentración característicos de las mieles de madroño.

Las **mieles multiflorales canarias** presentaron una concentración muy similar a la obtenida para las mieles de aguacate. Estos resultados pueden deberse a la abundancia de este cultivo en Canarias, por lo que puede presentar una importante contribución a las mieles multiflorales. La tercera miel multifloral presentó concentraciones elevadas de los óxidos de linalilo, lo que ocurre también en las mieles canarias de tajinaste.

El principal compuesto cuantificado en las **mieles de níspero** fue un nitrilo de cadena corta con fórmula  $C_4H_5N$ , probablemente correspondiente a 3-butenonitrilo o metilpropenonitrilo. Dos de las tres muestras estudiadas mostraron la presencia de otros dos compuestos similares en menor concentración. Estos compuestos, junto con otros nitrilos, se han encontrado también en mieles de otros orígenes (Soria *et al.*, 2005; Steeg *et al.*, 1988), aunque generalmente en concentraciones menores.

En las dos **mieles de retama** analizadas el principal compuesto fue la 2,3-butanodiona (24.6-31.7%), seguido de benzaldehído, 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol. Una de estas muestras presentó una elevada concentración de disulfuro de dimetilo (25.2%).

Las **mieles de tajinaste** mostraron una composición variable, aunque destacaron los elevados valores de los óxidos de linalilo, 2,3-butanodiona y fenilacetaldehído (con valores

medios de 28.1%, 14.2% y 8.5% respectivamente). Estos compuestos se caracterizan por sus propiedades aromáticas, por lo que pueden jugar un papel importante en el aroma de este tipo de miel.

De los restantes orígenes (abeto, ajedrea, albaida, almendro, pitera y sauce) sólo se analizó una muestra, por lo que los resultados obtenidos no son concluyentes. Sin embargo, algunas de ellas presentan características destacables que sería interesante confirmar con el estudio de otras muestras.

En la **miel de abeto** se detectaron concentraciones relativamente altas de varios hidrocarburos terpénicos:  $\alpha$ -pineno (8.2%), felandreno (3.4%),  $\alpha$ -terpineno (2.3%), limoneno (1.5%), 1,8-cineol (3.1%) y sabineno (1.6%). Estos compuestos, característicos de los aceites esenciales de coníferas (Santos *et al.*, 2006), podrían ser útiles como indicadores de mielatos de la familia de las Pinaceas (Pinaceae).

Los compuestos mayoritarios de la muestra de **miel de ajedrea** fueron 2-feniletanol (24.4%), seguido de sulfuro de dimetilo (22.8%). Destacaron también las concentraciones de algunos aldehidos (benzaldehido, fenilacetaldehido, nonanal y decanal), de alcoholes ramificados y óxidos de linalilo.

La **miel de albaida** presentó una concentración extremadamente alta de fenilacetaldehido (80.7%). Otros compuestos presentes fueron benzaldehido (6.9%), 1-(2-furanil)etanona, óxidos de linalilo y 2-feniletanol.

La característica más destacable de la **miel de almendro** estudiada fue la elevada proporción (63.7%) de eucarvona (2,6,6-trimetil-2,4-cicloheptadien-1-ona), un compuesto no muy habitual en la miel. Aunque algunas de las mieles restantes presentaron este compuesto, sus concentraciones fueron muy inferiores a la obtenida para la miel de almendro. También se encontraron pequeñas cantidades en algunas muestras estudiadas de los principales orígenes producidos en España (eucalipto, romero, brezo y azahar) (capítulo 6). De los numerosos estudios llevados a cabo sobre la composición volátil de mieles de distintos orígenes, muy pocos han mostrado la presencia de este compuesto (Radovic *et al.*, 2001). Además de su presencia en algunas mieles, se ha identificado eucarvona en varias plantas del género *Teucrium* (Pérez-Alonso *et al.*, 1993) y en azafrán (*Crocus sativus*) (D'Auria *et al.*, 2006).

Un compuesto con índice de retención IR=1981 ( $t_R=40.33\text{min}$ ), y no identificado por la biblioteca de espectros, apareció como el segundo compuesto mayoritario (8,4%) en la miel de almendro. Este compuesto, que no parece haber sido identificado ni caracterizado en estudios previos, mostró un espectro compatible con 7-metoxi-1,5,5-trimetil-1,3-cicloheptadiona. La estructura propuesta está muy relacionada con la de la eucarvona, por lo que ambos compuestos podrían tener el mismo origen. Un estudio de la fracción volátil de flores de diversas especies de *Prunus* reveló la presencia de ambos compuestos en algunas de éstas, aunque no fueron detectados en las flores de almendro.

La **miel de pitera** presentó la proporción más alta de disulfuro de dimetilo de todas las muestras analizadas (18.1%). Sin embargo, el resto de compuestos con azufre presentes comunmente en las mieles, como sulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo no fueron detectados o presentaron concentraciones muy bajas. Otros compuestos importantes en esta muestra fueron 2-feniletanol (26.8%), ácido metilbutanoico (19.3%), butirato de metilo (11.7%) y 3-metil-1-butanol (10.2%).

Los compuestos mayoritarios de la **miel de sauce** fueron fenilacetaldehído (25.3%) y benzaldehído (22.3%), pero destaca especialmente la elevada proporción de salicilato de metilo (11.1%), al tratarse de un compuesto no detectado en las demás muestras analizadas. Aunque su presencia podría estar relacionada con un tratamiento contra lo varroasis, parece más probable su relación con el origen botánico de esta miel, ya que el sauce es una conocida fuente de ácido salicílico y derivados. Esta muestra presentó además pequeñas cantidades de otros compuestos relacionados, como salicilato de etilo y 2-hidroxibenzaldehído.

#### 7.4. CONCLUSIONES

Este trabajo presenta como principal interés el que para la mayoría de los tipos de miel considerados se han analizado por primera vez sus componentes volátiles.

Merecen especial atención entre los resultados obtenidos las concentraciones relativamente altas de hidrocarburos terpénicos en la miel de abeto, la presencia de salicilato de metilo en la miel de sauce, o las elevadas concentraciones de eucarvona en las mieles de almendro y de isoforona en las mieles de madroño, debido a que algunos de estos compuestos no suelen encontrarse en otras mieles. Estos compuestos, junto con otros

presentes entre los determinados en estas mieles, podrían ser marcadores de su origen floral, pero el reducido número de muestras estudiadas para cada tipo impide que se pueda valorar estadísticamente su valor como indicador de tipo de miel. Para llevar a cabo esta valoración se requeriría extender el estudio a un número superior de mieles, incluyendo si es posible las procedentes de distintas zonas geográficas, y el confirmar la ausencia o baja concentración de los compuestos seleccionados en mieles de otros tipos.





---

## CAPÍTULO 8

### EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LOS COMPONENTES VOLATILES DE LA MIEL

#### 8.1. INTRODUCCIÓN

La miel suele ser almacenada a temperatura ambiente durante largos periodos. Además, las mieles son sometidas frecuentemente a calentamiento, con el fin de prevenir la fermentación y evitar la cristalización de los azúcares.

Tanto el almacenamiento prolongado como el calentamiento de las mieles producen cambios en la composición química que pueden afectar negativamente a la calidad del producto. Son especialmente importantes los cambios de su composición volátil, que provocan la pérdida de los particulares aromas de las mieles frescas.

Las variaciones de la concentración de los compuestos volátiles de las mieles dependen principalmente de la temperatura de almacenamiento, aunque también es importante su duración (Visser *et al.*, 1988). Los cambios que se producen en los compuestos volátiles de la miel calentada o almacenada se atribuyen a dos causas principales: la destrucción de compuestos termolábiles y la formación de compuestos volátiles por degradación de azúcares o por reacciones de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard). Ambos pueden provocar cambios importantes en las características organolépticas de la miel (Wooton *et al.*, 1978).

Para evitar la **destrucción de compuestos termolábiles**, la miel no debería exponerse a temperaturas superiores a 40-50°C. Sin embargo, en ciertas épocas del año las mieles almacenadas a temperatura ambiente pueden alcanzar temperaturas por encima de 40°C, mientras que en ciertos calentamientos las mieles son expuestas a temperaturas muy superiores a estos límites.

La **degradación de azúcares** con el almacenamiento prolongado o el calentamiento de la miel produce derivados de furanos (Visser *et al.*, 1988; Wooton *et al.* 1978; Gupta *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 1992). Los compuestos furfural e hidroximetilfurfural (HMF) han sido muy usados como indicadores del calentamiento y almacenamiento de las mieles (Cosentino *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998). Sin embargo, la recuperación de estos compuestos es muy variable dependiendo de la técnica de fraccionamiento empleada, siendo en ocasiones difícil su determinación exacta.

Los principales compuestos volátiles formados por **reacción de Maillard** están relacionados estructuralmente con metilpirazinas y pirroles. Además pueden formarse algunos derivados de furanos, como furanonas. Algunos de estos compuestos podrían servir también como marcadores para diferenciar mieles frescas y procesadas.

El control de la temperatura de almacenamiento y de los tratamientos térmicos aplicados a la miel es fundamental para preservar la calidad del producto. Por este motivo se ha llevado a cabo un estudio de la evolución de la composición volátil de tres mieles de distintas características (mieles de azahar, brezo y mielato de roble), en un año de almacenamiento a distintas temperaturas (10°, 20° y 40°C), así como los cambios producidos en esta fracción al someter a las mieles a distintos tratamientos térmicos.

Dado que el almacenamiento prolongado y el calentamiento de las mieles producen el mismo tipo de cambios en la fracción volátil, se ha evaluado la posibilidad de predecir la evolución de una miel con el tiempo, mediante el calentamiento de la muestra, lo que algunos autores han denominado “almacenamiento acelerado” (Wooton *et al.*, 1978).

## 8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.2.1. MUESTRAS

Se seleccionaron 3 mieles artesanales frescas de azahar, brezo y roble respectivamente para el estudio de sus carbohidratos (capítulo 3) y de sus compuestos volátiles. Se dividió cada una en dos porciones, para someterlas, de forma independiente, a almacenamiento (12 meses) y a calentamiento.

- **Almacenamiento**

Una muestra fue analizada como miel fresca, y las otras 3 fueron almacenadas durante 1 año a temperaturas constantes de 10°, 20° y 40°C en una cámara climática. Todos los almacenamientos se llevaron a cabo por duplicado.

- **Calentamiento**

Las muestras de miel frescas fueron almacenadas en refrigeración (a 4°C durante 1 mes), y posteriormente divididas para someterlas a calentamientos de:

- 40° (2, 8 y 16 horas)
- 60° (1, 2, 4, 12 y 16 horas)
- 80°C (1, 2, 4 y 8 horas).

Se determinó la composición volátil de todas las muestras antes y después del calentamiento.

### 8.2.2. FRACCIONAMIENTO DE LAS MIELES POR SPME.

Tras la completa homogeneización de las muestras, se siguió el procedimiento descrito en el capítulo 4, apartado 4.2.2.2, para el fraccionamiento de los compuestos volátiles de la miel por SPME, utilizando una fibra de C/PDMS.

### 8.2.3. ANÁLISIS GC-MS

El procedimiento y las condiciones cromatográficas son las detalladas en el capítulo 4, apartado 4.2.3.

### 8.3. RESULTADOS

#### 8.3.1. ALMACENAMIENTO

El **anexo VII** muestra la variación de la composición volátil de las mieles de azahar, brezo y roble respectivamente, tras ser almacenadas durante 1 año a 10°, 20° y 40°C. Los datos cuantitativos son relativos (%) con respecto a la cantidad total de compuestos volátiles, estimados a partir de las áreas cromatográficas.

Las tablas 1, 2 y 3 resumen los cambios más significativos producidos en el almacenamiento de las tres mieles estudiadas.

**Tabla 1.** Concentraciones de compuestos que presentaron las principales variaciones con el almacenamiento en la miel de AZAHAR. En la parte superior figuran los compuestos cuya concentración aumentó en el almacenamiento, mientras que la parte inferior muestra los principales casos de disminución producidos.

	COMPUESTOS	Miel fresca	1 año		
			10°C	20°C	40°C
↑	Disulfuro de dimetilo	1.3	1.3	2.5	8.4
	Trisulfuro de dimetilo	0.7	0.5	1.0	3.1
	Óxido de linalilo (cis)	4.2	4.8	6.0	5.6
	Óxido de linalilo (trans)	0.5	0.7	0.6	1.1
	Furfural	14.4	15.8	16.6	43.5
	2-Etil-1-hexanol	0.2	0.8	1.1	2.7
	5-Metilfurfural	0.3	0.9	0.5	1.9
	n.i. (94,79,152)	1.9	2.0	2.8	6.4
	n.i. (94,79,119,152)	0.0	0.3	0.3	0.5
	n.i. (94,79,119,152)	0.0	0.2	0.2	0.4
↓	Nonanal	3.7	1.8	1.7	0.0
	1-(1,4-Dimetil-3-ciclohexen-1-il)-etanona	1.1	0.5	0.3	0.3
	Linalol	1.5	0.4	0.6	0.0
	Aldehido de lila I	5.0	3.2	3.3	0.9
	Aldehido de lila II	8.7	7.4	7.5	1.7
	Aldehido de lila III	5.1	4.7	4.7	1.1
	Aldehido de lila IV	6.9	5.3	5.9	1.5
	α-4-Dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido	2.3	1.7	2.0	0.9
	α-4-Dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido	2.9	2.1	2.4	1.2
	Fenilacetaldehido	8.6	6.4	5.1	1.2
	Antranilato de metilo	3.0	1.4	1.0	0.3

**Tabla 2.** Concentraciones de compuestos que presentaron las principales variaciones con el almacenamiento en la miel de BREZO. En la parte superior figuran los compuestos cuya concentración aumentó en el almacenamiento, mientras que la parte inferior muestra los principales casos de disminución producidos.

	COMPUESTOS	Miel Fresca	1 año		
			10°C	20°C	40°C
↑	2-Metilbutanal	0.0	0.0	0.0	0.5
	3-Metilbutanal	0.0	0.6	0.3	1.0
	3-Metil-1-butanol	4.0	4.6	4.9	7.0
	Óxido de linalilo (cis)	1.2	1.2	1.3	3.5
	Óxido de linalilo (trans)	0.6	0.5	0.7	1.3
	Furfural	1.7	2.7	4.4	24.0
	1-(2-Furanil)etanona	0.4	0.3	0.6	3.2
	5-Metilfurfural	0.0	0.0	0.0	15.0
	β-Damascenona	1.1	0.7	1.3	2.0
	2-(2-Metil-2-propenil)fenol	0.8	0.6	0.9	2.5
↓	Sulfuro de dimetilo	5.2	4.2	4.2	1.9
	2-Metil-2-buten-1-ol	2.7	1.7	1.4	0.6
	3-Hexen-1-ol	0.6	0.5	0.5	0.1
	Nonanal	1.1	0.6	0.3	0.3
	4-Octen-1-ol	1.2	0.9	0.6	0.4
	Ácido acético	6.5	6.8	6.2	2.9
	Decanal	0.6	0.2	0.0	0.0
	Hotrienol	1.8	1.1	1.3	0.2
	Fenilacetaldehido	10.9	12.7	11.6	4.2
	2-Feniletanol	4.2	2.1	3.1	1.8

**Tabla 3.** Concentraciones de compuestos que presentaron las principales variaciones con el almacenamiento en la miel de ROBLE. Los aumentos están reflejados en la parte superior de la tabla, mientras que los principales descensos se presentan en la parte inferior.

	COMPUESTOS	Miel Fresca	1 año		
			10°C	20°C	40°C
↑	3-Metil-1-butanol	2.2	3.9	3.9	5.5
	Dihidro-2-metil-3(2H)-Furanona	0.0	0.0	0.0	3.2
	1-Hidroxi-2-propanona	0.0	0.3	0.3	0.5
	Furfural	4.8	3.9	4.6	20.9
	1-(2-Furanil)etanona	1.0	1.1	0.7	4.0
	5-Metilfurfural	1.0	6.0	3.7	27.5
	2-Furanmetanol	0.6	0.6	1.8	2.4
	Ácido 3-metilbutanoico	0.6	1.0	1.0	1.3
	6-Metil-metoxipiracina	0.0	0.0	0.0	0.4

	COMPUESTOS	Miel	1 año		
		Fresca	10°C	20°C	40°C
↓	3-Metil-3-buten-1-ol	5.0	4.7	4.5	1.2
	Acetoina	2.5	2.5	1.7	0.5
	2-Metil-2-buten-1-ol	3.6	1.8	1.8	0.4
	Óxido de linalilo (cis)	3.2	3.3	3.0	2.1
	Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	2.9	2.4	2.4	1.1
	Benzaldehido	21.2	10.7	8.2	1.3
	Fenilacetaldehido	2.4	2.0	1.7	0.9
	$\alpha$ -terpinoleno	0.6	0.4	0.3	0.1
	Endo-Borneol	1.5	1.5	1.2	0.8
	1-Decanol	0.8	0.0	0.0	0.0
	2-Feniletanol	1.9	1.4	0.9	0.5

Las tablas muestran un aumento de la concentración de **disulfuro de dimetilo** (DMDS) y **trisulfuro de dimetilo** (DMTS) en la miel almacenada a 20°C y 40°C, que parecen ser debidos a la degradación de los aminoácidos con azufre (cisteina y metionina) (Belitz *et al.*, 1987). No sorprende, sin embargo, el descenso de concentración en el caso del sulfuro de dimetilo, que puede deberse a su evaporación con el tiempo debido a su alta volatilidad.

Los **óxidos de linalilo**, cuya concentración aumenta también con el tiempo y la temperatura de almacenamiento, pueden formarse a partir de **linalol**, que disminuye e incluso desaparece en la miel de azahar almacenada a 40°C. La miel de roble presentó un ligero descenso en la concentración de óxidos de linalilo, atribuible a una leve degradación de estos compuestos que no pudo ser compensada con su formación, al no detectarse linalol en la miel fresca.

Los principales aumentos son los experimentados por **furfural** y **5-metilfurfural**, ambos formados debido a la degradación de azúcares. Otros compuestos relacionados con ella son alcohol furfúrico (2-furanmetanol), 1-(2-furanil)etanona y dihidro-2-metil-3-(2H)furanona, aunque en ocasiones también pueden formarse furanonas por reacción de Maillard (Belitz *et al.*, 1987).

El aumento del **3-metil-1-butanol**, así como del **3-metilbutanal** y del ácido **3-metilbutanoico** parecen debidos a la degradación del aminoácido isoleucina (Cremer y Riedman, 1965), mientras que el incremento de **2-metilbutanal** puede atribuirse a la degradación de leucina.

La formación de compuestos típicos de la reacción de Maillard, como **6-metil-metoxipirazina**, solo se observó en la miel de roble almacenada a 40°C.

Otros compuestos cuya concentración relativa aumentó con el almacenamiento fueron **2-etil-1-hexanol**, **1-hidroxi-2-propanona**,  **$\beta$ -damascenona**, **2-(2-metil-2-propenil)fenol**, y tres compuestos de la miel de azahar que no pudieron ser identificados, aunque su espectro de masas presentó un ión molecular a  $m/z = 152$ .

Entre los descensos de concentración observados figura la degradación sufrida por los **aldehidos de lila**, **linalol**, **hotrienol** y por 2 isómeros del  **$\alpha$ -4-dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido**, que aparecieron en las mieles de cítricos.

También disminuyó la concentración de algunos aldehidos alifáticos (**nonanal** y **decanal**) y aromáticos (**benzaldehido** y **fenilacetaldehido**). Es especialmente sorprendente el caso del fenilacetaldehido en las mieles de azahar y brezo, cuyas concentraciones iniciales (8.6% y 10.9% respectivamente) disminuyeron hasta 1.2% y 4.2% respectivamente, en las mieles almacenadas a 40°C.

La concentración de **ácido acético** pareció mantenerse estable en las mieles almacenadas a 10° y 20°C, aunque mostró un notable descenso en el almacenamiento a 40°C

**2-metil-2-buten-1-ol**, **3-hexen-1-ol** y **4-octen-1-ol** también parecen degradarse con el tiempo, al igual que algunos compuestos relacionados con el origen botánico, como **antranilato de metilo**,  **$\alpha$ -terpinoleno** o **endo-borneol**.

### 8.3.2. CALENTAMIENTO.

El **anexo VII** de la presente memoria muestra las concentraciones de los compuestos cuantificados en las 3 mieles, antes y después de ser sometidas a distintos tratamientos térmicos (40°, 60° y 80°) durante distintos tiempos.

En las tablas 4, 5 y 6 figuran las concentraciones relativas de los compuestos que mostraron las principales variaciones en las mieles de azahar, brezo y roble respectivamente, antes y después de ser calentadas.

**Tabla 4.** Principales variaciones de la miel de AZAHAR con el calentamiento a 40°C, 60°C y 80°C, frente a las concentraciones obtenidas la miel no calentada (Sin Cal).

	COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
			2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
↑	Trisulfuro de dimetilo	1.1	1.3	0.6	0.8	1.3	1.0	1.1	1.2	2.0	1.5	1.0	2.1	2.8
	Nonanal	1.4	2.8	1.3	2.1	1.7	2.0	2.4	2.1	2.9	2.9	2.6	3.3	2.1
	Furfural	13.4	13.9	13.8	14.4	14.8	13.7	14.4	20.9	22.1	13.1	13.7	14.4	16.8
	Decanal	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.1	1.5	0.6	1.5	0.8
	5-Metilfurfural	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.8	1.2	0.3	0.2	0.7	0.6
	* (1)	1.4	2.3	0.9	1.6	2.5	1.8	2.1	5.1	5.7	3.1	2.6	6.3	7.9
	* (2)	2.1	2.2	1.4	2.2	4.0	4.6	2.8	5.5	6.5	3.6	2.9	7.5	13.3
	Fenilacetaldehido	5.4	6.0	5.9	6.9	7.0	5.8	6.3	9.9	9.1	9.7	6.1	8.4	11.9
↓	3-Metil-3-butanol	0.8	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5	0.4	0.7	0.6	0.3	0.3
	Acetoina	0.9	0.2	0.3	0.0	0.4	0.5	0.4	0.3	0.2	0.3	0.0	0.3	0.3
	Ácido acético	6.0	1.8	3.0	4.6	1.7	3.8	3.1	2.9	3.4	2.2	2.5	1.1	1.1
	Aldehido de lila I	8.4	8.9	8.6	7.7	7.9	6.1	7.2	4.8	4.8	7.1	5.3	3.6	2.6
	Aldehido de lila II	9.0	8.8	8.5	8.0	8.1	7.3	7.4	3.9	3.7	5.3	6.7	4.3	2.8
	Aldehido de lila III	5.2	4.9	4.6	3.8	4.7	4.1	4.3	3.3	2.7	3.1	4.3	3.1	2.0
	Aldehido de lila IV	6.7	6.5	5.6	5.0	5.9	5.6	5.7	3.3	3.0	3.6	5.0	3.3	2.0
	Antranilato de metilo	2.4	2.9	2.4	2.8	2.6	2.0	2.1	1.5	1.4	1.6	0.9	1.4	1.0

\* (1) Dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido I

\* (2) Dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido II

**Tabla 5.** Principales variaciones de compuestos en la miel de BREZO con el calentamiento a 40°C, 60°C y 80°C, frente a la miel no calentada (Sin Cal).

	COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
			2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
↑	Sulfuro de dimetilo	6.9	7.1	6.9	9.8	9.3	6.8	5.9	7.4	4.2	7.7	7.9	5.5	4.5
	Disulfuro de dimetilo	0.2	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.2	0.4	0.2	0.4	0.3	0.3	0.2
	Nonanal	0.3	0.7	1.0	0.9	0.3	0.6	0.8	0.7	0.9	0.5	0.9	1.1	0.6
	Furfural	1.3	1.4	1.7	1.8	1.6	2.7	4.1	14.0	20.1	5.9	9.0	11.7	22.6
	Benzaldehido	6.7	5.9	6.1	5.5	5.4	6.3	10.4	4.9	7.6	8.8	10.8	13.4	12.8
	5-Metilfurfural	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.3	0.0	0.3	0.5
	Hotrienol	1.1	1.6	2.4	1.9	2.3	2.0	0.7	4.9	3.3	3.3	4.0	5.2	5.0
	2-Furanmetanol	1.9	3.0	1.6	1.6	2.8	2.7	1.9	3.2	1.6	3.0	1.0	1.2	2.7



	COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
			2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
↓	2-Metil-2-butenal	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	0.6	0.3	0.9	0.2	0.7	0.7	0.6	0.6
	3-Metil-1-butanol	4.1	2.3	2.5	2.8	3.4	2.3	2.1	2.3	1.3	2.3	1.9	0.8	0.7
	3-Metil-3-buten-1-ol	2.3	2.2	2.4	2.8	2.8	2.3	2.0	1.8	1.3	1.9	1.7	1.0	0.8
	2-Metil-2-buten-1-ol	3.0	1.7	2.0	2.2	2.3	1.6	1.9	1.7	1.1	1.7	1.5	0.9	0.7
	Ácido acético	8.1	5.7	4.9	6.0	6.9	6.7	6.0	3.3	3.7	5.9	4.1	3.1	3.9
	2-Etil-1-hexanol	2.5	0.5	0.0	0.0	1.2	0.8	3.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Alcohol bencílico	2.9	2.0	1.9	1.7	2.0	2.2	2.4	1.8	1.0	1.2	1.2	1.1	1.2
	2-Feniletanol	5.2	3.8	3.7	3.0	3.6	4.0	4.7	3.0	3.9	3.1	2.2	3.0	2.9

**Tabla 6.** Compuestos que presentaron las principales variaciones en la miel de ROBLE con el calentamiento a 40°C (2, 8 y 16h), 60°C (1, 2, 4, 12 y 16h) y 80°C (1, 2, 4 y 8h), frente a las concentraciones obtenidas para la miel no calentada (Sin Cal).

	COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
			2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
↑	Sulfuro de dimetilo	5.4	15.5	11.2	11.4	17.1	13.1	8.9	8.4	4.9	16.2	17.8	15.6	8.3
	Furfural	3.1	2.2	2.9	3.3	2.5	2.8	5.5	12.5	24.1	9.3	10.4	11.3	23.7
	Benzaldehido	8.9	8.4	10.0	11.0	7.7	10.8	10.5	8.2	11.4	6.8	13.6	14.4	11.8
	5-Metilfurfural	0.7	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.2	1.2	1.5	0.8	0.9	1.1	2.3
	Fenilacetaldehido	1.4	2.1	2.6	2.4	2.6	2.8	5.7	5.0	6.5	5.1	6.1	5.3	5.7
	3,5-Dimetil-4H-piran-4-ona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
	2-Methoxi-6-metilpiracina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.2
	Ácido benzoico	0.2	2.3	3.2	1.3	0.0	2.6	1.1	2.0	2.2	1.2	0.2	0.3	5.8
↓	Etanol	3.1	3.6	1.0	1.4	1.6	1.5	1.2	1.1	0.8	2.0	2.3	1.4	1.5
	2-Metil-2-butenal	1.9	1.2	1.2	1.4	1.3	1.5	1.0	1.2	0.5	1.8	0.7	1.7	1.6
	3-Metil-1-butanol	4.4	2.2	1.7	2.4	2.3	2.7	1.7	1.8	0.6	2.7	2.4	1.7	1.2
	3-Metil-3-buten-1-ol	3.9	3.8	3.2	3.6	4.7	3.6	2.5	2.6	1.8	4.3	2.0	2.1	1.6
	Acetoina	2.3	1.7	1.8	2.0	2.0	1.7	1.1	1.5	0.7	1.8	2.0	1.1	1.0
	2-Metil-2-buten-1-ol	1.8	2.3	1.6	1.9	2.5	2.1	1.7	1.4	0.7	1.1	1.2	0.8	0.5
	Ácido acético	25.0	19.2	22.1	19.1	18.5	13.9	17.2	18.7	18.2	11.9	8.0	7.5	6.2
	2,3-Butanodiol	8.7	7.8	8.5	9.4	7.0	2.4	2.6	3.2	2.6	3.7	2.5	3.9	2.4

El calentamiento no presentó tendencias constantes claras. En muchos casos, el incremento en concentración provocado por la temperatura en los tratamientos térmicos moderados no se mantiene en condiciones más extremas, donde son más importantes los

procesos de evaporación o de degradación térmica de los compuestos que los de su formación.

Como puede observarse en las tablas, **sulfuro, disulfuro y trisulfuro de dimetilo** experimentaron importantes ascensos, debidos a la degradación de cisteína y metionina. Esta tendencia ascendente, sin embargo, cambió para los dos primeros compuestos en las condiciones más extremas de calentamiento (60°C 12 y 16 horas y 80°C, 4 y 8 horas), debido, probablemente, a la degradación térmica de estos compuestos o a su evaporación.

Las concentraciones relativas de **nonanal** y **decanal** también aumentaron, a excepción del caso del tratamiento a 80°C durante 8 horas.

Como ocurría en el almacenamiento, el **furfural** sufrió uno de los principales aumentos, sobre todo en las mieles de brezo y roble. Sin embargo, el aumento del **5-metilfurfural** en este caso fue mucho más leve que en el producido en el almacenamiento, lo que indica que los compuestos formados por degradación de azúcares varían dependiendo del factor (tiempo, temperatura) responsable de dicha degradación. Con el calentamiento a 80°C durante 8 horas también apareció 3,5-dimetil-4H-piran-4-ona.

La **2-metoxi-6-metilpirazina**, compuesto típico de la reacción de Maillard, apareció en el calentamiento a 80°C a partir de las 4 horas.

Las concentraciones de **benzaldehido, fenilacetaldéhido** y los dos isómeros de  **$\alpha$ -4-Dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido** mostraron un incremento con el calentamiento de la miel, a diferencia de lo que ocurría con el almacenamiento.

Las pérdidas más importantes fueron las sufridas por el **ácido acético** en las tres mieles, los **aldehidos de lila** en las mieles de azahar y el **2,3-butanodiol** en la de roble.

También se produjo degradación de otros alcoholes como **3-metil-3-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-3-buten-1-ol, 2-metil-2-buten-1-ol, 2-etil-1-hexanol** o de algunos alcoholes aromáticos como **alcohol benílico y 2-feniletanol**.

## 8.4. CONCLUSIONES

En general, de los resultados obtenidos se deduce que aunque algunos procesos químicos parecen favorecerse tanto por el calentamiento como por el almacenamiento de las mieles, otros son exclusivamente propios de altas temperaturas. Por otra parte, los procesos de origen enzimático provocan cambios en las mieles con el tiempo, que no se observan cuando las mieles son calentadas.

Hasta el momento, el compuesto volátil más usado como marcador del almacenamiento y del calentamiento de las mieles ha sido el hidroximetilfurfural (Sancho *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1998), aunque este compuesto también se utiliza para la detección de adulteraciones (White, 1978). Sin embargo, la recuperación de este compuesto es muy baja con la técnica de fraccionamiento utilizada, por lo que en este estudio resultan más útiles el furfural y el 5-metilfurfural. Valores elevados de furfural pueden indicar un almacenamiento prolongado o un excesivo calentamiento de las mieles. El 5-metilfurfural, sin embargo, presenta un comportamiento muy distinto en las mieles almacenadas (donde su concentración aumenta espectacularmente) y en las calentadas (cuyo aumento es mucho más moderado), por lo que su utilización conjunta con el furfural permite diferenciar a cuál de los dos procesos es debido un incremento de este compuesto.

Como cabía esperar, la temperatura de almacenamiento en las mieles es muy determinante. Mientras que a 10°C los cambios son moderados o en algunos casos inapreciables, a 40°C las variaciones son muy elevadas. Estos resultados muestran la importancia de la temperatura de almacenamiento para la conservación de las características de la miel, pudiendo concluir que la temperatura de almacenamiento más óptima de entre las estudiadas sería el almacenamiento a 10°C, ya que los cambios se dan de forma mucho más lenta. Sin embargo, sería de interés comprobar si existen diferencias de composición con las producidas tras el almacenamiento a temperaturas típicas de refrigeración (4°C).

En el calentamiento, la temperatura de 40°C y el calentamiento 1 ó 2 horas a 60°C no provocaron grandes cambios en la composición volátil de las mieles, pero tratamientos más prolongados o temperaturas más elevadas dieron lugar a variaciones muy importantes en la mayoría de los compuestos. Aunque en la miel no son frecuentes los calentamientos prolongados, no sería conveniente su exposición a temperaturas de 80°C o superiores, ya

que, como muestran los resultados de este estudio, los procesos de degradación térmica son muy notables cuando se alcanzan estas temperaturas.

Aunque algunos compuestos siguen la misma tendencia en mieles almacenadas y calentadas, no parece posible la predicción de la evolución de la composición volátil de una miel con el tiempo mediante la aplicación de un calentamiento (“almacenamiento acelerado”), puesto que esa equivalencia no se cumple para la mayoría de los compuestos.

## CAPÍTULO 9

### IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS INDICADORES DE EUCALIPTO: 2-HIDROXI-5-METIL-3-HEXANONA Y 3-HIDROXI-5- METIL-2-HEXANONA.

#### 9.1.INTRODUCCIÓN

La caracterización de las mieles uniflorales a partir su composición volátil ha sido llevada a cabo generalmente utilizando datos cuantitativos obtenidos a partir del perfil cromatográfico, procesándolos de forma conjunta mediante la aplicación de técnicas estadísticas multivariantes (Soria *et al.*, 2003, Ampuero *et al.*, 2004).

En el caso del origen de una miel, la existencia de compuestos marcadores, cuya presencia dependiera de él inequívocamente, simplificaría notablemente su determinación. Sin embargo, hasta el momento muy pocos compuestos pueden considerarse marcadores fiables de un origen botánico (Radovic *et al.*, 2001). Aunque se han propuesto diversos compuestos como característicos de distintos orígenes (Maga, 1983; Radovic *et al.*, 2001; Serra-Bonheví, 2003), resulta muy difícil su empleo como verdaderos marcadores, ya que en la mayoría de los casos aparecen en mieles de diferentes orígenes en concentraciones variables (Verzera *et al.*, 2001), y es muy difícil establecer unos intervalos de concentración fiables para cada caso.

Algunos compuestos, como la isoforona y otros derivados de 3,5,5,-trimetilciclohexeno han sido propuestos como posibles marcadores de mieles de brezo (Hausler *et al.*, 1991; Guyot *et al.*, 1999). Otros estudios han considerado estos mismos compuestos como indicadores de la miel de madroño (Bianchi *et al.*, 2004), lo que sugiere que puedan ser característicos de mieles de la familia de las Ericaceas. Sin embargo, estos compuestos, cuya procedencia parece estar asociada a la degradación de carotenoides (Tan *et al.*, 1989), están presentes en mieles de otros orígenes (Piasenzotto *et al.*, 2003; Soria *et al.*, 2004), limitando su uso como marcadores.

Un hecho similar ocurre con varios compuestos considerados como característicos de otras mieles. Las mieles de mielato parecen caracterizarse por concentraciones elevadas de ácido acético (Campos *et al.*, 2001), *erythro-* y *threo-*2,3-butanediol y acetoina (Soria *et al.*, 2005). La acetofenona y el 1-feniletanol han sido descritos como característicos de las mieles de castaño (Piasenzotto *et al.*, 2003, Guyot *et al.*, 1998). Las mieles de diente de león (*Taraxacum*) han presentado concentraciones elevadas de varios nitrilos ramificados (Piasenzotto *et al.*, 2003). También se ha destacado la presencia de derivados de linalol como característica de las mieles de cardo (Wilkins *et al.*, 1993), de 3-metilbutanal, 3-hidroxi-4,5-dimetil-2-(5H)furanona y  $\beta$ -damascenona en mieles de trigo negro (Zhou *et al.*, 2002), o de aldehidos lineales, hexanol, cumarina, fenilacetaldehído, ácidos alifáticos metilados y ésteres aromáticos en mieles de lavanda (Bouseta *et al.*, 1996, Serra-Bonheví, 2003). Sin embargo, ninguno de los compuestos señalados es específico del origen considerado, por lo que no resulta fiable su uso individual en la determinación del origen floral.

Uno de los compuestos volátiles más aceptados como marcadores del origen floral de una miel es el antranilato de metilo, cuya presencia en mieles de azahar ha sido citada por diferentes autores (White, 1966; Wooton *et al.*, 1978, Graddon *et al.*, 1979; Bicchi *et al.*, 1983, Serra-Bonheví *et al.*, 1988; Ferreres *et al.*, 1994), aunque este compuesto ha sido identificado en pequeñas cantidades en mieles de otros orígenes.

En el caso de las mieles de eucalipto también se han propuesto varios compuestos como indicadores de su origen, como el sulfuro de dimetilo, algunas dicetonas (2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona) e hidroxicetonas (acetoina, 3-hidroxi-2-pentanona y 2-hidroxi-3-pentanona) (Bouseta *et al.* 1992; Graddon *et al.*, 1979; Radovic *et al.*, 2001). Sin embargo, los estudios descritos en esta memoria (capítulos 3 y 4), así como otros trabajos llevados a cabo por diferentes autores (Soria *et al.*, 2004; Bianchi *et al.*, 2005) han mostrado la presencia de sulfuro de dimetilo, 2,3-butanodiona y acetoina en otros tipos de miel, lo que reduce su utilidad como marcadores. Los demás compuestos citados (2,3-pentanodiona, 3-hidroxi-2-pentanona y 2-hidroxi-3-pentanona) no están presentes en todas las mieles de eucalipto, como muestran las 22 muestras analizadas en el capítulo 3, por lo que tampoco pueden considerarse marcadores fiables de este tipo de miel.

Los estudios previos sobre la composición volátil de las principales mieles uniflorales españolas (eucalipto, romero, brezo y azahar) (capítulo 3), así como los llevados a cabo en mieles de 13 orígenes menos comunes (capítulo 4) revelan la presencia, en todas las mieles de eucalipto examinadas, de dos compuestos no identificados que, además, no se han encontrado en muestras de ninguno de los demás orígenes estudiados.

En este apartado se describe la identificación tentativa de estos compuestos a partir de sus espectros de masas, y posteriormente su síntesis enzimática partiendo de un método desarrollado por Neuser (Neuser *et al.* 2000a, 2000b), que ha permitido su confirmación mediante la comparación de espectros de masas e índices de retención de los compuestos sintetizados y de los presentes en las muestras de miel de eucalipto. Por último, se ha evaluado la utilidad de estos compuestos como marcadores cualitativos de las mieles de eucalipto.

## 9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.2.1. MUESTRAS

Se seleccionaron 22 muestras de mieles de eucalipto producidas en varias regiones españolas, principalmente de las especies más abundantes en España: *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camaldulensis*.

### 9.2.2. ANÁLISIS MELISOPALINOLÓGICO

El origen de las mieles estudiadas fue confirmado mediante análisis melisopalínológico, que se llevó a cabo en la Universidad de León, siguiendo el método propuesto por Louveaux & Maurizio (Louveaux *et al.*, 1978). Las fracciones fueron analizadas sin acetólisis. Se identificaron 400 granos de polen siguiendo el método de Montero (Montero *et al.*, 1990).

### 9.2.3. ANÁLISIS SPME-GC-MS

La determinación de la composición volátil de las muestras seleccionadas fue llevada a

cabo dentro del estudio de mieles uniflorales españolas descrito en el capítulo 6 de la presente memoria.

### 6.3.2. SÍNTESIS DE 2-HIDROXI-5-METIL-3-HEXANONA Y 3-HIDROXI-5-METIL-2-HEXANONA

La síntesis de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona se realizó siguiendo un método de síntesis enzimática de aciloinas desarrollado por Neuser (Neuser *et al.*, 2000a).

Se mezcló 1mg de piruvato decarboxilasa comercial procedente de *Saccharomyces Cerevisiae* con 2mM de tiamina difosfato y 20mM de MgSO<sub>4</sub> en un tampón de citrato (pH=6) en dos tubos, con un volumen total de 4 ml. Todos los reactivos comerciales fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Para la síntesis de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona se añadieron al primer tubo 300µm de acetaldehído y una cantidad equimolar de α-cetocaproato sódico, ambos reactivos de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

La síntesis de 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona se llevó a cabo en el segundo tubo, añadiendo 300µm de piruvato sódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 300µm de isovaleraldehído (Scharlau Chemie, Barcelona, España). Ambos experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

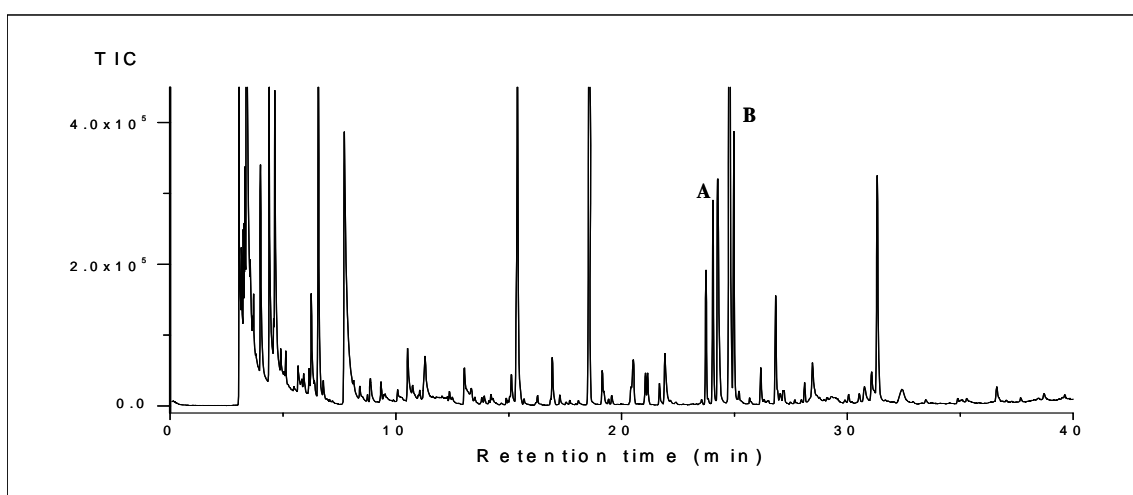
Se incubaron los tubos a 24°C durante 48 horas. Las mezclas de las reacciones fueron extraídas con éter etílico (2x2ml) y los extractos, concentrados hasta un volumen final de 1 ml, se analizaron por GC-MS usando la columna y el programa de temperatura previamente descritos para el análisis de compuestos volátiles en muestras de miel.



### 9.3. RESULTADOS

#### 9.3.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN MIEL DE EUCALIPTO.

La figura 1 muestra un perfil de volátiles típico de una miel de eucalipto, obtenido por SPME y GC-MS en las condiciones descritas en el apartado 1.2.3.2. Los picos A y B corresponden a los compuestos n.i.1 (I.R.=1449 y  $m/z$  [57, 45, 85, 43]) y n.i.2 (I.R.=1475 y  $m/z$  [43, 69, 45, 87]) respectivamente, caracterizados en estas mieles (Capítulo 3).

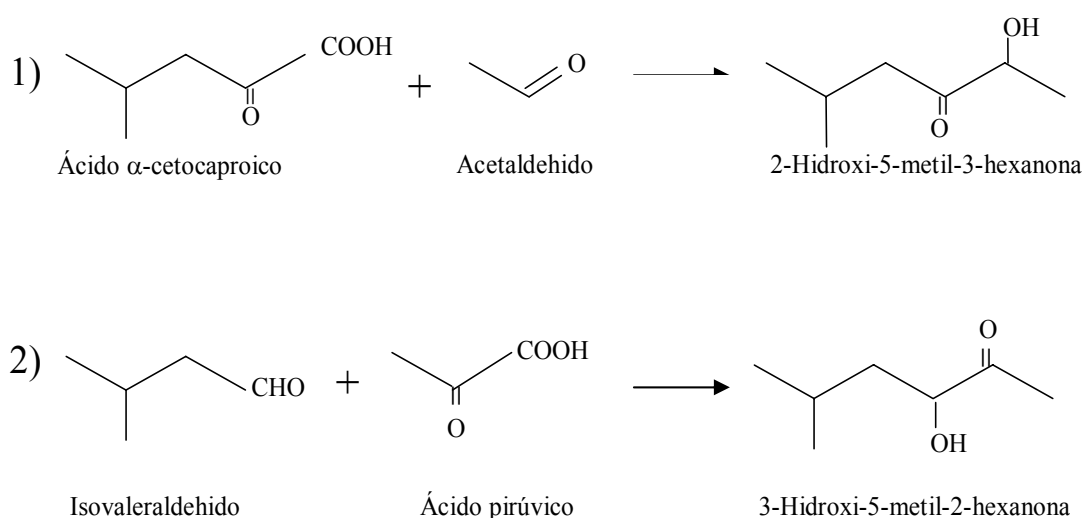


**Figura 1.** Perfil de compuestos volátiles de una miel de eucalipto obtenido por SPME-GC-MS. Los compuestos A y B corresponden a los compuestos no identificados n.i.1 y n.i.2 respectivamente.

Aunque las bibliotecas de espectros de masas disponibles (Mc Lafferty & Stauffe, 1989) no mostraron compuestos con espectros similares a los obtenidos para estos picos, se propusieron para ellos tentativamente las estructuras de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (A) y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona (B), basándonos en su fragmentación. El ión molecular de ambos, a  $m/z=130$ , es compatible con la composición elemental  $C_7H_{14}O_2$ . Los fragmentos comunes ( $m/z=43, 45, 57, 85, 87$ ) indican la presencia de cadenas alifáticas con o sin oxígeno, mientras que  $m/z=74$  parece indicar una trasposición con la posible presencia de un carbonilo. Para el compuesto A, los fragmentos característicos aparecen a  $m/z 45, 85$  y  $57$ , explicables en una estructura de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona por las rupturas de los enlaces entre los carbonos 2 y 3, muy favorecida, ( $C_2H_5O$ ,  $m/z 45$ , y  $C_5H_9O$ ,  $m/z 85$ ), y

entre los carbonos 3 y 4 ( $C_4H_9$ ,  $m/z$  57). Para el compuesto n.i. 2, la ruptura más favorecida es también la del enlace entre carbonos 2 y 3, pero en este caso los iones resultante son  $C_2H_3O$ ,  $m/z$  43 y  $C_5H_{11}O$ ,  $m/z$  87, como aparece en el espectro. Esta interpretación se apoyó también en la comparación con la fragmentación observada para otros compuestos de estructura relacionada (2-hidroxi-3-pentanona, 3-hidroxi-2-pentanona) presentes también en muestras de miel de eucalipto, pero no es suficiente para proponer una estructura inequívoca, siendo necesaria una confirmación mediante patrones.

Estos compuestos no han sido descritos previamente en la miel, y no están disponibles comercialmente como patrones. Sin embargo, se encuentran en una serie de aciloinas, sintetizadas por Neuser, mediante reacciones, catalizadas por piruvato decarboxilasa, de un oxoácido con acetaldehído o de un aldehído con ácido pirúvico (Neuser *et al.*, 2000a, 2000b). La reacción de acetaldehído y ácido  $\alpha$ -cetocaproico dio lugar a 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona como la principal aciloina, mientras que el principal producto de la reacción de isovaleraldehído y ácido pirúvico fue 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona (figura 2).

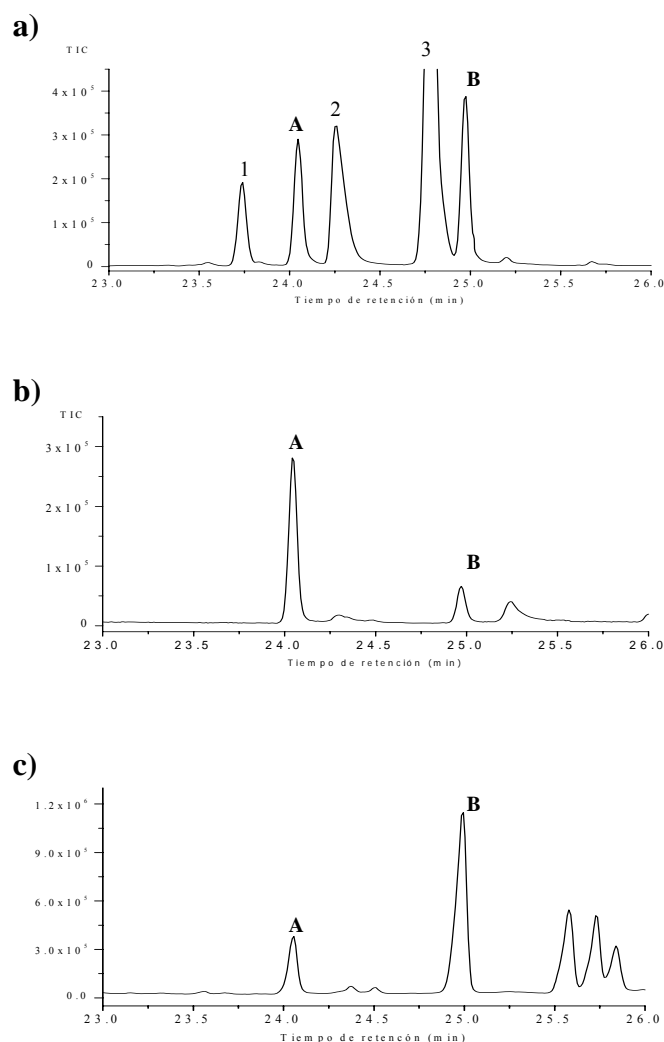


**Figura 2.** Reacciones de síntesis de 2-Hidroxi-5-metil 3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona descritas por Neuser. (Neuser *et al.*, 2000).

Los compuestos obtenidos por Neuser para 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona presentaron espectros de masas muy similares a los de los compuestos A y B.

Con el fin de confirmar nuestra identificación tentativa, se llevó a cabo la síntesis de estos compuestos. Siguiendo la reacción 1 de la figura 3 se obtuvo una mezcla de los dos compuestos, con un 80% de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y un 20% de 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona, mientras que la reacción 2 dio lugar a un 22.5% de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y un 77.5% de 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona. Estos resultados están de acuerdo con los de Neuser (Neuser *et al.*, 2000a), que atribuyó la formación de las aciloinas secundarias en cada caso a un equilibrio cetoenólico provocado por la enzima.

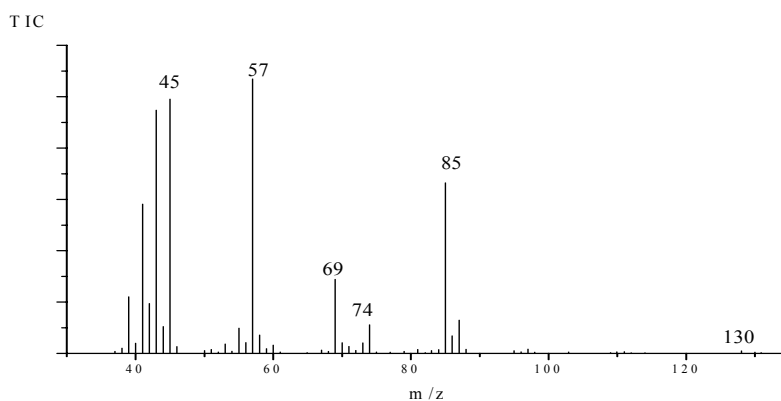
La figura 3 muestra la zona ampliada del cromatograma donde eluyen los compuestos en una miel de eucalipto (3a), y los productos de las reacciones enzimáticas (3b) y (3c).



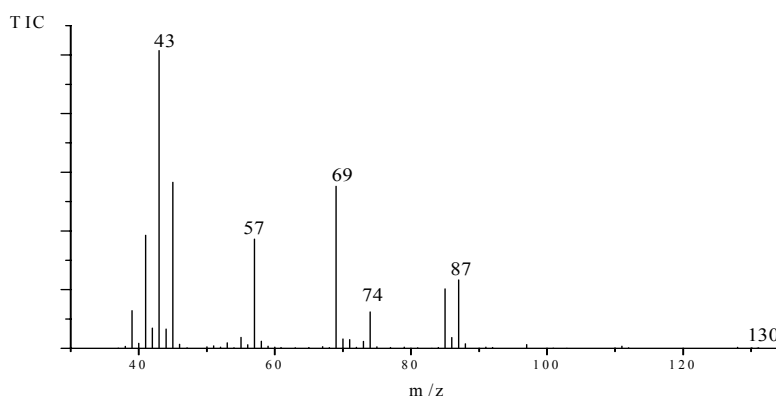
**Figura 3.** La figura 3a muestra una vista ampliada de la zona de elución de los perfil cromatográfico compuestos n.i. 1 (A) y n.i. 2 (B) de una miel de eucalipto. Los picos 1, 2 y 3 corresponden óxido de linalilo (*cis*), ácido acético y a la suma de furfural y óxido de

linalilo (*trans*-) respectivamente. En las figuras 3b y 3c se muestran los productos de la síntesis enzimática a partir de acetaldehído y ácido  $\alpha$ -cetocaproico y a partir de isovaleraldehído y ácido pirúvico respectivamente.

Los espectros de masas que presentaron los compuestos sintetizados (figuras 4 y 5) fueron similares a los publicados por Neuser., e idénticos a los registrados para los picos n.i. 1 (figura 4) y n.i. 2 (figura 5) en las mieles de eucalipto. Los índices de retención de la 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (IR=1449) y la 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona (IR=1475) sintetizadas coincidieron también con los datos experimentales de retención de los compuestos n.i.1 y n.i.2 encontrados en las mieles, lo que confirmó la identificación tentativa realizada previamente.



**Figura 4.** Espectro de masas de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona sintetizada, que coincide con el espectro de masas del pico n.i. 1.



**Figura 5.** Espectro de masas de 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona sintetizada, que coincide con el espectro de masas del pico n.i. 2.

### 9.3.2. PRESENCIA DE 2-HIDROXI-5-METIL-3-HEXANONA Y 3-HIDROXI-5-METIL-2-HEXANONA EN MUESTRAS DE MIEL.

La tabla 2 muestra los datos de concentración (relativa con respecto al total de volátiles) de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona en las 22 muestras que presentaron polen de eucalipto.

**Tabla 2.** % de los compuestos 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (A) y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona (B) y % de polen presente en las mieles de eucalipto estudiadas.

MUESTRA	% comp. A	% comp. B	% Polen eucalipto
H1	1.54	1.25	68
H2	0.58	0.88	25
H3	0.87	0.59	44
H4	0.40	1.10	38
H5	2.33	4.77	21
H6	5.92	9.93	70
H7	4.31	8.47	19
H8	3.29	4.00	87
H9	0.31	0.40	71
H10	0.76	0.96	56
H11	5.93	7.64	42
H12	4.82	7.85	21
H13	1.12	1.49	54
H14	1.42	1.63	22
H15	6.45	7.51	83
H16	2.40	3.85	73
H17	5.69	7.20	57
H18	0.25	0.30	13
H19	5.19	8.90	46
H20	4.28	6.03	40
H21	1.75	1.78	65
H22	8.06	9.57	34

La concentración de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona (A) osciló entre 0.25% y 8.06%, mientras que la 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona (B) presentó concentraciones entre 0.30% y 9.93%.

Los valores de concentración no presentaron una buena correlación con el porcentaje de polen de eucalipto. Sin embargo, estos resultados eran esperables, debido a que tanto el porcentaje de polen como la concentración relativa de los compuestos deben depender muy marcadamente de las características del resto de plantas que contribuyen parcialmente a las distintas muestras.

Si prestamos atención a los resultados cualitativos observamos que todas las muestras que contenían polen de eucalipto presentaron estos dos compuestos. Además, éstos no aparecieron en las 108 muestras estudiadas previamente (capítulos 6 y 7) de otros 19 orígenes florales (romero, brezo, azahar, abeto, aguacate, ajedrea, albaida, almendro, encina, madroño, multifloral canaria, níspero, pitera, retama, sauce y tajinaste).

Aunque estos compuestos no se han identificado previamente en miel, otros autores han mostrado la presencia de dos compuestos no identificados en mieles de eucalipto que podrían corresponder a los identificados en este trabajo. En un estudio de la composición volátil de mieles de acacia, castaño, eucalipto, brezo, lavanda, tilo, colza, romero y girasol de distintos países llevado a cabo por Radovic (Radovic *et al.*, 2001) las 3 mieles de eucalipto analizadas presentaron dos compuestos no identificados con datos de masas y retención compatibles a los encontrados para A y B en este trabajo: estos compuestos no aparecieron en ninguna de las mieles estudiadas de los demás orígenes. Entre 40 muestras analizadas de varios orígenes, Piasenzotto (Piasenzotto *et al.*, 2003) caracterizó en las mieles de eucalipto dos compuestos con índices de retención IR=1446 e IR=1482 y fragmentos de masas (57, 45, 51, 85, 74) y (43, 69, 87, 41, 74), respectivamente, que parecen corresponder a 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona. Un estudio de mieles australianas de *Eucalyptus leucoxylon* y *Eucalyptus melliodora* (D'arcy *et al.*, 1997) mostraron también dos compuestos con fragmentos de masas similares, lo que parece indicar que los compuestos descritos en este trabajo aparecen también en las mieles de eucalipto de otros países.

#### 9.4. CONCLUSIONES

La presencia de 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona en una muestra de miel parecen ser buenos indicadores de las mieles de eucalipto, al aparecer en todas las muestras de eucalipto analizadas por SPME-GC-MS y no estar presentes en muestras de una gran variedad de orígenes estudiados. Los datos bibliográficos acerca de la composición volátil de mieles de distintos orígenes parecen confirmar que este hecho se extienda a mieles de otras zonas.

Los datos cualitativos de la composición volátil de una muestra de miel obtenidos por SPME-GC-MS permiten detectar la contribución del néctar de eucalipto en la muestra, pero para determinar la cantidad mínima necesaria que permite considerar una miel como unifloral de eucalipto serían necesarios más estudios, así como para explicar el posible origen de estos compuestos en las mieles de eucalipto.





## CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método de cálculo iterativo para la determinación cuantitativa de disacáridos en miel por GC-MS, que presenta notables mejoras frente a la regresión lineal múltiple al ser más robusto frente a la presencia de compuestos interferentes, que pueden caracterizarse a partir de sus tiempos de retención y de sus espectros de masas.

2. El programa de cálculo escrito en VisualBasic basado en este método ha permitido calcular con una mayor fiabilidad la concentración de disacáridos en 104 mieles uniflorales analizadas en dos columnas, y así evaluar la utilidad de estos datos en la diferenciación del origen floral de las distintas muestras.

3. El estudio de los cambios en la concentración de carbohidratos en mieles durante su almacenamiento prolongado ha puesto de manifiesto unas pautas significativas para ciertos disacáridos, que dependen de la temperatura de almacenamiento. El calentamiento de las mieles a distintas temperaturas durante cortos periodos no dio lugar sin embargo a cambios significativos en la composición de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos de la miel.

4. La comparación de la destilación a vacío seguida de extracción líquido-líquido y de la microextracción en fase sólida (SPME), técnicas de fraccionamiento de compuestos volátiles que evitan el uso de elevadas temperaturas, ha mostrado la utilidad y complementariedad de ambas en la determinación de los compuestos volátiles de la miel, siendo la SPME la que presentó unas mayores ventajas debido a su rapidez y sencillez.

5. La estimación de la recuperación por SPME de diversos compuestos volátiles de la miel a partir de datos cualitativos, llevada a cabo mediante el empleo de modelos matemáticos no lineales y redes neuronales, ha proporcionado unos resultados preliminares prometedores.

6. La determinación de los componentes volátiles de la miel mediante SPME seguida de GC-MS en 104 mieles uniflorales de tipos de gran producción en España (eucalipto, brezo, romero y azahar), seguida del empleo de técnicas estadísticas multivariantes ha permitido una clasificación correcta del 91.2% de las muestras estudiadas. Para seleccionar

con mayor fiabilidad los compuestos más relevantes de las mieles de cada origen, se ha desarrollado un procedimiento que tiene en cuenta la posible presencia de mieles de mezcla entre las muestras estudiadas.

7. Se ha determinado la composición volátil de 26 muestras de miel de 13 orígenes poco comunes, algunos de ellos no estudiados previamente, lo que supone un primer paso en su caracterización y en la selección de compuestos relacionados con su procedencia.

8. El efecto del tiempo y de la temperatura de almacenamiento sobre la concentración de los componentes volátiles de las mieles varía con la estructura de los compuestos. El distinto comportamiento de algunos de éstos frente al tiempo y a la temperatura podría utilizarse para distinguir entre almacenamientos prolongados y calentamientos de muestras de miel.

9. Se han identificado por primera vez en mieles la 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona y la 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona, presentes en todas muestras de eucalipto estudiadas, a partir de sus datos de fragmentación y de su síntesis enzimática, lo que supone un avance importante para la determinación del origen floral de este tipo de mieles, ya que la ausencia de estos compuestos en las muestras de los demás orígenes indica su utilidad como marcadores de la miel de eucalipto.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALISSANDRAKIS, E., DAFEREA, D., TARANTILIS, P. A., POLISSIOU, M., and HARIZANIS, P. C. 2003. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chem.*, **82**: 575-582.
- AMIOT, M.J., AUBERT, S., GONNET, M. y TACCHINI, M. Les composés phenoliques des miels. étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie* **20** (1989), 115-125.
- AMPUERO, S., BOGDANOV, S., and BOSSET, J.-O. 2004. Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX. *Eur. Food Res. Technol.*, **218**: 198-207.
- ANDRADE, P., FERRERES, F., AMARAL, M. T. 1997. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **20**. 2281-2288.
- ANKLAM, E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.*, **63**. 549-562.
- ARTHUR, C.L. y PAWLISZYN, J. 1990. "Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148.
- B.O.E. (Boletín Oficial del Estado). Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios envasados. Ver versión nueva de 2003. Madrid, **187** (1982), 19867-19878.
- BATTAGLINI BERNARDINI, M., BOSI, G., GRANDI, A. 1973. [The glucide fraction in the nectars of 57 botanical species of Central Italy.]. *Annali della Facolta di Agraria, Universita degli Studi di Perugia*, **28**. 231-242.
- BELITZ, H.D. y GROSCH, W. *Honey* en Food Chemistry. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg, 1987, pág. 636-643.
- BERAHIA, T., CERRATI, C., SABATIER, S., AMIOT, M. J. 1993. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey. *Sciences des Aliments*, **13**. 15-24.
- BERNAL J.L, NOZAL M.J., TORIBIO L., DIEGO J.C., RUIZ A . 2005. A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *Journal of Separation Science* **28** (9-10) . 1039-1047, 2005

- BHANDARI, B., D'ARCY, B., CHOW, S. 1999. Rheology of selected Australian honeys. *Journal of Food Engineering*, **41**. 65-68.
- BIANCHI, F., CARERI, M., and MUSCI, M. 2005. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.*, **89**: 527-532.
- BIANCHI, F., CARERI, M., MUSCI, M. 2005. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Chem.*, **89**. 527-532.
- BICCHI, C., BELLIARDO, F. y FRATTINI, C. 1983. "Identification of the volatile components of some Piedmontese honeys". *J. Apic. Res.* **22**, 130-136.
- BLANCH, G.P., REGLERO, G, HERRAIZ, M. 1996. Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device. *Food Chem.* **56** (4) : 439-444.
- BMDP Statistical Software release 7, University Press of California, Los Angeles, **1992**.
- BOGDANOV, S. 1997. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in honey. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **30**. 748-753.
- BONAGA, G., GIUMANINI, A.G. y GLIOZZI, G. 1986. "The volatile fraction of chesnut honey". *J. Agric. Food Chem.* **34**, 319-326.
- BOUSETA, A. y COLLIN, S. 1995. "Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavours". *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1890-1897.
- BOUSETA, A., COLLIN, S. y DUFOUR, J.P. 1992. "Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system". *J. Apic. Res.* **31**, 96-109.
- BOUSETA, A., SCHEIRMAN, V., and COLLIN, S. 1996. Flavor and Free Amino Acid Composition of Lavender and Eucalyptus honeys. *J. Food Sci.*, **61**: 683-687.
- CABRAS, P., ANGIONI, A., TUBEROSO, C., FLORIS, I., RENIERO, F., GUILLOU, C., GHELLI, S. 1999. Homogentisic acid. a phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**. 4064-4067.

- CAMPOS, G., DELLA MODESTA, R. C., and DA SILVA, T. J. P. 2001. Variacao de alguns parametros do mel de melato em relacao do mel de melato em relacao ao mel floral. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **60**: 59-64.
- CAMPOS, G., NAPPI, G.U., RASLAN, D.S. y AUGUSTI, R. 2000. Volatile substances in floral honey and honeydew honey. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **20**, 18-22.
- CAMPOS, G., NAPPI, G.U., RASLAN, D.S. y AUGUSTI, R. 2000. "Volatile substances in floral honey and honeydew honey". *Cienc. Tecnol. Aliment.* **20**, 18-22.
- CASTRO-VÁZQUEZ, L., PÉREZ-COELLO, M.S., CABEZUDO, M.D. 2003 "Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques". *Chromatographia* **57**, 227-233.
- CEBALLOS L, PINO J. 2005. Application of solid-phase microextraction in the analysis of fruit and vegetables volatile compounds. *Ciencia y Tecnologia de Alimentos* **15** (3) : 65-71.
- COLE, A. y WOOLFENDEN, E. 1991. "Gas extraction techniques for sample preparation in gas chromatography". *LC-GC Int.* **5**, 8-15.
- COSTA LEITE, J. M., TRUGO, L. C., COSTA, L. S. M., QUINTEIRO, L. M. C., BARTH, O. M., DUTRA, V. M. L., DE MARIA, C. A. B. 2000. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry*, **70**. 93-98.
- COTTE JF, CASABIANCA H, CHARDON S, LHERITIER JL, GRENIER-LOUSTALOT MF. 2003. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J Chromatogr A*. **1021**.145-55.
- COTTE JF, CASABIANCA H, CHARDON S, LHERITIER JL, GRENIER-LOUSTALOT MF. 2004. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Anal Bioanal Chem.* **380**. 698-705.
- COTTE, J. F., CASABIANCA, H., CHARDON, S., LHERITIER, J. L., and GRENIER-LOUSTALOT, M. F. 2004. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Anal. Bioanal. Chem.*, **380**. 698-705.
- CREMER, E., RIEDMANN, M. 1964. Identifizierung von gaschromatographisch getrennten Aromastoffen in Honigen. *Z. Naturforsch. B.* **19**, 76-77.
- D'ARCY. Antioxidants in Australian Floral Honeys. Identification of health enhancing nutrient components. 2005. *Rural Industries Research and Development Corporation*. ISBN 1 74151 139 9.

- D'ARCY, B.R., RINTOUL, G.B., ROWLAND, C.Y. y BLACKMAN, A.J. 1997. "Composition of Australian honey extractives. 1. Norisoprenoids, monoterpenes and other natural volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) honeys". *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1834-1843.
- DA COSTA LEITE, J. M., TRUGO, L. C., COSTA, L. M. S., QUINTERO, L. M. C., BARTH, O. M., DUTRA, V. M. L., and DE MARÍA, C. A. B. 2000. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chem.*, **70**. 93-98.
- D'AURIA M, MAURIELLO G, RACIOPPI R, ET AL. 2006. Use of SPME-GC-MS in the study of time evolution of the constituents of saffron aroma: modifications of the composition during storage. *Journal of Chromatographic Science* **44** (1) : 18-21.
- de LUIS-VILLOTA, P. Las Abejas y la Miel. Ed. Acento, Madrid, 1999.
- DEJONGH, D.C.; RADFORD, T.; HRIBAR, J.D.; HANNESSIAN, S.; BIEBER, M.; DAWSON, G.; SWEELEY, C.C. 1969. Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc*; **91** (7). 1728-40.
- DELGADO, C., TOMAS-BARBERAN, F. A., TALOU, T., GASET, A. 1994. Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids. *Chromatographia*, **38**. 71-78.
- Directiva 2001/110/CEE del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel. Diario Oficial de las Comunidades Europeas núm. L10, de 12 de enero de 2002, pág. 48-52.
- DONER, L. W. 1977. The sugars of honey. A review. *J. Sci. Food Agric.*, **28**. 443-456.
- DVASH, L., AFIK, O., SHAFIR, S., SCHAFFER, A., YESELSON, Y., DAG, A., LANDAU, S. 2002. Determination by near-infrared spectroscopy of perseitol used as a marker for the botanical origin of avocado (*Persea americana* Mill.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**. 5283-5287.
- ECHIGO, T. TAKENAKA, T. 1973. [Changes in erlose contents by honeybee invertase.]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan [Nihon Nogei Kagakkai-shi]*, **47**. 177-183.
- ENGLMAIER, P. 1990. High Resolution-GLC of carbohydrates as their Dithioacetaltrimethylsilylates and -trifluoroacetates. *J. High Resol. Chromatogr.* **13**, 121-125.

- FERRERES, F., ANDRADE, P., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1994b. Flavonoids from Portuguese heather honey. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **199**. 32-37.
- FERRERES, F., ANDRADE, P., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1996. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**. 2053-2056.
- FERRERES, F., ANDRADE, P., and TOMÁS-BARBERÁN, F. A. 1996. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *J. Agric. Food Chem.*, **44**. 2053-2056.
- FERRERES, F., ANDRADE, P., GIL, M. I., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1996. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **202**. 40-44.
- FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., TOMAS-LORENTE, F., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1993. Hesperetin, a marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **61**. 121-123.
- FERRERES, F., GINER, J. M., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1994a. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **65**. 371-372.
- FERRERES, F., GINER, J. M., and TOMÁS-BARBERÁN, A. 1994. A comparative study of Hesperetin and Methyl Anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *J. Sci. Food Agric.*, **65**. 371-372.
- FERRERES, F., JUAN, T., PEREZ-ARQUILLUE, C., HERRERA-MARTEACHE, A., GARCIA-VIGUERA, C., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1998. Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **77**. 506-510.
- FERRERES, F., ORTIZ, A., SILVA, C., GARCIA-VIGUERA, C., TOMAS-BARBERAN, F. A., TOMAS-LORENTE, F. 1992. Flavonoids of 'La Alcarria' honey. A study of their botanical origin. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **194**. 139-143.
- FERRERES, F., TOMAS-BARBERAN, F. A., GIL, M. I., TOMAS-LORENTE, F. 1991. An HPLC technique for flavonoid analysis of honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **56**. 49-56.
- FÖLDHÁZI, G. 1994. Analysis and quantitation of sugars in honey of different botanical origin using high performance liquid chromatography. *Acta alimentaria*, **23**. 299-311.

- GHELDOF, N., XIAO-HONG, W., and ENGESETH, N. J. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**. 5870-5877.
- GIL, M. I., FERRERES, F., ORTIZ, A., SUBRA, E., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1995. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**. 2833-2838.
- GIL, M. I., FERRERES, F., ORTIZ, A., SUBRA, E., and TOMÁS-BARBERÁN, F. A. 1995. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *J. Agric. Food Chem.*, **43**. 2833-2838.
- GODEFROOT, M., SANDRA, P. y VERZELE, M. 1981. "New method for quantitative essential oil analysis". *J. Chromatogr.* **203**, 325-335.
- GÓMEZ BÁREZ JA, GARCÍA-VILLANOVA RJ, ELVIRA GARCÍA S, GONZÁLEZ PARAMÁS AM. 1999. Optimization of the Capillary Chromatographic Analysis of Mono- and Oligosaccharides in honeys. *Chromatographia*; **50**(7/8).461-9.
- GÓMEZ BAREZ, J. A., GARCÍA-VILLANOVA, R. J., ELVIRA GARCÍA, S., RIVAS PALÁ, T., GONZÁLEZ PARAMÁS, A. M., and SÁNCHEZ SÁNCHEZ, J. 2000. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *Eur. Food Technol.*, **210**. 437-444.
- GÓMEZ BÁREZ, J.A., GARCÍA-VILLANOVA, R.J., ELVIRA GARCÍA, S., RIVAS PALÁ, T., GONZÁLEZ PARAMÁS, A.M. y SÁNCHEZ SÁNCHEZ, J. 2000. "Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters". *Eur. Food Res. Technol.* **210**, 437-444.
- GRADDON, A.D., MORRISON, J.D. y SMITH, J.F. 1979. "Volatile constituents of some unifloral Australian honeys". *J. Agric. Food Chem.* **27**, 832-837.
- GUIDOTTI, M. y VITALI, M. 1998. "Identificazione di composti organici volatili in miele mediante SPME e GC/MS". *Ind. Aliment.* **37**, 351-353, 356.
- GUPTA, J. K., KAUSHIK, R., and JOSHI, V. K. 1992. Influence of different treatments, storage temperature and period on some physico-chemical characteristic and sensory qualities of Indian honey. *J. Fd. Sci. Technol.*, **29**: 84-87.
- GUYOT, C., BOUSETA, A., SCHEIRMAN, V., and COLLIN, S. 1998. Floral origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 625-633.



- GUYOT, C., SCHEIRMAN, V., and COLLIN, S. 1999. Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chem.*, **64**: 3-11.
- HAN-SEUNG, S. USTUNOL, Z. 2005. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria. an in vitro comparison. *Food Research International*, **38**. 721-728.
- HÄUSLER, M. y MONTAG, A. 1989. "Isolation, identification and quantitative determination of the norisoprenoid (S)-(+)-dehydrovomifoliol in honey". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **189**, 113-115.
- HÄUSLER, M. y MONTAG, A. 1990 "Minorbestandteile des Honigs mit Aromarelevanz. III. Trachtspezifische Verteilung aromatischer Aldehyde und Vorkommen von Stickstoff- und Schwefelheterocyclen". *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **86**, 171-174.
- HÄUSLER, M. y MONTAG, A. 1991. "Minorbestandteile des honigs mit aroma-relevanz. IV. Vorkommen und trachtspezifische verteilung des aromastoffprekursors (S)-dehydrovomifoliol". *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **87**, 35-36.
- HAWTHORNE, DB; KAVANAGH, TE; CLARKE, BJ. 1987. 2-Ethylhexanoic acid in beer. *Journal of the institute of brewing*, **93** (1): 11-11 jan-feb.
- HERNANDEZ, O. M., FRAGA, J. M. G., JIMENEZ, A. I., JIMENEZ, F., ARIAS, J. J. 2005. Characterization of honey from the Canary Islands. determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*, **93**. 449-458.
- HORVÁTH K, MOLNÁR-PERL I. 1997. Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides by GC-MS of their TMS ether oxime derivatives. II. In honey. *Chromatographia*. **45**. 328-35.
- HORVÁTH, K. and MOLNÁR-PERL, I. 1997. Simultaneous quantitation of mono-, di- and trisaccharides by GC-MS of their TMS ether oxime derivatives. II. In honey. *Chromatographia*, **45**. 328-335.
- HORVÁTH, K. and MOLNÁR-PERL, I. 1998. Simultaneous GC-MS Quantitation of o-Phosphoric, Aliphatic and Aromatic Carboxylic Acids, Proline, Hydroxymethylfurfural and Sugars as their TMS derivatives. in honeys. *Chromatographia*, **48**. 120-125.
- HUBER, R. E., MATHISON, R. D. Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrose of honey bees (*Apis Mellifera*). *Can. J. Biochem.* **54**, 153-164.

- HUIDOBRO, J. F., REA, M. E., MATO, I., MUNIATEGUI, S., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A., and SANCHO, M. T. 2001. Variation of apparent ethanol content of unspoiled northwestern Spanish honeys during storage. *Food Chem.*, **73**. 417-420.
- JEON, I.J., REINECCIUS, G.A. THOMAS, E.L. 1976. Artifacts in flavor isolates produced by steam vacuum distillation and solvent extraction of distillate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **24** (2) . 433-434.
- JOERG, E. SONTAG, G. 1992. Determination of phenolic acids in honey by HPLC using coulometric dual electrode detection. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **88**. 179-183.
- JOERG, E., SONTAG G. 1993. Multichannel coulometric detection coupled with liquid-chromatography for determination of phenolic esters in honey. *Journal of chromatography* 635 (1). 137-142 APR 9 1993.
- JORG E, SONTAG G. Determination of phenolic-acids in honey by hplc using coulometric dual electrode detection. 1992. *Deutsche lebensmittel-rundschau*. **88** (6). 179-183.
- KAJIWARA, S., GANDHI, H., USTUNOL, Z. 2002. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal Bifidobacterium spp.. an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Protection*, **65**. 214-218.
- KESSELMEIER, J; BODE, K; GERLACH, C; ET AL. 1998. Exchange of atmospheric formic and acetic acids with trees and crop plants under controlled chamber and purified air conditions. *Atmospheric environment*, **32** (10): 1765-1775.
- KOLB, B. 1982. "Multiple headspace extraction. a procedure for eliminating the influence of the sample matrix in quantitative headspace gas chromatography". *Chromatographia* **15**, 587-594.
- KOLB, B. y AUER, M. 1990 b. "Analysis of water in liquid and solid samples by headspace gas chromatography. Part II. Insoluble solid samples by the suspension approach". *Fresenius J. Anal. Chem.* **336**, 297-302.
- KOLB, B. y AUER, M. 1990a. "Analysis of water in liquid and solid samples by headspace gas chromatography. Part I. Liquid and soluble solid samples". *Fresenius J. Anal. Chem.* **336**, 291-296.
- KOLB, B. y ETTRE, L.S. 1991. "Theory and practice of multiple headspace extraction". *Chromatographia* **32**, 505-513.
- KOLB, B., POSPISIL, P. y AUER, M. 1984. "Quantitative headspace analysis of solid samples; a classification of various sample types". *Chromatographia*. **19**, 113-122.

- KOSTIAINEN, R. 1994. "Effect of operating parameters in purge-and-trap GC-MS of polar and non polar organic compounds". *Chromatographia*. **38**, 709-713.
- LAMPEN, A; ZIMNIK, S; NAU, H. Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors PPARs and induce differentiation of F9 cells. 2003. *Toxicology and applied pharmacology*, **188** (1): 14-23.
- LEE, K.-G. and SHIBAMOTO, T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem.*, **74**: 443-448.
- LIKENS, S.T. y NICKERSON, G.B. 1964. "Detection of certain hop oil constituents in brewing products". *Am. Soc. Brew. Chem.* **5**, 13-19.
- LOUVEAUX, J. 1985. [Honey]. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, **20**. 57-70.
- LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A. y VORWOHL, G. International Commission for Bee Botany of IUBS. Methods of Melissopalynology. *Bee World*. **59** (1978), 139-157.
- LOW, N. H. SPORNS, P. 1988. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *Journal of Food Science*, **53**. 558-561.
- MAGA.J.A. 1983. Honey Flavor. *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, **16**. 65-68.
- MAIGNIAL, L., PIBAROT, P., BONETTI, G., CHAINTREAU, A. y MARION, J.P. 1992. "Simultaneous distillation-extraction under static vacuum. isolation of volatile compounds at room temperature". *J. Chromatogr.* **606**, 87-94.
- MARTOS, I., COSENTINI, M., FERRERES, F., TOMAS-BARBERAN, F. A. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**. 2824-2829.
- MARTOS, I., FERRERES, F., YAO, L., D'ARCY, B., CAFFIN, N., and TOMÁS-BARBERÁN, F. A. 2000. Flavonoids in Monospecific *Eucalyptus* honeys from Australia. *J. Agric. Food Chem.*, **48**. 2744-2748.
- MATEO R, BOSH REIG F. 1996. Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.* **60** (1).33-41.
- MAURIZIO, A. (1975). *Microscopy of honey* en *Honey. A Comprehensive Survey*". Ed. Heinemann, Londres, 1975, pág. 240-257.
- NEURAL NETWORK DEVELOPMENT TOOL, versión 1.40, Bjorn Saxén, 1995.

- NEUSER, F., ZORN, H., and BERGER, R. G. 2000. Formation of Aliphatic and Aromatic  $\alpha$ -hydroxy ketones by *Zygosaccharomyces bisporus*. *Z. Naturforsch*, **55**: 560-568.
- NEUSER, F., ZORN, H., and BERGER, R. G. 2000. Generation of Odorous Acyloins by Yeast Pyruvate Decarboxilases and their Occurrence in Sherry and Soy Sauce. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 6191-6195.
- NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., TORIBIO, L., ALAMO, M., DIEGO, J. C. 2005. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**. 3095-3100.
- OLAFSDOTTIR, G., STEINKE, J.A. y LINDSAY, R.C. 1985. "Quantitative performance of a simple Tenax-GC adsorption method for use in the analysis of aroma volatiles". *J. Food Sci.* **50**, 1431-1436.
- PAWLISZYN, J. "Theory of Solid-Phase Microextraction". *J. Chromatogr. Sci.* 38(2000), 270-278.
- PÉREZ, R.A., SÁNCHEZ-BRUNETE, C., CALVO, R.M. y TADEO, J.L. 2002. "Analysis of volatiles from Spanish honeys by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2633-2637.
- PEREZ-ARQUILLUÉ, C., CONCHELO, P., ARIÑO, A., JUAN, T., and HERRERA, A. 1995. Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chem.*, **54**. 167-172.
- PERKINS ML, D'ARCY BR, LISLE AT, ET AL. 2005. Solid phase microextraction of stale flavour volatiles from the headspace of UHT milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **85** (14) : 2421-2428.
- PIASENZOTTO, L., GRACCO, L. y CONTE, L. 2003. "Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control". *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1037-1044.
- PIGMAN, W.W., GOEPP, R.M. Jr. Chemistry of the Carbohydrates. 1948. p.434. Academic Press, New York.
- PINHO O, FERREIRA IMPLVO, SANTOS. 2006. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A*. **1121** (2) : 145-153.
- QUINTANA J.B., RODRIGUEZ I. 2006. Strategies for the microextraction of polar organic contaminants in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **384** (7-8) : 1447-1461.

- 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 Chem.* **72**, 511-520.
- ROWLAND, C.Y., BLACKMAN, A.J., D'ARCY, B.R. y RINTOUL, G.B. 1995. "Comparison of organic extractives found in Leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and Leatherwood flowers and leaves". *J. Agric. Food Chem.* **43**, 753-763.
- RUBINO F.M. 1989. Silylaldonitrile derivatives for the determination of sugars by gas chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatogr.* **473** (1). 125-133.
- RUSSELL, K. M., MOLAN, P. C., WILKINS, A. L., HOLLAND, P. T. 1990. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**. 10-13.
- SABATIER, S., AMIOT, M. J., TACCHINI, M., AUBERT, S. 1992. Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science*, **57**. 773-774.
- SANCHO, M. T., MUNIATEGUI, S., HUIDOBRO, J. F., and SIMAL-LOZANO, J. 1992. Aging of honey. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 134-138.
- SANTOS, AM; VASCONCELOS, T; MATEUS, E; ET AL. 2006. Characterization of the volatile fraction emitted by phloems of four pinus species by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, **1105** (1-2): 191-198 FEB 10 2006
- SANZ M.L., SANZ J, MARTÍNEZ-CASTRO I. 2002. Characterization of o-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas-chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia.* **56** (9/10).617-22.
- SANZ M.L., SANZ J, MARTÍNEZ-CASTRO I. 2004. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *J Chromatogr A.* **1059**.143-8.
- SANZ ML, DIEZ-BARRIO MT, SANZ J, MARTÍNEZ-CASTRO I. 2003a. GC behavior of disaccharide trimethylsilyl oximes. *J Chromatogr Sci.* **41**.205-8.
- SANZ, M. L., GONZÁLEZ, M., DE LORENZO, C., SANZ, J., and MARTÍNEZ-CASTRO, I. 2005b. A contribution to the differentiation between nectar honey and honedew honey. *Food Chem.*, **91**. 313-317.
- SANZ, M. L., SANZ, J., and MARTÍNEZ-CASTRO, I. 2004. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *J. Chromatogr. A*, **1059**. 143-148.

- SANZ, M.L., DEL CASTILLO, M.D., CORZO, N., OLANO, A. 2003b. 3-Furoylmethyl Amino Acids and Hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4278-4283.
- SANZ, M.L., POLEMIS, N., MORALES, V., CORZO, N., DRAKOULARAKOU, A., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A. 2005. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**. 2914-2921.
- SCANU, R., SPANO, N., PANZANELLI, A., PILO, M. I., PIU, P. C., SANNA, G., TAPPARO, A. 2005. Direct chromatographic methods for the rapid determination of homogentisic acid in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Chromatography A*, **1090**. 76-80.
- SEFIDKON, F; JAMZAD, Z. 2004. Essential oil composition of *Satureja spicigera* (C. Koch) Boiss. from Iran. *Flavour and fragrance journal*, **19** (6): 571-573
- SERRA BONVEHÍ, J. 1988. Determinación de antranilato de metilo en la miel de cítricos (*Citrus sp.*) del levante español, y su influencia en la actividad diastásica de la miel. *Alimentaria*, 37-40.
- SERRA BONVEHÍ, J. and VENTURA COLL, F. 1995. Characterization of citrus honey (*Citrus Spp.*) produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.*, **43**. 2057.
- SERRA BONVEHÍ, J. and VENTURA COLL, F. 2003. Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *J. Sci. Food Agric.*, **83**: 275-282.
- SERRA BONVEHÍ, J., BENTABOL MANZANARES, A., and SANTOS VILLAR, J. M. 2004. Quality evaluation of broom honey (*Spartocytisus supranibius* L) produced in Tenerife (The Canary Islands). *J. Sci. Food Agric.*, **84**. 1097-1104.
- SERRA BONVEHÍ, J., GÓMEZ PAJUELO, A., and GONELL GALINDO, J. 1987. Composición, propiedades físico-químicas y espectro polínico de algunas mieles monoflorales de España. *Alimentaria*, **septiembre**: 61-84.
- SERRA BONVEHÍ, J., SOLIVA TORRENTÓ, M., and MUNTANÉ RAICH, J. 2000. Invertase activity in fresh and processed honeys. *J. Sci. Food Agric.*, **80**: 507-512.
- SIDDIQUI, I. 1970. The sugars of honey. *Adv. Carbohydr. Chem. & Biochem.*, **25**. 285-297.
- SIESS, M.H., LEBON, A.M, CANIVENCLAVIER, M.C, AMIOT, M.J, SABATIER, S, AUBERT SY, SUSCHETET M . Flavonoids of honey and propolis. Characterization and

- effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. 1996. *Journal of agricultural and food chemistry*. **44** (8). 2297-2301.
- SINGH, N. and BAH, P. K. 1998. Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. *J. Agric. Food Chem.*, **35**: 154-156.
  - SOLER C, GIL M, GARCIAVIGUERA C, TOMAS-BARBERAN FA. 1995. Flavonoid patterns of french honeys with different floral origin. *Apidologie* **26** (1). 53-60 1995
  - SORIA, A. C., GONZÁLEZ, M., DE LORENZO, C., MARTÍNEZ-CASTRO, I., and SANZ, J. 2004. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chem.*, **85**. 121-130.
  - SORIA, A. C., GONZÁLEZ, M., DE LORENZO, C., MARTÍNEZ-CASTRO, I., and 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. *J. Sci. Food Agric.*.
  - SORIA, A. C., MARTÍNEZ-CASTRO, I., and SANZ, J. 2003. Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **26**. 793-801.
  - STATISTICA 7.1. Statsoft. Inc 1984-2995. Tulsa, OK, USA.
  - STEEG, E. MONTAG, A. 1987. Aromatic carbonic-acids of honey. *Zeitschrift fur lebensmittel-untersuchung und-forschung* **184** (1). 17-19.
  - STEEG, E. y MONTAG, A. 1988. "Minorbestandteile des honigs mit aroma-relevanz. II. Sensorisch aktive Abbauprodukte aromatischer carbonsäuren und glykosidisch gebundene aromaten". *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **84**, 147-150.
  - STEEG, E. y MONTAG, A. Minorbestandteile des honigs mit aroma-relevanz. II. Sensorisch aktive Abbauprodukte aromatischer carbonsäuren und glykosidisch gebundene aromaten". *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **84** (1988), 147-150.
  - SWALLOW, K. W. and LOW, N. H. 1990. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **38**. 1828-1832.
  - SWEELEY CC, BENTLEY R, MAKITA M, WELLS WW. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J Am Chem Soc.* **85**.2497-507.

- TAN, S., WILKINS, A. L., HOLLAND, P. T., and MCGUIE, T. K. 1989. Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 1217-1221.
- TERRAB, A., VEGA-PÉREZ, J. M., DÍEZ, M. J., and HEREDIA, F. J. 2001. Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. *J. Sci. Food Agric.*, **82**. 179-185.
- TOMAS-BARBERAN, F. A., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., TOMAS-LORENTE, F. 1993. Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **196**. 38-44.
- TROYANO, E., VILLAMIEL, M., OLANO, A, SANZ, J., MARTINEZ-CASTRO, I. 1996. Monosaccharides and myo-inositol in commercial milks. *J. Agric. Food Chem.* **44** (3). 815-817.
- VAL, A., HUIDOBRO, J. F., SANCHEZ, M. P., MUNIATEGUI, S., FERNANDEZ-MUINO, M. A., SANCHO, M. T. 1998. Enzymatic determination of galactose and lactose in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**. 1381-1385.
- VAN DEN DOOL, H; KRATZ, P.D. 1963. A generalisation of the. retention index system including linear temperature. gas-liquid partition chromatography. *J.Chromatogr.* **11**, 463-471
- VENEMA, A. 1986. "Possibilities of dynamic headspace analysis coupled with capillary GC for the investigation of solid samples". *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **9**, 637-640.
- VENEMA, A. 1988. "Dynamic headspace capillary gas chromatography. a versatile analytical technique". *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **11**, 128-131.
- VENEMA, A. 1990. "The usefulness of the headspace analysis-gas chromatography technique for the investigation of solid samples". *J. High Resolut. Chromatogr.* **13**, 537-539.
- VERZERA, A., CAMPISI, S., ZAPPALÀ, M. y BONACCORSI, I. 2001. "SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin". *Am. Lab. News* **7**, 18-21.
- VILLAMIEL, M., del CASTILLO, M.D., CORZO, N. y OLANO, A. 2001. "Presence of furosine in honeys". *J. Sci. Food Agric.* **81**, 790-793.
- VISSER, F. R., ALLEN, J. M., and SHAW, J. 2005. The effect of heat on the volatile flavour fraction from a unifloral honey. *J. Apic. Res.*, **27**: 175-181.



- VITENBERG, A.G. y REZNIK, T.L. 1984. "Gas chromatographic headspace analysis with pneumatic sampling". *J. Chromatogr.* **287**, 15-27.
- WESTON, R. J. and BROCKLEBANK, L. K. 1999. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chem.*, **64**. 33-37.
- WHITE JR., J. W.; Riethof, M. L.; Kushnir, I. 1961. Composition Of Honey. Vi. The Effect Of Storage On Carbohydrates, Acidity And Diastase Content *Journal Of Food Science* **26**:63
- WHITE, J. W. Jr. 1966. Methyl Anthranilate Content Of Citrus Honey. *Journal Of Food Science* **31**:102
- WHITE, J. W. Jr., MAHER, 1953. TRANSGLUCOSIDATION BY HONEY INVERTASEJ. *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 360.
- WHITE, J.W. Jr. *Honey en Advances in Food Research.* **24** (1978), 287-374. Academic Press Inc., New York.
- WILEY/NBS REGISTRY OF MASS SPECTRAL DATA. 1989. Mc Lafferty FW & Stauffe DB, New York, USA.
- WILKINS, A. L., LU, Y., and TAN, S. 1993. Extractives from New Zealand honeys. 4. Linalool derivatives and other components from nodding thistle (*Carduus nutans*) honey. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 873-878.
- WOTTON, M. and EDWARDS, R. A. 1978. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of australian honeys. 3. Changes in volatile components. *J. Apic. Res.* , **17**: 167-172.
- YANG, X. y PEPPARD, T. 1994. "Solid-phase microextraction for flavor analysis". *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1925-1930.
- YAO, L. H., 2002. Flavonoids and other polyphenols in Australian tea and honey. PhD thesis, *The University of Queensland (Australia)*.
- ZHANG, Z., YANG, M.J. y PAWLISZYN, J. 1994. "Solid-phase microextraction". *Anal. Chem.* **66**, 844-853.
- ZHOU, Q., WINTERSTEEN, C.L. y CADWALLADE, K.R. 2002. Identification and quantitation of aroma-active components that contribute to the distinct malty flavor of buckwheat honey. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2016-2021.



## ANEXO I (CAPÍTULO 1)

### LISTADO DEL PROGRAMA DESARROLLADO PARA EL PROCESO ITERATIVO

#### 'DEFINICION DE VARIABLES

```
Dim ki(16), kopt(16)
Dim nom$(16), lmin(16), lmax(16), lminm(16),
lmaxm(16)
Dim lminm(16), lmaxm(16), lminf(16),
lmaxf(16)
Dim comp(16)
Dim mej(16)
Dim estep(16)
Dim ventf(23), ventfc(23), ventm(29), ventmc(29)
Dim wvenm(29), aream(29), nvenm(29)
Dim wvenf(23), areaf(23), nvenf(23)
Dim puntom(600), puntm(600)
Dim puntof(600), puntf(600)
Dim resim(200, 29), resif(200, 23), composic(200,
16)
Dim difemm(200), difeff(200)
Dim areacalm(29), areacalf(29)
Dim zz, malas(114)
```

#### 'FIN DEL PROCESO

```
Private Sub btnSalir_Click()
End
End Sub
```

#### 'INICIO DEL PROCESO Y ENTRADA DE DATOS

```
Private Sub Form_Load()
ChDir App.Path
Me.Show
Open App.Path + "\datos.txt" For Input As #1
For i = 1 To 16: Input #1, nom$(i): Next i
For i = 1 To 29: Input #1, a, tretm(i): Next i
For i = 1 To 23: Input #1, b, tretf(i): Next i
Close 1
Open App.Path + "\mevent.txt" For Input As #1
i = 0
While Not EOF(1)
i = i + 1
For j = 1 To 29: Input #1, maream(i, j): Next j
Wend
Close 1
nmuestras = i
Open App.Path + "\fevent.txt" For Input As #1
i = 0
While Not EOF(1)
i = i + 1
For j = 1 To 23: Input #1, mareaf(i, j): Next j
Wend
Close 1
```

#### 'FICHEROS DE SALIDA

```
Open "reme11.txt" For Output As #2
Open "refe.txt" For Output As #3
Open "comp.txt" For Output As #4
For i = 1 To 200
For j = 1 To 29: resim(i, j) = 0: Next j
For j = 1 To 23: resif(i, j) = 0: Next j
For j = 1 To 16: composic(i, j) = 0: Next j
Next i

For i = 1 To 114: malas(i) = 0: Next i
malas(9) = 1
malas(13) = 1
malas(81) = 1
malas(87) = 1
malas(94) = 1
malas(98) = 1
malas(100) = 1
malas(103) = 1
malas(108) = 1
For i = 1 To 114
If malas(i) = 1 Then
mareaf(i, 11) = mareaf(i, 10) + mareaf(i, 11)
mareaf(i, 10) = 0
End If
Next i
```

```
grdVentM.Row = 0: grdVentM.ColWidth(0) =
600
grdVentM.Col = 1: grdVentM.Text = "V.Exp":
grdVentM.ColWidth(1) = 600
grdVentM.Col = 2: grdVentM.Text = "V.Calc":
grdVentM.ColWidth(2) = 600
grdVentM.Col = 3: grdVentM.Text = "Difer.":
grdVentM.ColWidth(3) = 600
grdVentF.Row = 0: grdVentF.ColWidth(0) =
600
grdVentF.Col = 1: grdVentF.Text = "V.Exp":
grdVentF.ColWidth(1) = 600
grdVentF.Col = 2: grdVentF.Text = "V.Calc":
grdVentF.ColWidth(2) = 600
grdVentF.Col = 3: grdVentF.Text = "Difer.":
grdVentF.ColWidth(3) = 600
```

```
grdComp.Row = 0
grdComp.Col = 1: grdComp.Text = "LMaxM"
grdComp.Col = 2: grdComp.Text = "LMaxF"
grdComp.Col = 3: grdComp.Text = "LMAX"
grdComp.Col = 4: grdComp.Text = "mg/g"
grdComp.Col = 5: grdComp.Text = "L.min."
grdComp.Col = 6: grdComp.Text = "L.max."
grdComp.Col = 7: grdComp.Text = "Step"
```

```

Line (8, 8)-Step(600, 146), RGB(255, 255, 255),
BF
Line (8, 8)-Step(600, 146), , B
Line (8, 160)-Step(600, 146), RGB(255, 255, 255),
BF
Line (8, 160)-Step(600, 146), , B
Line (8, 8)-Step(600, 146), RGB(255, 255, 255),
BF
Line (8, 8)-Step(600, 146), , B

```

*'COMIENZO DEL CALCULO*

*'Carga areas de pico.*

```

For zz = 1 To nmuestras
lblMuest.Caption = Str$(zz)
For i = 1 To 16: ki(i) = 0: Next i
For i = 1 To 29: aream(i) = maream(zz, i)
For j = 1 To 3: grdVentM.Col = j: grdVentM.Row =
i: grdVentM.Text = "": Next j
Next i
For i = 1 To 23: areaf(i) = mareaf(zz, i)
For j = 1 To 3: grdVentF.Col = j: grdVentF.Row =
i: grdVentF.Text = "": Next j
Next i

```

*'Estimacion anchuras y factores metil*

```

sumamet = 0
trmax = 0: trmin = 100: armax = 0
For i = 1 To 29
sumamet = sumamet + aream(i)
If tretm(i) > trmax Then trmax = tretm(i)
If tretm(i) > 0 And tretm(i) < trmin Then trmin =
tretm(i)
If aream(i) > armax Then armax = aream(i)
wvenm(i) = 0.1 * tretm(i) + 0.4
Next i
trmin = 0.95 * trmin: trmax = 1.05 * trmax: trdif =
trmax - trmin
For i = 1 To 600: puntom(i) = 0: puntm(i) = 0: Next
i
factam = 600 / trdif: factbm = -600 * trmin / trdif:
factym = armax / 5

```

*'Estimacion anchuras y factores fenil*

```

sumafen = 0
trmax = 0: trmin = 100: armax = 0
For i = 1 To 23
sumafen = sumafen + areaf(i)
If tretf(i) > trmax Then trmax = tretf(i)
If tretf(i) > 0 And tretf(i) < trmin Then trmin =
tretf(i)
trmin = tretf(2) 'Sacarosa
If areaf(i) > armax Then armax = areaf(i)
wvenf(i) = 0.08 * tretf(i) + 0.4
Next i

```

*'Convierte áreas con sumas como patrón*

```

For i = 1 To 23
areaf(i) = areaf(i) * sumamet / sumafen

```

```

areaf(i) = Int(100 * areaf(i) + 0.5) / 100
Next i
armax = armax * sumamet / sumafen
trmin = 0.95 * trmin: trmax = 1.05 * trmax: trdif =
trmax - trmin
For i = 1 To 600: puntof(i) = 0: puntf(i) = 0:
Next i
factaf = 600 / trdif: factbf = -600 * trmin / trdif

```

*'Pinta cromatograma experimental metil, y guarda en puntom()*

```

Line (8, 8)-Step(600, 146), RGB(255, 255, 255),
BF
Line (8, 8)-Step(600, 146), , B
For i = 1 To 29
If tretm(i) > 0 Then
anch = Int(2 * wvenm(i))
For k2 = -2 * anch To 2 * anch
incr2 = 5 * aream(i) * Exp(-(k2 ^ 2) / anch)
tr = tretm(i) * factam + factbm
'If k2 = 0 Then Debug.Print i, tr, incr2
If tr + k2 < 600 And tr + k2 > 0 Then
x = Int(tr + k2): y = Int(10 * incr2 + 0.5) / 10
puntom(x) = puntom(x) + y
End If
Next k2
End If
Next i
altmax = 0
For i = 1 To 600
If puntom(i) > altmax Then altmax = puntom(i)
Next i
factym = 135 / altmax
For i = 1 To 599
Line (i + 8, 148 - factym * puntom(i))-(i + 9,
148 - factym * puntom(i + 1))
Next i

```

*'Pinta cromatograma experimental fenil, y guarda en puntof()*

```

Line (8, 160)-Step(600, 146), RGB(255, 255, 255),
BF
Line (8, 160)-Step(600, 146), , B
For i = 1 To 23
If tretf(i) > 0 Then
anch = Int(2 * wvenf(i))
For k2 = -2 * anch To 2 * anch
incr2 = 5 * areaf(i) * Exp(-(k2 ^ 2) / anch)
tr = tretf(i) * factaf + factbf
'If k2 = 0 Then Debug.Print i, tr, incr2
If tr + k2 < 600 And tr + k2 > 0 Then
x = Int(tr + k2): y = Int(10 * incr2 + 0.5) / 10
puntof(x) = puntof(x) + y
End If
Next k2
End If
Next i
altmax = 0
For i = 1 To 600

```

```

If puntof(i) > altmax Then altmax = puntof(i)
Next i
facyf = 135 / altmax
For i = 1 To 599
Line (i + 8, 300 - facyf * puntof(i))-(i + 9, 300 -
facyf * puntof(i + 1))
Next i

```

*'Ventanas*

```

grdVentM.Col = 0
For i = 1 To 29
grdVentM.Row = i
grdVentM.Text = "V." + Str$(i)
Next i
grdVentM.Col = 1
For i = 1 To 29
grdVentM.Row = i
grdVentM.Text = Str$(aream(i))
Next i
grdVentF.Col = 0
For i = 1 To 23
grdVentF.Row = i
grdVentF.Text = "V." + Str$(i)
Next i
grdVentF.Col = 1
For i = 1 To 23
grdVentF.Row = i
grdVentF.Text = Str$(areaf(i))
Next i

```

*'Compuestos*

```

grdComp.ColWidth(0) = 700
grdComp.Col = 0
For i = 1 To 16
grdComp.Row = i
grdComp.Text = nom$(i)
Next i
For j = 3 To 7
grdComp.Col = j
For i = 1 To 16
grdComp.Row = i
grdComp.Text = ""
Next i
Next j

```

*'limites*

```

For i = 1 To 16
lmin(i) = 0: lmaxm(i) = 0: lmaxf(i) = 0
Next i
For i = 1 To 16

```

*'limite superior en metil*

```

For j = 1 To 16
ki(j) = 0
Next j
'Hace 0 todos los compuestos menos el que se
busca.
For z = 0 To 100 Step 0.1
ki(i) = z

```

*'LLAMADA A SUBROUTINAS*

```

Call ventcalcm(areacalm(), ki())
vale = 1
For j = 1 To 29
If areacalm(j) > aream(j) Then vale = 0
Next j
If vale = 1 Then lmaxm(i) = z Else z = 100
Next z
lmaxm(i) = Int(100 * lmaxm(i) + 0.5) / 100
If lmaxm(i) = 0 Then lmaxm(i) = 0.1
grdComp.Col = 1: grdComp.Row = i
grdComp.Text = Str$(lmaxm(i))
Next i

```

*'Limite superior en FENIL*

```

For i = 1 To 16
For j = 1 To 16
ki(j) = 0
Next j
'Hace 0 todos los compuestos menos el que se
busca.
For z = 0 To 100 Step 0.1
ki(i) = z

```

Call ventcalcf(areacalf(), ki())

```

vale = 1
For j = 1 To 23
If areacalf(j) > areaf(j) Then vale = 0
Next j
If vale = 1 Then lmaxf(i) = z Else z = 100
Next z
lmaxf(i) = Int(100 * lmaxf(i) + 0.5) / 100
If lmaxf(i) = 0 Then lmaxf(i) = 0.1
grdComp.Col = 2: grdComp.Row = i
grdComp.Text = Str$(lmaxf(i))
Next i

```

For i = 1 To 16

```

If lmaxm(i) < lmaxf(i) Then lmax(i) =
lmaxm(i) Else lmax(i) = lmaxf(i)
If lmax(i) = 0 Then lmax(i) = 0.1
grdComp.Col = 3: grdComp.Row = i
grdComp.Text = Str$(lmax(i))
estep(i) = Int(100 * (lmax(i) / 4) + 0.5) / 100
If estep(i) = 0 Then estep(i) = 0.1
grdComp.Col = 7
grdComp.Text = Str$(estep(i))
Next i

```

*'Leucrosa*

```

lmax(9) = 0.1
'Sacarosa
If aream(1) > areaf(2) Then ki(1) = areaf(2) Else
ki(1) = aream(1)
'atrehalosa
If aream(7) > areaf(7) Then ki(2) = areaf(7) Else
ki(2) = aream(7)

```

```
'abtrehalosa. Se toma de metilsilicona
ki(3) = aream(8)
'Kojibiosa
If aream(19) / 0.8384 < aream(24) / 0.1616 Then
kojim = aream(19) / 0.8384 Else kojim = aream(24)
/ 0.1616 ' kojib
kojif = areaf(15) / 0.2062
If kojim > kojif Then ki(11) = kojif Else ki(11) =
kojim
```

```
'Grupo palatinosa-gentiobiosa
dife2min = 9999
For palat = lmin(13) To lmax(13) Step 0.1
For genti = lmin(14) To lmax(14) Step 0.1
dife1 = (aream(25) - palat * 0.5192)
dife2 = (aream(26) - genti * 0.1985)
dife3 = aream(23) - 0.4808 * palat - 0.8015 * genti
If dife1 > -0.1 And dife2 > -0.1 And dife3 > -0.2
Then
    difesum = dife1 ^ 2 + dife2 ^ 2 + dife3 ^ 2
    If difesum < dife2min Then dife2min = difesum:
palatg = palat: gentig = genti
End If
Next genti
Next palat
ki(13) = palatg
ki(14) = gentig
'En fenil
If ki(13) > areaf(18) / 0.5202 Then ki(13) =
areaf(18) / 0.5202
If ki(13) > areaf(16) / 0.4798 Then ki(13) =
areaf(16) / 0.4798
If ki(14) > areaf(19) / 0.8099 Then ki(14) =
areaf(19) / 0.8099
```

```
'Grupo melibiosa-isomaltosa
dife2min = 9999
For melib = lmin(16) To lmax(16) Step 0.1
For isoma = lmin(15) To lmax(15) Step 0.1
dife1 = (aream(27) - melib * 0.7957)
dife2 = (aream(28) - isoma * 0.795)
dife3 = aream(29) - 0.2043 * melib - 0.205 * isoma
If dife1 > -0.1 And dife2 > -0.1 And dife3 > -0.2
Then
    difesum = dife1 ^ 2 + dife2 ^ 2 + dife3 ^ 2
    If difesum < dife2min Then dife2min = difesum:
melibg = melib: isomag = isoma
End If
Next isoma
Next melib
ki(15) = isomag
ki(16) = melibg
' En fenil
If ki(15) > areaf(21) / 0.7986 Then ki(15) =
areaf(21) / 0.7986
If ki(15) > areaf(23) / 0.2014 Then ki(15) =
areaf(23) / 0.2014
If ki(16) > areaf(22) / 0.194 Then ki(16) =
areaf(22) / 0.194
```

```
For i = 1 To 16
If ki(i) > lmax(i) Then ki(i) = lmax(i)
Next i

difemin = 999999
este = 4: paso = 0: iteracion = 0
main:
iteracion = iteracion + 1
lblIter = " ITERACION: " + Str$(iteracion)
For i4 = lmin(4) To lmax(4) Step estep(4)
ki(4) = i4

For i5 = lmin(5) To lmax(5) Step estep(5)
ki(5) = i5
For i6 = lmin(6) To lmax(6) Step estep(6)
ki(6) = i6
For i7 = lmin(7) To lmax(7) Step estep(7)
ki(7) = i7
For i8 = lmin(8) To lmax(8) Step estep(8)
ki(8) = i8
ki(9) = i9
ki(9) = 0
For i10 = lmin(10) To lmax(10) Step estep(10)
ki(10) = i10
For i12 = lmin(12) To lmax(12) Step estep(12)
ki(12) = i12
If paso / 100000 = paso \ 100000 Then lblPaso =
" Paso: " + Str$(paso)
If paso / 35000 = paso \ 35000 Then pic.Line (0,
0)-(paso / 35000, 20), RGB(0, 255, 0), BF
Call ventcalcm(areacalm(), ki())
For j = 1 To 29: areacalm(j) = Int(100 *
areacalm(j) + 0.5) / 100
Next j
Call ventcalcf(areacalf(), ki())
For j = 1 To 23: areacalf(j) = Int(100 *
areacalf(j) + 0.5) / 100
Next j
paso = paso + 1
difem = 0: vale = 1
For k = 1 To 29
If aream(k) - areacalm(k) < -0.2 Or areacalm(k)
< 0 Then vale = 0: k = 29 Else difem = difem +
Abs(aream(k) - areacalm(k))
Next k
If vale = 1 Then
dife = 0
For k = 1 To 23
If areaf(k) - areacalf(k) < -0.2 Or areacalf(k) < 0
Then vale = 0: k = 23 Else: difef = difef +
Abs(areaf(k) - areacalf(k))
Next k
End If
DoEvents
dife = difem + difef
If dife < difemin And vale = 1 Then
grdComp.Col = 4
For j = 1 To 16
grdComp.Row = j
ki(j) = Int(100 * ki(j) + 0.5) / 100
```

```

grdComp.Text = Left$(Str$(ki(j)), 6)
grdVentM.Col = 2
grdVentM.Row = j
grdVentM.Text = Left$(Str$(areacalm(j)), 6)
grdVentM.Col = 3
dife1 = Int(1000 * (aream(j) - areacalm(j)) +
0.5) / 1000
grdVentM.Text = Left$(Str$(dife1), 6)
mej(j) = ki(j)
Next j
difemin = dife
lblVal.Caption = " ERROR: " +
Left$(Str$(difemin), 6)
mejor$ = ""
For j = 1 To 16: mejor$ = mejor$ + Str$(ki(j))
kopt(j) = ki(j)
Next j

' Borra todo y pinta punto y punt
'METIL
Line (8, 8)-Step(600, 146), RGB(255, 255, 255),
BF
Line (8, 8)-Step(600, 146), , B
For i = 1 To 599
Line (i + 8, 148 - factym * puntom(i))-(i + 9, 148
- factym * puntom(i + 1))
Next i
For i = 1 To 600: puntm(i) = 0: Next i
For i = 1 To 29
If tretm(i) > 0 Then
anch = Int(2 * wvenm(i))
For k2 = -2 * anch To 2 * anch
incr2 = 5 * areacalm(i) * Exp(-(k2 ^ 2) / anch)
tr = tretm(i) * factam + factbm
'If k2 = 0 Then Debug.Print i, tr, incr2
If tr + k2 < 600 And tr + k2 > 0 Then
x = Int(tr + k2): y = Int(10 * incr2 + 0.5) / 10
puntm(x) = puntm(x) + y
End If
Next k2
End If
Next i
For i = 1 To 599
Line (i + 8, 149 - factym * puntm(i))-(i + 9, 149 -
factym * puntm(i + 1)),
RGB(255, 127, 64)
Next i
For i = 1 To 29
grdVentM.Row = i
grdVentM.Col = 1
grdVentM.Text = Str$(aream(i))
grdVentM.Col = 2
grdVentM.Text = Str$(areacalm(i))
grdVentM.Col = 3
grdVentM.Text = Str$((aream(i)) - areacalm(i))
Next i

grdVentM.Row = 0
grdVentM.Col = 0

```

```

grdVentF.Text = "FenilS"
difem = Int(100 * difem + 0.5) / 100
lblErMe.Caption = Str$(difem)
difemm(zz) = difem

lblPaso = " Paso: " + Str$(paso)

'FENIL
Call ventcalcf(areacalf(), ki())
For j = 1 To 23: areacalf(j) = Int(100 *
areacalf(j) + 0.5) / 100
Next j
Line (8, 160)-Step(600, 146), RGB(255, 255,
255), BF
Line (8, 160)-Step(600, 146), , B
For i = 1 To 599
Line (i + 8, 300 - factyf * puntof(i))-(i + 9,
300 - factyf * puntof(i + 1))
Next i
For i = 1 To 600: puntf(i) = 0: Next i
For i = 1 To 23
If tretf(i) > 0 Then
anch = Int(2 * wvenf(i))
For k2 = -2 * anch To 2 * anch
incr2 = 5 * areacalf(i) * Exp(-(k2 ^ 2) / anch)
tr = tretf(i) * factaf + factbf
'If k2 = 0 Then Debug.Print i, tr, incr2
If tr + k2 < 600 And tr + k2 > 0 Then
x = Int(tr + k2): y = Int(10 * incr2 + 0.5) / 10
puntf(x) = puntf(x) + y
End If
Next k2
End If
Next i
For i = 1 To 599
Line (i + 8, 301 - factyf * puntf(i))-(i + 9, 301
- factyf * puntf(i + 1)),
RGB(255, 127, 64)
Next i
For i = 1 To 23
grdVentF.Row = i
grdVentF.Col = 1
grdVentF.Text = Str$(areaf(i))
grdVentF.Col = 2
grdVentF.Text = Str$(areacalf(i))
grdVentF.Col = 3
diff = areaf(i) - areacalf(i)
diff = Int(100 * diff + 0.5) / 100
grdVentF.Text = Str$(diff)
Next i
grdVentF.Row = 0
grdVentF.Col = 0
grdVentF.Text = "FenilS"
difef = Int(100 * difef + 0.5) / 100
lblErFe.Caption = Str$(difef)
difeff(zz) = difef

```

```

End If
Next i12
Next i10
Next i8
Next i7
Next i6
Next i5
Next i4
Debug.Print iteracion, paso
pic.Line (0, 0)-(100, 20), RGB(255, 255, 255), BF
oldmin = difemin
For j = 1 To 16
lmin(j) = Int(100 * lmin(j) + 0.5) / 100
lmax(j) = Int(100 * lmax(j) + 0.5) / 100
Next j
fin = 1
For z = 1 To 16
lmin(z) = kopt(z) - estep(z)
If lmin(z) < 0 Then lmin(z) = 0
lmax(z) = kopt(z) + 2 * estep(z)
If lmax(z) > 100 Then lmax(z) = 100
estep(z) = estep(z) / 2
estep(z) = Int(100 * estep(z) + 0.5) / 100
If estep(z) < 0.01 Then estep(z) = 0.01
If estep(z) > 0.1 Then fin = 0
grdComp.Row = z
grdComp.Col = 5
grdComp.Text = Left$(Str$(lmin(z)), 6)
grdComp.Col = 6
grdComp.Text = Left$(Str$(lmax(z)), 6)
grdComp.Col = 7
grdComp.Text = Left$(Str$(estep(z)), 7)
Next z
If fin = 1 Then
suma = 0
For j = 1 To 8
suma = suma + kopt(j)
Next j
End If
If fin = 0 Then GoTo main
For j = 1 To 29: grdVentM.Col = 3:
grdVentM.Row = j: resim(z, j) =
Val(grdVentM.Text): Next j
For j = 1 To 23: grdVentF.Col = 3: grdVentF.Row
= j: resif(z, j) = Val(grdVentF.Text): Next j
For j = 1 To 16: grdComp.Col = 4: grdComp.Row
= j: composic(z, j) = Val(grdComp.Text): Next j
For j = 1 To 29: Debug.Print resim(z, j);: Next j:
Debug.Print
For j = 1 To 23: Debug.Print resif(z, j);: Next j:
Debug.Print
For j = 1 To 16: Debug.Print composic(z, j);: Next
j: Debug.Print
Next zz
Print #2, "", Chr$(9);
For j = 1 To 29: Print #2, j, Chr$(9);: Next j: Print
#2, Chr$(13)
Print #3, "", Chr$(9);

```

```

For j = 1 To 23: Print #3, j, Chr$(9);: Next j:
Print #3, Chr$(13)
Print #4, "", Chr$(9);
For j = 1 To 16: Print #4, nom$(j), Chr$(9);:
Next j: Print #4, Chr$(13)
For zz = 1 To nmuestras
Print #2, zz, Chr$(9);: Print #3, zz, Chr$(9);:
Print #4, zz, Chr$(9);
For j = 1 To 29: Print #2, resim(zz, j), Chr$(9);:
Next j: Print #2, difemm(zz), Chr$(10)
For j = 1 To 23: Print #3, resif(zz, j), Chr$(9);:
Next j: Print #3, difeff(zz), Chr$(10)
For j = 1 To 16: Print #4, composic(zz, j),
Chr$(9);: Next j: Print #4, Chr$(10)
Next zz
Close
Stop
End Sub

```

### *'ESTIMACION VENTANAS MESI*

```

Sub ventcalcm(ventana(), compuesto())
ventana(1) = compuesto(1)
ventana(2) = 0
ventana(3) = 0
ventana(4) = 0
ventana(5) = 0
ventana(6) = 0
ventana(7) = compuesto(2)
ventana(8) = compuesto(3)
ventana(9) = 0
ventana(10) = 0
ventana(11) = 0
ventana(12) = 0.8262 * compuesto(4)
ventana(13) = 0
ventana(14) = 0.1738 * compuesto(4) + 0.8218
* compuesto(5) + 0.4522 * compuesto(6)
ventana(15) = 0.5478 * compuesto(6)
ventana(16) = 0.8092 * compuesto(7) + 0.4252
* compuesto(9)
ventana(17) = 0.5104 * compuesto(8) + 0.5748
* compuesto(9)
ventana(18) = 0.1782 * compuesto(5) + 0.4896
* compuesto(8) + 0.7354 * compuesto(10)
ventana(19) = 0.8384 * compuesto(11)
ventana(20) = 0.2646 * compuesto(10) + 0.46 *
compuesto(12)
ventana(21) = 0.1908 * compuesto(7) + 0.54 *
compuesto(12)
ventana(22) = 0
ventana(23) = 0.4808 * compuesto(13) + 0.8015
* compuesto(14)
ventana(24) = 0.1616 * compuesto(11)
ventana(25) = 0.5192 * compuesto(13)
ventana(26) = 0.1985 * compuesto(14)
ventana(27) = 0.795 * compuesto(16)
ventana(28) = 0.7957 * compuesto(15)
ventana(29) = 0.205 * compuesto(16) + 0.2043
* compuesto(15)
For i = 1 To 29

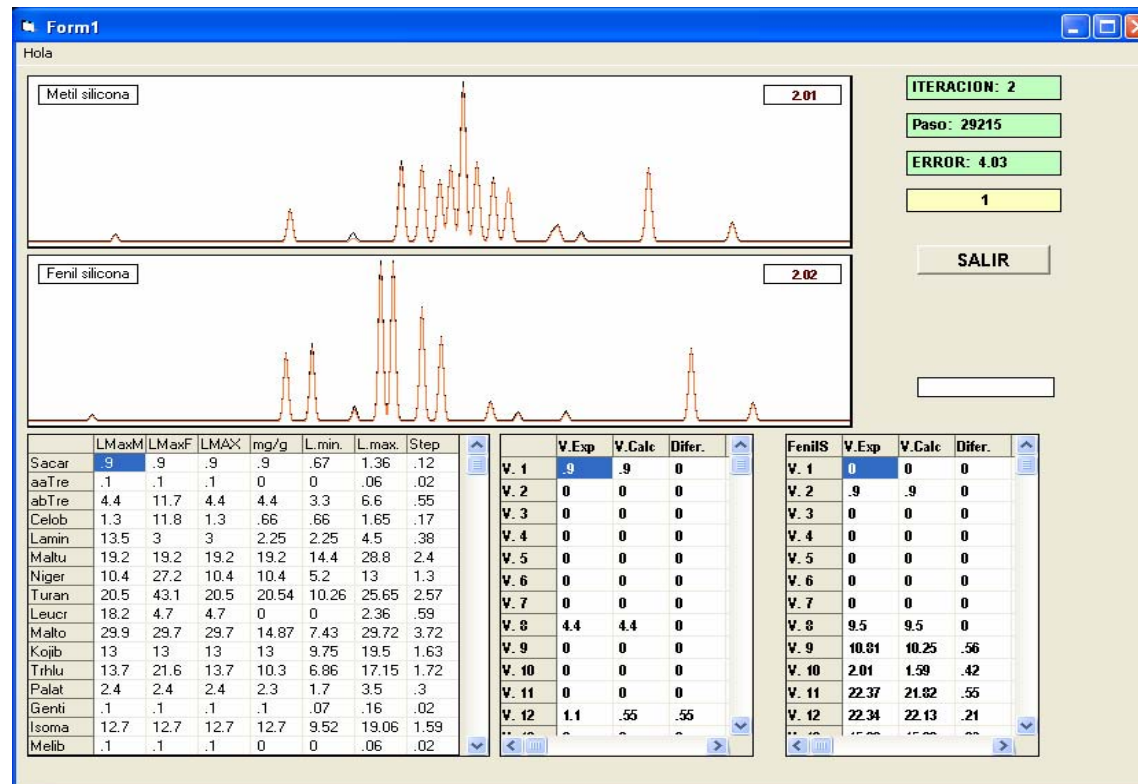
```



```
ventana(i) = Int(100 * ventana(i) + 0.5) / 100
Next i
End Sub
```

*ESTIMACION VENTANAS FESI*

```
Sub ventacalc(ventana(), compuesto())
For i = 1 To 23: ventana(i) = 0: Next i
ventana(1) = 0
ventana(2) = compuesto(1)
ventana(3) = 0
ventana(4) = 0
ventana(5) = 0
ventana(6) = 0
ventana(7) = compuesto(2)
ventana(8) = 0.4946 * compuesto(6)
ventana(9) = 0.8295 * compuesto(4) + 0.5054 *
compuesto(6)
ventana(10) = 0
ventana(11) = 0.1705 * compuesto(4) + 0.4266 *
compuesto(9) + 0.5183 * compuesto(8) + 0.5734 *
compuesto(9) + 0.7514 * compuesto(10) +
compuesto(3)
ventana(12) = 0.6548 * compuesto(5) + 0.8212 *
compuesto(7) + 0.4817 * compuesto(8) + 0.2486 *
compuesto(10)
ventana(13) = 0.1788 * compuesto(7) + 0.3452 *
compuesto(5) + 0.7938 * compuesto(11) + 0.46 *
compuesto(12)
ventana(14) = 0.54 * compuesto(12)
ventana(15) = 0.2062 * compuesto(11)
ventana(16) = 0.4798 * compuesto(13)
ventana(17) = 0
ventana(18) = 0.5202 * compuesto(13)
ventana(19) = 0.8099 * compuesto(14)
ventana(20) = 0.806 * compuesto(16) + 0.1901 *
compuesto(14)
ventana(21) = 0.7986 * compuesto(15)
ventana(22) = 0.194 * compuesto(16)
ventana(23) = 0.2014 * compuesto(15)
For i = 1 To 23
ventana(i) = Int(100 * ventana(i) + 0.5) / 100
Next i
End Sub
```



**Figura 1.** Imagen del programa de Visual Basic que lleva a cabo el proceso iterativo. En la parte superior figuran las representaciones gráficas de los cromatogramas en Metilsilicona y Fenilsilicona. La ventana inferior izquierda muestra los valores mínimo y máximo que puede presentar cada disacárido, y el valor asignado en cada iteración. Las ventanas de la derecha muestran la concentración total de disacáridos en cada ventana de Metilsilicona (centro) y Fenilsilicona (derecha), con su valor experimental, el calculado por el método y la diferencia de ambos. La concentración final estimada para cada disacárido será aquella que haga mínima la diferencia entre los valores experimental y calculado de las ventanas, con la condición de que  $V_{exp} - V_{calc} > 0$ .

## ANEXO II (CAPÍTULO 2)

**Tabla 1.** Valores de integración en mg/g de las ventanas de disacáridos en columna de MeSi

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	7.0	7.4	8.7	10.2	18.6	15.6	13.7	13.5	0.0	1.7	2.9	1.6	0.0	0.0	19.2	5.2
2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.1	4.2	0.3	1.5	0.0	0.6	0.3	7.0	7.4	8.4	10.2	18.8	16.1	14.1	13.3	0.0	1.6	2.8	1.7	0.0	0.0	18.3	4.9
3	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	0.6	2.1	0.0	0.8	0.5	8.4	8.6	9.4	10.5	22.5	17.2	10.9	9.3	0.0	1.4	3.0	1.4	0.0	0.0	14.5	3.6
4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.9	0.8	0.0	3.0	0.6	1.5	0.0	0.7	0.4	4.7	4.7	6.5	7.2	12.8	10.7	6.1	5.9	0.0	0.8	1.9	0.4	0.0	0.0	9.6	2.2
5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.3	0.0	3.1	0.6	1.5	0.0	0.7	0.5	5.2	5.5	6.4	7.1	10.7	10.1	5.8	6.0	0.0	0.9	1.7	0.8	0.0	0.0	9.6	2.3
6	2.1	0.0	0.0	0.0	2.3	0.6	1.2	2.6	1.7	2.2	0.0	1.3	0.6	3.7	6.3	6.8	8.1	14.5	15.9	9.5	5.7	2.3	0.9	2.2	1.3	0.0	0.0	6.0	1.5
7	7.1	0.0	0.0	0.0	4.0	3.6	0.0	4.2	1.4	2.2	0.0	0.8	0.6	10.5	10.6	9.7	12.5	22.1	14.4	10.0	8.8	0.0	1.5	2.2	1.6	0.0	0.0	12.2	3.0
8	0.7	0.0	0.0	0.0	0.8	0.5	0.0	3.9	0.6	2.6	0.0	1.1	0.8	13.3	14.4	9.5	11.3	19.2	14.6	9.4	9.1	0.0	1.9	2.5	1.9	0.0	0.0	15.1	3.7
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	1.1	4.4	0.0	0.7	0.8	7.7	7.6	7.8	9.3	14.1	12.3	5.4	5.5	0.4	1.0	2.0	0.8	0.0	0.0	6.7	1.6
10	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	1.0	2.8	0.0	0.7	0.7	6.4	5.8	7.0	7.9	19.3	11.8	7.0	4.4	0.0	0.9	1.9	0.7	0.0	0.0	5.6	1.3
11	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.9	2.3	0.0	0.6	0.5	6.0	5.5	6.8	8.6	20.9	11.7	7.2	4.2	0.0	0.9	1.9	0.6	0.0	0.0	4.8	1.1
12	23.1	0.0	0.0	0.0	1.2	0.7	0.0	3.0	0.9	2.3	0.0	0.9	0.5	5.5	4.9	7.6	7.5	19.7	10.9	6.9	4.4	0.0	0.9	1.8	0.6	0.0	0.0	5.4	1.4
13	2.2	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	4.6	0.9	1.9	0.0	1.0	0.5	11.5	12.1	10.5	12.6	19.3	15.4	9.0	9.3	0.0	2.0	2.3	0.0	0.0	0.0	11.7	3.5
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	2.6	5.1	0.0	1.6	0.0	0.8	0.5	14.1	15.7	10.1	12.6	20.9	18.6	10.5	10.4	0.0	2.0	2.9	2.0	0.0	0.0	17.9	4.4
15	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4	0.9	2.0	0.0	0.9	0.5	9.4	9.5	9.0	12.7	25.5	18.9	8.9	6.5	0.3	1.1	3.4	1.1	0.0	0.0	7.8	2.1
16	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	1.4	3.4	0.0	1.1	0.6	8.4	7.6	8.7	12.0	28.1	16.0	9.9	5.9	0.6	1.1	3.0	0.8	0.0	0.0	5.5	1.5
17	5.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	1.3	2.9	0.0	1.0	0.5	9.3	8.7	8.9	10.7	22.1	12.9	8.3	6.5	0.5	1.3	2.3	1.0	0.0	0.0	6.9	2.0
18	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	1.2	2.4	0.0	0.8	0.4	6.1	6.0	7.2	8.7	14.7	10.3	4.6	4.4	0.1	0.6	2.0	0.6	0.0	0.0	4.2	1.1
19	13.9	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.3	4.8	1.0	2.1	0.0	1.0	0.4	10.5	10.7	9.6	12.6	28.3	17.4	11.0	8.1	0.3	1.5	3.0	1.5	0.0	0.0	11.1	2.8
20	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	1.1	3.9	0.0	0.0	0.0	9.8	8.8	8.2	12.6	19.1	12.5	7.6	6.7	0.5	1.1	2.1	1.1	0.0	0.0	6.8	1.7
21	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.7	1.4	0.0	0.6	0.3	8.0	8.7	7.9	10.3	14.3	11.7	5.3	5.7	0.1	0.8	2.0	1.1	0.0	0.0	7.3	1.8
22	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	2.6	0.8	2.5	0.0	0.6	0.5	4.4	4.0	4.7	6.2	14.7	8.9	4.7	3.0	0.0	0.0	1.6	1.7	0.0	0.0	2.8	0.7
23	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.5	2.7	2.5	0.4	0.0	1.9	0.9	12.0	13.4	7.1	10.0	15.2	11.0	8.7	8.4	1.3	2.6	1.5	1.5	0.0	0.0	10.5	2.9
24	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	2.0	0.0	0.9	0.5	9.0	10.1	7.2	8.9	13.9	10.8	5.9	5.9	0.4	1.3	1.7	1.0	0.0	0.0	7.8	1.9
25	0.7	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	2.7	0.0	3.1	0.0	1.8	1.0	7.7	8.3	7.6	7.6	12.9	10.6	4.8	4.8	0.2	0.9	2.0	0.8	0.0	0.0	5.7	1.7
26	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	1.1	2.1	0.0	1.1	0.4	5.4	5.2	7.1	7.2	12.4	9.6	4.9	5.6	0.0	0.8	1.9	0.7	0.0	0.0	5.3	1.3
27	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	1.0	1.8	0.0	0.9	0.5	5.7	5.8	7.6	8.3	12.7	9.7	4.8	5.3	0.0	0.7	1.9	0.8	0.0	0.0	5.7	1.3
28	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.8	1.6	0.0	0.9	0.4	6.8	6.6	8.5	9.0	15.1	12.4	5.5	5.2	0.6	0.6	2.4	0.8	0.0	0.0	6.4	1.6
29	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	1.2	2.0	0.0	0.8	0.4	6.5	6.7	6.5	9.0	12.3	9.1	8.2	8.5	0.1	1.1	1.9	1.5	0.0	0.0	12.9	3.3
30	3.3	0.0	0.0	0.0	3.3	2.9	0.0	4.6	0.7	4.9	0.0	2.5	1.5	6.9	7.1	9.3	8.2	17.5	14.4	7.2	6.7	0.0	1.1	2.4	1.2	0.0	0.0	8.7	2.2
31	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	3.8	0.0	2.6	0.0	1.3	0.8	13.2	14.9	8.5	11.7	17.4	13.9	9.1	9.9	0.3	1.8	2.1	2.5	0.0	0.0	15.0	4.0
32	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	2.2	0.0	1.3	0.6	12.2	14.0	9.2	11.3	17.1	12.7	8.6	9.7	0.0	1.7	1.9	1.9	0.0	0.0	13.8	3.5
33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	3.6	0.0	1.8	1.0	13.9	15.1	9.5	12.1	18.2	11.6	10.0	11.3	0.0	2.1	1.7	2.2	0.0	0.0	14.7	3.7
34	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	1.0	0.0	0.6	0.4	13.8	15.2	8.4	10.3	14.4	11.4	7.0	8.0	0.4	1.2	1.9	1.5	0.0	0.0	12.0	3.0
35	0.6	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	4.4	0.3	1.7	0.0	0.7	0.4	11.3	12.1	10.3	11.8	16.1	14.2	7.0	8.4	0.3	1.4	2.4	1.5	0.0	0.0	12.8	3.2
36	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7	0.5	2.8	0.0	1.3	0.7	15.5	16.8	13.0	15.1	22.5	20.1	10.1	11.4	0.0	1.5	3.5	3.5	0.0	0.0	19.0	4.6
37	14.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.8	0.8	1.6	0.0	0.8	0.4	10.7	10.7	11.0	13.7	25.0	18.5	9.0	8.2	0.0	1.1	3.2	1.7	0.0	0.0	12.1	2.9
38	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	1.4	2.0	0.0	0.4	0.2	12.5	12.9	10.6	14.1	18.5	14.2	8.7	10.4	0.4	1.9	2.2	1.7	0.0	0.0	13.6	3.3
39	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.2	1.0	3.3	0.0	0.9	0.7	12.3	12.8	11.8	14.2	19.1	17.2	10.4	11.9	0.0	1.9	3.2	1.9	0.0	0.0	16.8	4.2
40	13.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	1.2	2.1	0.0	1.0	0.4	10.3	9.8	11.1	13.2	30.1	18.4	11.3	8.8	0.4	1.5	3.5	1.6	0.0	0.0	13.6	3.3
41	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.5	1.0	0.0	0.6	0.2	6.0	6.2	6.5	9.4	14.0	9.2	4.8	5.0	0.0	0.7	1.8	0.9	0.0	0.0	5.9	1.3
42	3.2	0.0	0.0	0.0	0.9	0.5	0.0	2.7	0.5	1.0	0.0	0.5	0.2	5.6	5.9	6.6	8.5	12.4	9.3	4.4	4.8	0.0	0.6	1.8	0.9	0.0	0.0	5.8	1.3
43	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.5	1.0	0.0	0.6	0.2	5.9	6.1	6.5	8.9	13.8	9.6	5.0	4.9	0.0	0.6	2.0	0.9	0.0	0.0	5.6	1.3
44	4.2	0.0	0.0	0.0	1.8	1.5	0.0	4.1	1.3	2.3	0.0	0.9	0.4	6.3	4.8	10.2	6.7	24.2	15.7	8.4	5.6	0.5	1.1	3.2	0.8	0.0	0.0	7.2	1.7
45	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	0.4	1.3	0.0	0.7	0.3	6.6	6.7	8.1	8.7	18.1	13.9	6.5	5.3	0.0	0.8	2.7	0.9	0.0	0.0	7.4	1.9
46	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	0.9	2.3	0.0	1.0	0.4	9.4	8.8	8.6	9.1	20.6	14.8	8.2	6.8	0.0	1.0	3.0	1.1	0.0	0.0	9.8	2.4
47	24.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.8	1.4	0.0	0.7	0.3	5.4	4.4	4.9	6.6	18.7	8.5	6.9	4.1	0.0	0.7	1.9	0.4	0.0	0.0	4.8	1.2
48	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	1.1	1.8	0.0	0.8	0.3	8.9	8.1	9.7	9.7	23.8	17.0	9.0	7.1	0.5	1.3	3.5	1.1	0.0	0.0	11.1	2.8



Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
99	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	1.3	2.8	0.0	0.9	0.7	9.9	9.2	11.1	10.9	27.1	18.6	10.4	7.2	0.5	1.7	3.8	1.3	0.0	0.0	10.1	2.7
100	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	1.5	2.9	0.0	0.8	0.8	9.0	7.6	10.1	8.8	22.2	15.9	8.5	6.2	0.6	1.4	2.9	0.9	0.0	0.0	8.6	2.0
101	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.9	1.1	3.2	0.0	1.1	0.7	9.8	9.2	10.8	10.5	25.2	18.8	9.6	7.5	0.4	1.4	3.5	1.5	0.0	0.0	10.1	2.8
102	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	1.4	3.0	0.0	1.1	0.5	8.1	7.3	9.2	9.2	21.4	14.1	7.5	5.6	0.3	1.1	2.6	1.1	0.0	0.0	7.1	1.8
103	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5	0.0	3.1	0.0	1.6	0.9	10.6	11.4	10.7	11.0	21.9	17.2	8.5	7.6	0.2	1.3	3.2	1.7	0.0	0.0	12.4	3.2
104	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.5	2.1	0.0	0.8	0.5	5.8	5.8	9.0	7.9	21.0	14.6	11.1	9.2	0.3	1.3	2.7	1.5	0.0	0.0	14.8	3.7

**Tabla 2.** Valores de integración en mg/g de las ventanas de disacáridos en columna de FeSi

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0.0	0.5	0.2	0.9	1.2	0.2	0.8	7.5	8.9	1.3	25.7	19.4	30.5	20.4	3.4	1.9	0.5	2.1	0.2	0.0	23.0	0.0	5.9
2	0.0	0.4	0.1	0.7	1.3	0.1	0.6	6.1	7.3	1.0	20.9	15.6	24.5	16.5	2.7	1.6	0.5	1.7	0.2	0.0	17.7	0.0	4.7
3	0.0	1.8	0.2	0.9	1.6	0.2	0.7	6.7	8.5	1.4	25.9	17.7	22.7	13.4	3.1	1.3	0.6	1.3	0.2	0.0	13.7	0.0	3.5
4	0.0	0.7	0.0	1.2	1.2	1.3	0.8	3.6	4.4	0.9	10.1	12.3	12.6	8.6	1.7	0.6	0.2	0.6	0.1	0.1	7.2	0.0	1.9
5	0.0	0.2	0.0	1.1	2.9	0.6	0.8	4.6	5.6	1.1	9.6	13.0	13.4	9.6	1.9	0.9	0.4	0.8	0.1	0.2	8.3	0.0	2.4
6	0.0	3.5	0.0	1.6	2.7	0.8	2.1	4.7	5.7	1.4	14.5	17.9	13.2	8.4	1.8	1.1	0.2	0.6	0.3	0.1	4.8	0.0	1.3
7	0.0	6.0	0.0	3.3	5.3	1.1	1.7	8.3	10.5	1.8	20.3	19.9	17.6	13.0	2.0	1.5	0.0	1.3	0.3	0.0	9.0	0.0	3.0
8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	2.9	0.8	10.1	13.3	1.2	20.7	16.4	16.8	11.3	1.7	1.4	0.0	1.1	0.0	0.0	11.5	0.0	3.3
9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	2.5	0.8	5.5	7.1	0.0	17.6	12.4	15.4	8.2	0.9	1.3	0.0	0.5	0.0	0.0	2.9	0.0	3.7
10	0.0	1.9	0.0	1.3	2.6	0.8	1.4	4.6	5.8	1.2	20.2	13.0	13.6	7.7	1.0	1.6	0.0	0.4	0.0	0.0	4.7	0.0	1.4
11	0.0	2.2	0.0	0.0	1.3	2.9	1.0	4.3	5.7	1.0	20.2	16.3	13.9	8.5	2.0	1.0	0.0	0.8	0.0	0.0	4.1	0.0	1.2
12	0.0	22.0	0.0	0.0	1.2	3.7	1.2	3.4	4.8	0.9	13.5	15.5	11.8	7.7	1.8	1.1	0.0	0.5	0.0	0.0	3.8	0.0	1.1
13	0.0	2.0	0.0	0.0	1.4	3.4	1.1	8.8	11.5	0.0	22.2	17.5	15.9	8.2	1.9	0.9	0.0	1.5	0.0	0.0	12.0	0.0	3.2
14	0.0	0.6	0.1	0.5	1.3	0.1	3.0	12.8	15.0	2.6	23.7	21.1	22.9	15.2	3.6	1.9	0.8	1.8	0.6	0.2	17.7	0.0	4.7
15	0.0	0.8	0.2	1.1	1.6	0.3	0.8	7.7	9.0	1.1	28.8	20.1	21.9	11.0	3.3	1.1	0.4	1.0	0.3	0.0	7.2	0.0	1.9
16	0.0	2.0	0.3	2.1	3.2	0.7	1.2	6.2	8.1	2.7	33.2	18.5	19.9	10.2	3.5	1.1	0.7	0.9	0.6	0.1	5.9	0.0	1.6
17	0.0	5.1	0.2	1.5	2.4	0.4	1.1	7.2	9.2	2.5	22.7	17.3	17.0	9.6	2.7	1.1	0.7	1.0	0.6	0.1	7.1	0.0	1.9
18	0.0	2.1	0.2	1.1	1.7	0.3	0.7	4.1	5.2	1.4	13.7	12.3	11.6	5.8	1.8	0.5	0.3	0.5	0.2	0.0	3.4	0.0	1.0
19	0.0	14.5	0.2	2.0	1.9	0.5	0.9	9.5	11.4	1.7	35.9	22.8	23.0	13.4	3.5	1.5	0.5	1.4	0.5	0.1	11.6	0.0	3.3
20	0.0	1.0	0.4	2.8	3.6	0.9	1.1	7.3	9.0	3.0	20.1	18.5	16.6	9.5	2.5	1.1	0.6	1.1	0.5	0.1	6.9	0.0	1.9
21	0.0	0.9	0.1	0.9	1.3	0.2	0.6	7.6	9.1	1.4	17.4	17.1	16.2	9.7	2.4	0.9	0.5	0.9	0.2	0.0	7.9	0.0	2.2
22	0.0	2.3	0.2	1.3	2.6	0.3	0.9	3.6	4.9	1.4	16.4	10.8	11.9	5.8	1.8	0.4	0.1	0.4	0.2	0.0	2.9	0.0	0.8
23	0.0	0.6	0.2	0.4	2.2	0.2	2.0	10.2	13.7	1.8	17.0	15.6	15.5	10.5	3.0	1.9	1.4	1.4	1.4	0.3	10.5	0.0	2.8
24	0.0	0.4	0.2	0.4	2.0	0.3	1.2	8.4	10.4	1.6	15.9	15.3	14.6	9.2	2.6	1.3	0.8	1.0	0.7	0.0	8.2	0.0	2.9
25	0.0	1.0	0.4	0.6	3.2	0.4	1.8	6.9	9.1	1.1	14.3	13.9	14.0	7.8	2.1	0.9	0.4	0.7	0.4	0.5	5.9	0.0	1.7
26	0.0	13.7	0.0	3.0	4.5	0.0	6.7	5.5	5.4	16.2	13.1	23.6	19.1	12.5	8.0	1.9	0.0	1.1	0.6	0.0	8.4	0.0	2.6
27	0.0	4.4	0.0	2.2	4.3	0.0	1.8	14.0	15.3	2.8	25.7	24.7	23.4	15.2	3.1	1.7	0.0	1.6	0.4	0.4	11.2	0.0	3.7
28	0.0	1.2	0.0	0.0	2.2	0.0	1.0	11.8	15.2	2.8	18.1	18.2	17.8	12.5	2.8	1.9	0.0	1.8	0.0	0.0	13.1	0.0	3.6
29	0.0	0.8	0.0	0.0	1.8	0.0	0.8	10.4	13.3	2.0	16.5	17.7	16.4	11.4	1.8	1.5	0.0	1.5	0.2	0.0	11.7	0.0	3.2
30	0.0	2.0	0.0	1.7	4.9	0.0	1.9	4.3	5.5	0.9	11.9	11.0	11.9	6.7	1.4	0.6	0.0	0.3	0.6	0.2	4.8	0.0	1.5
31	0.0	1.1	0.0	0.0	2.0	0.2	0.9	11.3	14.2	2.5	17.5	17.5	13.9	9.1	7.1	2.0	0.0	1.6	0.9	0.0	12.3	0.0	3.3
32	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.8	10.3	12.8	2.0	16.4	17.6	16.3	11.2	1.8	1.5	0.0	1.4	0.2	0.0	11.6	0.0	3.1
33	0.0	0.5	0.0	0.0	3.7	0.0	1.5	11.2	13.8	1.8	18.1	18.3	17.4	12.2	1.5	1.6	0.0	1.6	0.4	0.1	11.8	0.0	3.2
34	0.0	0.5	0.0	1.0	1.4	0.2	0.6	11.2	13.6	1.8	14.1	15.6	13.0	8.9	2.0	1.3	0.0	1.1	0.2	0.0	9.5	0.0	2.7
35	0.0	0.5	0.0	0.7	1.4	0.0	0.7	8.9	11.4	1.4	12.7	21.3	15.8	11.5	2.6	1.3	0.0	1.2	0.2	0.0	10.1	0.0	2.7
36	0.0	0.2	0.0	0.7	1.9	0.0	1.0	12.3	14.8	2.2	21.1	22.8	18.6	9.9	8.0	2.1	0.6	1.3	0.4	0.0	14.6	0.0	3.7
37	0.0	12.9	0.0	1.3	1.4	0.2	0.6	8.4	9.7	2.0	24.5	21.1	19.5	11.0	2.5	1.1	0.0	1.2	0.1	0.0	9.3	0.0	2.5
38	0.0	0.9	0.0	2.5	3.1	0.5	0.8	10.8	12.9	2.5	20.9	21.7	19.0	13.5	2.0	1.7	0.0	1.7	0.5	0.0	12.1	0.0	3.2
39	0.0	0.3	0.0	1.0	3.4	0.0	1.1	10.2	12.7	2.1	22.0	20.0	22.3	14.9	2.5	1.6	0.0	1.6	0.2	0.0	14.3	0.0	3.7
40	0.0	11.3	0.0	1.7	2.5	0.5	0.8	7.1	8.5	2.1	27.9	22.2	20.0	11.8	3.0	1.2	0.5	1.3	0.4	0.0	10.7	0.0	2.7
41	0.0	5.9	0.0	1.1	1.7	0.0	0.4	4.8	5.8	1.0	14.5	13.2	11.0	6.4	1.3	0.6	0.0	0.7	0.1	0.0	4.6	0.0	1.3
42	0.0	2.8	0.0	1.3	2.1	0.0	0.4	4.7	5.6	1.0	13.2	12.8	11.0	6.5	1.4	0.6	0.0	0.7	0.0	0.0	4.8	0.0	1.3
43	0.0	5.2	0.0	0.8	1.3	0.0	0.4	4.6	5.5	1.0	13.4	13.1	10.9	6.1	1.4	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	4.4	0.0	1.2
44	0.0	3.3	0.0	2.1	3.2	0.0	0.8	3.4	4.1	1.5	19.9	16.6	14.8	7.6	2.2	0.6	0.2	0.6	0.4	0.0	5.2	0.0	1.4
45	0.0	1.8	0.0	0.0	0.9	0.0	0.6	5.1	6.1	1.1	17.3	15.1	14.8	7.8	2.0	0.7	0.0	0.8	0.3	0.0	5.9	0.0	1.5
46	0.0	1.4	0.0	0.0	1.9	0.0	0.8	6.5	8.2	1.6	17.9	15.9	15.3	8.5	1.9	0.8	0.0	0.8	0.3	0.0	7.3	0.0	2.0
47	0.0	22.8	0.0	1.2	1.9	0.0	0.8	3.9	4.9	1.4	18.2	13.3	10.2	5.7	1.5	0.6	0.1	0.6	0.3	0.0	4.1	0.0	1.2
48	0.0	3.0	0.0	2.0	2.6	0.0	0.9	6.7	8.3	2.2	24.4	19.0	18.8	10.6	3.2	1.2	0.6	1.1	0.6	0.0	9.5	0.0	2.7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
49	0.0	0.3	0.0	2.6	4.3	0.0	1.1	11.1	13.3	2.4	22.1	23.5	22.4	15.9	3.1	1.7	0.7	1.8	0.6	0.0	15.9	0.0	4.6
50	0.0	3.0	0.0	1.8	2.1	0.0	1.2	5.6	5.9	1.5	19.3	18.1	16.4	9.0	2.6	0.7	0.5	0.7	0.4	0.2	5.9	0.0	1.8
51	0.0	50.3	0.0	1.0	1.3	0.0	0.4	5.7	6.9	1.3	24.5	16.7	13.9	8.1	1.8	0.9	0.0	0.9	0.0	0.0	6.1	0.0	1.7
52	0.0	1.9	0.0	3.4	2.7	0.8	0.8	7.5	10.1	2.8	23.2	21.8	18.6	11.0	3.3	1.0	0.7	0.8	0.7	0.2	6.5	0.0	1.7
53	0.0	1.2	0.0	3.6	4.4	0.0	1.5	12.6	15.2	4.1	22.8	21.7	20.6	14.4	2.9	2.0	0.9	1.8	0.9	0.2	13.7	0.0	3.7
54	0.0	1.2	0.0	0.0	3.1	0.0	0.6	11.7	12.6	2.7	22.9	19.3	17.4	12.6	2.7	2.0	0.8	2.0	0.8	0.0	11.3	0.0	3.3
55	0.0	0.8	0.0	0.0	2.4	0.0	1.4	15.5	19.3	3.8	26.0	23.4	21.5	16.4	3.1	3.2	0.9	3.1	1.0	0.0	16.7	0.0	4.7
56	0.0	1.0	0.0	0.0	1.9	0.0	4.4	16.5	20.0	3.5	25.8	22.9	27.5	20.6	3.8	4.2	0.0	3.6	0.7	0.0	26.8	0.0	7.3
57	0.0	8.4	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	7.2	8.7	1.6	28.5	22.9	20.2	10.9	2.9	1.5	0.0	1.5	0.3	0.0	7.9	0.0	2.1
58	0.0	0.4	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	7.8	9.3	1.8	20.7	21.3	22.0	13.3	2.9	1.1	0.0	1.2	0.4	0.0	14.2	0.0	3.8
59	0.0	0.5	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	8.7	10.5	1.9	26.8	25.8	26.0	15.1	4.0	1.2	0.0	1.3	0.4	0.0	12.5	0.0	3.3
60	0.0	1.5	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	9.1	11.7	2.5	24.5	21.6	20.0	11.4	2.6	1.3	0.0	1.2	0.4	0.0	10.2	0.0	2.8
61	0.0	0.4	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	9.3	10.9	1.8	24.5	23.7	26.6	17.7	3.0	1.7	0.0	1.9	0.0	0.0	19.3	0.0	5.1
62	0.0	0.9	0.0	0.0	2.0	0.0	0.5	8.7	10.8	2.2	22.8	20.4	18.5	10.9	2.5	1.3	0.0	1.3	0.5	0.0	9.8	0.0	2.5
63	0.0	1.9	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	11.3	14.2	2.2	14.3	15.7	15.5	11.5	1.8	1.7	0.0	1.8	0.0	0.0	13.3	0.0	3.3
64	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.1	8.0	2.5	22.2	19.2	15.7	9.2	2.6	0.9	0.0	1.1	0.6	0.0	6.6	0.0	1.7
65	0.0	0.3	0.0	0.0	1.5	0.0	1.7	15.9	19.8	3.1	19.2	16.8	19.8	16.5	1.8	3.0	0.0	2.7	1.0	0.0	16.2	0.0	4.4
66	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	11.3	12.8	0.9	29.8	22.0	21.5	5.3	2.6	1.3	0.7	0.9	0.4	0.0	10.8	0.0	2.4
67	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.5	0.9	9.9	11.3	1.6	27.2	21.4	20.5	5.4	2.3	1.6	0.4	1.1	0.5	0.0	9.4	0.0	2.0
68	0.0	34.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	5.7	1.5	28.4	14.2	13.1	2.7	1.4	0.4	0.0	0.5	0.0	0.0	4.6	0.0	1.0
69	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.2	5.9	1.3	31.6	15.7	16.1	2.6	2.0	0.4	0.0	0.5	0.0	0.0	5.4	0.0	1.2
70	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.1	7.1	2.8	16.0	16.1	15.7	3.2	1.9	0.7	0.3	0.6	0.3	0.0	6.2	0.0	1.3
71	0.0	46.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	6.1	0.0	37.3	13.6	14.9	2.7	1.5	0.7	0.0	0.5	0.0	0.0	5.1	0.0	1.1
72	0.0	33.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	5.6	2.5	25.2	12.5	11.1	2.9	1.6	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	4.2	0.0	1.3
73	0.0	1.2	0.0	0.0	0.9	0.0	0.5	9.0	10.4	1.4	29.2	19.1	22.1	3.9	3.2	1.0	0.3	0.8	0.3	0.0	8.0	0.0	1.9
74	0.0	1.2	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	5.7	6.8	3.1	17.0	14.5	16.0	2.9	2.2	0.7	0.2	0.5	0.2	0.0	5.6	0.0	1.4
75	0.0	1.6	0.0	0.0	2.4	0.0	0.6	9.4	11.5	1.8	23.8	18.7	18.0	3.7	2.6	1.2	0.0	0.8	0.0	0.0	9.0	0.0	2.0
76	0.0	1.6	0.0	0.0	2.2	2.1	0.7	9.5	11.5	2.1	24.0	18.7	18.0	3.6	2.7	1.3	0.3	0.8	0.2	0.0	8.4	0.0	2.1
77	0.0	0.8	0.0	0.0	1.0	1.4	0.0	8.5	10.6	0.0	23.2	18.7	18.4	4.1	2.7	1.6	0.3	0.9	0.3	0.0	9.4	0.0	2.2
78	0.0	1.8	0.0	0.0	0.9	1.5	0.0	7.4	9.5	2.5	19.4	17.4	17.2	3.6	2.6	1.5	0.6	0.8	0.3	0.0	8.4	0.0	2.6
79	0.0	2.4	0.0	0.0	1.8	1.9	0.0	7.3	8.6	2.7	22.5	15.0	16.6	3.3	2.4	1.2	0.7	0.0	0.0	0.0	7.2	0.0	1.9
80	0.0	0.5	0.0	0.0	0.9	1.2	0.5	14.2	16.8	2.1	26.8	18.6	20.5	9.4	1.1	2.2	0.5	1.8	0.4	0.0	15.9	0.0	3.8
81	0.0	0.5	0.0	0.0	0.8	1.2	0.5	15.5	18.6	1.6	30.7	20.7	22.3	8.5	3.0	2.3	0.5	2.0	0.4	0.0	18.1	0.0	4.3
82	0.0	12.6	0.0	0.0	0.4	0.9	0.7	8.0	9.5	2.0	25.7	15.4	16.0	4.5	1.7	1.1	0.4	0.9	0.3	0.0	8.2	0.0	1.9
83	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.4	15.5	1.6	29.9	22.0	22.7	7.5	2.7	2.1	0.5	1.6	0.3	0.0	12.7	0.0	2.9
84	0.0	4.6	0.0	0.0	0.3	0.8	0.6	7.1	8.3	0.0	35.9	19.5	21.2	3.8	3.0	0.6	0.6	0.8	0.2	0.0	8.4	0.0	1.9
85	0.0	0.4	0.0	0.0	1.0	1.4	0.7	15.2	17.9	2.2	34.7	27.1	27.3	8.7	3.9	2.0	1.2	1.9	0.4	0.0	15.0	0.0	3.5
86	0.0	0.7	0.0	0.0	1.0	1.0	1.5	10.3	11.9	1.8	26.1	19.6	20.1	5.4	2.8	0.9	0.8	1.1	0.3	0.0	10.0	0.0	2.2
87	0.0	3.4	0.0	0.0	0.9	0.7	0.0	5.2	6.0	2.2	25.2	15.0	16.4	2.8	2.5	0.5	0.5	0.6	0.4	0.0	4.7	0.0	1.1
88	0.0	1.6	0.0	0.0	0.5	1.2	0.7	7.6	8.6	0.0	40.4	19.9	21.7	3.8	3.3	1.3	0.6	0.8	0.4	0.0	6.4	0.0	1.5
89	8.0	0.0	0.0	0.2	0.7	0.5	3.8	4.3	1.7	24.7	11.4	12.3	1.9	1.8	0.4	0.6	0.5	0.3	0.0	3.7	0.0	0.8	0.0
90	1.2	0.0	0.0	1.0	1.2	0.5	13.5	16.3	0.0	34.1	26.4	25.9	6.9	3.5	1.2	0.3	1.3	0.3	0.0	15.0	0.0	3.6	0.0
91	0.6	0.0	0.0	0.5	1.2	0.6	6.5	7.4	1.3	25.3	15.4	18.9	4.1	2.7	1.2	0.3	0.7	0.2	0.0	8.5	0.0	2.0	0.0
92	2.3	0.0	0.0	0.5	1.4	0.8	6.7	7.6	1.6	27.3	17.3	18.7	3.4	2.9	1.1	0.4	0.8	0.3	0.0	7.1	0.0	1.6	0.0
93	0.5	0.0	0.0	0.5	0.8	0.5	13.4	16.3	0.0	26.1	21.9	18.5	8.6	1.6	2.4	0.8	1.8	0.5	0.0	12.2	0.0	2.7	0.0
94	5.9	0.0	0.0	0.8	1.0	0.0	4.0	4.8	2.4	20.2	11.3	12.6	2.3	1.9	0.7	0.2	0.4	0.2	0.0	4.0	0.0	1.0	0.0
95	9.2	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	6.9	7.9	1.5	24.7	21.4	18.5	10.1	2.7	0.9	0.0	1.1	0.0	0.0	8.4	0.0	2.3	0.0
96	0.7	0.0	0.0	0.4	0.9	0.5	9.4	11.1	2.1	29.5	20.9	22.3	4.4	3.3	0.8	0.3	0.9	0.2	0.0	9.2	0.0	2.1	0.0
97	2.5	0.0	0.0	0.3	0.9	0.6	6.7	7.9	1.9	24.2	16.8	16.3	3.5	2.2	0.6	0.4	0.7	0.3	0.0	6.8	0.0	1.6	0.0

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
98	0.0	13.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.9	7.2	0.0	42.2	21.3	30.8	7.4	3.3	1.9	0.9	1.9	0.6	0.0	15.1	0.0	3.4
99	0.0	2.0	0.0	0.0	0.4	1.3	0.9	6.9	8.1	1.8	28.1	19.4	20.0	3.6	3.1	0.7	0.6	0.8	0.5	0.0	7.5	0.0	1.8
100	0.0	1.8	0.0	0.0	0.4	1.5	0.9	6.6	7.6	2.9	25.2	17.7	19.2	3.6	2.9	1.1	0.5	0.8	0.5	0.0	7.1	0.0	1.6
101	0.0	0.7	0.0	0.0	1.1	1.6	0.7	8.0	9.3	2.9	28.8	19.3	21.8	4.3	3.2	1.2	0.4	0.9	0.3	0.0	8.1	0.0	1.9
102	0.0	2.8	0.0	0.0	0.9	1.3	0.7	5.9	6.8	2.5	22.2	15.1	15.8	2.9	2.1	0.8	0.3	0.6	0.3	0.0	5.2	0.0	1.1
103	0.0	0.9	0.0	0.0	1.1	1.3	0.5	10.0	11.9	1.6	27.5	19.7	20.2	4.5	2.9	1.3	0.4	0.9	0.3	0.0	10.5	0.0	2.4
104	0.0	1.2	0.0	0.0	0.6	0.7	0.3	4.0	4.7	2.3	19.5	12.1	16.7	4.8	1.9	0.9	0.3	0.8	0.1	0.0	10.2	0.0	2.3



### ANEXO III (CAPÍTULO 3)

**Tabla 1.** Valores de los residuos (mg/g) de las ventanas en MeSi.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	-0.2	0.2	4.0	1.1	0.0	3.9	0.0	0.4	0.0	0.2	0.6	0.1	0.0	0.0	0.2	0.3
2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.3	1.5	0.0	-0.2	0.3	-0.1	0.1	3.8	0.8	0.0	4.3	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.6	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	2.1	0.0	0.0	0.5	0.0	0.6	4.8	0.0	0.0	4.3	-0.2	0.3	0.0	0.1	0.5	0.1	0.0	0.0	0.4	0.0
4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.9	0.8	0.0	0.1	0.6	1.5	0.0	0.0	0.4	-0.2	0.0	0.4	0.0	1.1	2.4	0.5	-0.2	0.0	0.5	0.3	0.1	0.0	0.0	1.3	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.3	0.0	0.1	0.6	1.5	0.0	0.0	0.5	-0.2	0.2	0.5	0.2	0.9	2.3	0.7	-0.2	0.0	0.2	0.2	0.1	0.0	0.0	1.2	0.1
6	0.1	0.0	0.0	0.0	2.3	0.6	0.1	0.0	1.7	2.2	0.0	0.3	0.6	-0.2	1.9	-0.1	0.0	-0.2	7.6	3.4	-0.2	2.3	0.2	0.6	0.7	0.0	0.0	0.6	0.1
7	0.3	0.0	0.0	0.0	4.0	3.6	0.0	0.1	1.4	2.2	0.0	0.0	0.6	-0.1	0.1	2.4	0.0	-0.1	5.0	0.2	-0.2	0.0	0.1	0.4	0.2	0.0	0.0	2.1	0.4
8	0.7	0.0	0.0	0.0	0.8	0.5	0.0	0.1	0.6	2.6	0.0	0.0	0.8	0.1	0.8	3.2	0.0	0.0	6.3	-0.1	-0.2	0.0	0.7	0.9	0.6	0.0	0.0	1.4	0.2
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	4.4	0.0	0.0	0.8	-0.2	0.5	3.9	0.0	0.1	8.0	-0.2	0.0	0.4	0.5	1.2	0.2	0.0	0.0	3.5	0.8
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.0	2.8	0.0	0.0	0.7	0.0	0.1	4.0	0.0	0.0	7.2	-0.2	0.0	0.0	0.4	1.0	0.2	0.0	0.0	0.6	0.0
11	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.9	2.3	0.0	0.0	0.5	0.2	0.4	2.0	0.1	0.3	3.1	0.0	-0.2	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0
12	0.1	0.0	0.0	0.0	1.2	0.7	0.0	0.1	0.9	2.3	0.0	-0.1	0.5	0.3	0.3	0.0	0.0	4.1	2.5	1.7	-0.2	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	1.0	0.3
13	0.1	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.1	0.9	1.9	0.0	-0.2	0.5	-0.1	0.4	2.9	1.9	-0.2	6.5	2.6	3.7	0.0	1.9	0.6	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.5
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	1.6	0.0	-0.1	0.5	-0.2	2.0	3.3	0.0	0.0	3.7	0.0	-0.1	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.9	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	2.0	0.0	0.0	0.5	0.1	0.2	4.1	0.0	0.0	4.5	-0.1	0.2	0.3	0.0	0.6	0.1	0.0	0.0	0.3	0.1
16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.4	3.4	0.0	-0.1	0.6	-0.2	0.7	7.0	0.0	0.0	1.9	-0.2	0.3	0.6	0.3	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1
17	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.3	2.9	0.0	0.0	0.5	-0.2	0.3	4.7	0.0	0.0	1.7	-0.2	0.3	0.5	0.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3
18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2	2.4	0.0	0.0	0.4	-0.2	0.7	2.9	0.0	0.3	1.7	-0.2	0.2	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
19	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.1	0.1	1.0	2.1	0.0	0.0	0.4	0.0	0.5	5.1	0.0	0.0	3.7	-0.2	0.6	0.3	0.3	0.4	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0
20	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	3.9	0.0	0.0	0.0	-0.2	0.7	3.3	1.0	-0.2	2.5	0.2	0.0	0.5	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.4	0.0
21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.7	1.4	0.0	0.0	0.3	-0.2	0.7	3.0	0.0	-0.1	2.6	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.3	0.0	0.0	0.2	0.0
22	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.1	0.8	2.5	0.0	0.0	0.5	-0.2	0.1	2.8	0.0	0.0	1.7	-0.2	0.3	0.0	-0.1	0.2	1.6	0.0	0.0	0.2	0.0
23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.1	2.5	0.4	0.0	0.0	0.9	-0.1	1.7	1.7	1.0	-0.1	3.2	0.3	-0.1	1.3	1.3	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2
24	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.5	-0.2	1.1	2.8	0.0	-0.1	1.9	-0.1	0.0	0.4	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.4	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.1	0.0	3.1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.7	2.9	0.0	0.0	2.1	-0.2	0.0	0.2	0.2	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2
26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	2.1	0.0	1.0	0.4	0.0	2.1	0.0	2.2	5.0	0.1	4.1	3.8	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.9	0.2
27	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.8	0.0	-0.1	0.5	-0.2	0.0	4.4	0.0	0.1	3.4	-0.2	0.6	0.0	0.0	0.7	0.1	0.0	0.0	0.8	0.0
28	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.6	0.0	0.0	0.4	-0.2	0.0	4.8	0.0	1.7	3.9	0.1	-0.2	0.6	0.0	0.7	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0
29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2	2.0	0.0	0.0	0.4	0.0	-0.2	1.1	0.0	-0.1	2.7	2.0	1.5	0.1	0.0	0.6	0.4	0.0	0.0	2.8	0.7
30	0.1	0.0	0.0	0.0	3.3	2.9	0.0	0.0	0.7	4.9	0.0	0.1	1.5	-0.2	0.1	2.4	0.0	0.0	5.1	-0.2	0.5	0.0	0.6	0.7	0.8	0.0	0.0	1.0	0.2
31	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	-0.1	0.8	-0.1	0.4	1.5	0.1	-0.2	2.8	2.4	3.0	0.3	0.1	0.0	0.7	0.0	0.0	1.0	0.4
32	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	2.2	0.0	-0.2	0.6	0.1	0.5	1.6	0.0	-0.1	4.4	-0.1	0.3	0.0	0.1	0.3	0.3	0.0	0.0	0.4	0.1
33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	1.0	-0.2	0.7	2.0	0.0	0.0	4.4	0.0	0.5	0.0	0.4	0.3	0.4	0.0	0.0	1.3	0.3
34	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	1.0	0.0	-0.1	0.4	-0.2	0.7	1.6	0.0	-0.2	2.3	0.5	0.6	0.4	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	1.2	0.2
35	0.1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.3	1.7	0.0	0.0	0.4	-0.2	0.5	0.0	0.0	1.5	1.9	0.7	-0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	1.1	0.2
36	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	2.8	0.0	0.0	0.7	-0.1	-0.1	1.1	1.4	-0.1	1.8	3.4	4.6	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	1.3	0.0
37	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.8	1.6	0.0	-0.1	0.4	-0.2	0.0	3.0	0.0	0.1	6.7	-0.2	0.2	0.0	0.0	0.9	0.6	0.0	0.0	1.3	0.1
38	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.4	2.0	0.0	-0.2	0.2	-0.1	0.3	3.1	0.1	-0.1	5.9	0.0	0.5	0.4	0.3	0.6	0.1	0.0	0.0	1.2	0.1
39	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.0	3.3	0.0	-0.2	0.7	-0.2	0.0	4.8	0.0	0.0	6.1	-0.1	0.2	0.0	0.2	1.0	0.2	0.0	0.0	1.1	0.2
40	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2	2.1	0.0	-0.1	0.4	-0.2	0.4	3.1	0.0	0.2	4.1	-0.2	0.5	0.4	0.1	0.8	0.2	0.0	0.0	1.1	0.0
41	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	1.0	0.0	0.0	0.2	-0.2	0.2	2.0	0.0	0.0	3.2	-0.2	0.1	0.0	0.0	0.6	0.2	0.0	0.0	0.7	0.0
42	0.1	0.0	0.0	0.0	0.9	0.5	0.0	0.1	0.5	1.0	0.0	0.0	0.2	-0.2	0.1	1.8	0.0	0.0	3.3	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.6	0.3	0.0	0.0	0.6	0.0
43	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.0	0.0	-0.1	0.2	-0.1	0.0	1.4	0.0	-0.1	3.2	0.0	0.1	0.0	0.1	0.8	0.3	0.0	0.0	0.6	0.0
44	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	1.5	0.0	0.0	1.3	2.3	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	4.1	-0.2	0.7	0.5	0.4	1.0	0.1	0.0	0.0	0.6	0.0
45	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.4	1.3	0.0	0.0	0.3	-0.1	0.0	1.7	0.1	0.0	4.5	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.9	0.1	0.0	0.0	0.5	0.1
46	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.9	2.3	0.0	0.0	0.4	-0.2	-0.1	1.1	0.0	0.0	5.1	-0.2	0.0	0.0	0.1	1.1	0.2	0.0	0.0	0.8	0.1
47	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.8	1.4	0.0	-0.2	0.3	0.0	0.0	1.2	0.1	0.0	2.0	-0.1	0.2	0.0	0.4	0.6	0.1	0.0	0.0	0.5	0.1
48	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.8	0.0	-0.2	0.3	-0.2	0.0	3.2	0.0	0.0	3.0	-0.2	0.7	0.5	0.2	0.8	0.1	0.0	0.0	1.0	0.2

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
49	0.1	0.0	0.0	0.0	1.4	1.1	0.0	0.1	1.5	2.7	0.0	0.0	0.5	-0.2	-0.2	2.0	0.0	-0.1	2.9	0.0	0.0	0.3	0.8	0.6	0.1	0.0	0.0	1.5	0.1
50	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.1	0.0	0.0	0.3	0.0	-0.1	1.8	0.0	0.0	4.1	-0.1	0.0	0.6	0.3	0.7	0.2	0.0	0.0	0.8	0.1
51	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	1.7	0.0	0.0	0.3	-0.2	0.0	3.4	0.0	0.0	3.4	-0.2	1.0	0.3	0.1	0.6	0.1	0.0	0.0	0.6	0.0
52	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	2.3	4.0	0.0	0.0	0.6	0.4	0.4	1.9	0.0	-0.2	3.0	0.2	-0.2	0.6	0.8	0.0	0.2	0.0	0.0	0.8	0.1
53	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	2.6	3.6	0.0	-0.1	0.6	-0.1	0.1	3.2	0.1	-0.1	5.7	0.3	0.1	0.8	1.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.9	0.2
54	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.3	2.5	0.0	-0.2	0.5	0.4	-0.2	2.0	0.6	-0.1	2.0	0.0	0.4	1.0	1.5	0.2	0.1	0.0	0.0	2.0	0.2
55	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.5	3.2	0.0	0.0	0.5	-0.2	0.3	1.9	0.3	-0.2	5.1	1.4	-0.2	0.8	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.3
56	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.6	-0.1	0.6	3.1	0.6	-0.2	6.1	1.1	0.6	0.6	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.8
57	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	1.9	0.0	0.0	0.4	-0.2	0.3	1.1	0.0	-0.2	4.8	0.1	0.0	0.4	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	1.5	0.3
58	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.8	0.0	-0.1	0.3	0.0	0.0	1.6	0.0	-0.1	5.4	0.1	-0.2	0.5	0.1	1.5	0.1	0.0	0.0	1.4	0.1
59	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.9	0.0	0.0	0.4	-0.2	0.6	0.4	0.0	-0.1	5.5	0.0	-0.2	0.4	0.2	1.6	0.2	0.0	0.0	1.2	0.3
60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	3.2	0.0	-0.1	0.6	-0.2	0.2	2.0	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0	0.4	0.2	1.2	0.2	0.0	0.0	0.8	0.0
61	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.6	2.0	0.0	-0.1	0.4	-0.1	0.0	1.0	0.9	-0.2	6.4	0.3	-0.2	0.0	0.1	1.3	0.2	0.0	0.0	1.0	0.0
62	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.0	2.7	0.0	0.0	0.5	-0.2	0.3	1.5	0.0	0.0	4.5	-0.2	0.0	0.0	0.1	1.1	0.1	0.0	0.0	0.9	0.0
63	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	1.0	-0.2	0.3	2.2	0.0	0.0	4.3	-0.2	-0.1	0.0	0.7	0.0	0.1	0.0	0.0	0.8	0.0
64	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.7	0.0	-0.2	0.6	1.0	-0.2	-0.1	0.0	-0.2	0.0	0.8	-0.2	0.5	0.7	0.6	0.1	0.0	0.0	4.5	1.0
65	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.6	1.8	0.0	-0.1	0.4	-0.1	0.4	2.3	0.0	0.0	7.5	0.0	0.2	1.5	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.1
66	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.2	1.7	1.3	0.0	9.1	0.0	0.7	0.7	0.9	0.5	1.2	0.0	0.0	4.5	1.1
67	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	3.1	4.5	0.0	-0.2	0.9	0.0	-0.2	3.8	1.4	0.0	7.8	0.0	0.7	1.1	0.8	1.4	0.7	0.0	0.0	2.9	0.7
68	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	2.9	0.0	0.0	0.5	0.0	-0.1	9.1	0.0	0.0	6.5	-0.2	2.3	0.6	0.7	1.4	1.1	0.0	0.0	2.4	0.6
69	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	2.0	2.3	0.0	-0.2	0.5	0.0	-0.2	7.1	1.0	0.0	6.6	0.0	1.9	0.7	0.8	1.3	0.8	0.0	0.0	1.4	0.3
70	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	2.7	0.0	-0.2	0.6	0.0	-0.2	1.6	0.1	-0.1	5.1	0.5	0.0	0.6	0.4	1.1	0.7	0.0	0.0	1.8	0.6
71	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.8	0.0	0.0	0.4	0.7	0.0	11.1	0.0	0.4	7.7	-0.2	3.2	0.4	0.5	1.5	0.7	0.0	0.0	2.3	0.6
72	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.3	3.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	10.5	0.0	0.3	5.3	-0.2	2.9	0.6	0.6	1.2	0.7	0.0	0.0	3.4	0.9
73	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	3.4	0.0	-0.2	0.6	0.0	-0.2	5.0	0.0	0.1	4.0	-0.2	1.3	0.2	0.1	0.6	0.2	0.0	0.0	1.0	0.0
74	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	3.9	0.0	-0.1	0.8	0.0	-0.2	2.6	0.0	0.3	2.4	-0.2	0.7	0.8	0.2	0.6	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1
75	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	4.9	0.0	-0.2	2.0	0.0	-0.2	3.8	0.0	0.0	4.6	-0.2	1.1	1.1	0.4	1.3	1.1	0.0	0.0	2.1	0.6
76	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	5.1	0.0	-0.2	1.6	0.0	-0.2	3.1	0.0	0.0	4.0	0.0	0.9	0.4	0.4	0.9	0.9	0.0	0.0	2.1	0.7
77	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2	4.8	0.0	-0.2	1.5	0.0	-0.2	1.6	0.0	0.0	4.9	-0.2	0.1	0.4	0.5	1.0	0.4	0.0	0.0	2.6	0.8
78	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.9	0.0	0.0	1.3	0.0	-0.2	1.1	0.0	0.4	4.0	0.0	0.1	0.6	0.4	1.0	0.8	0.0	0.0	1.5	0.3
79	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	5.1	0.0	-0.2	1.6	0.0	-0.2	4.9	0.0	0.0	4.1	-0.2	1.2	0.0	1.2	0.9	1.9	0.0	0.0	1.1	0.4
80	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	6.0	0.0	0.0	2.0	0.0	-0.2	7.3	0.0	4.1	14.5	-0.1	-0.1	0.3	0.0	3.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
81	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	-0.2	1.2	0.1	-0.2	2.9	2.4	0.0	4.0	0.6	2.4	0.5	1.1	0.2	0.9	0.0	0.0	3.3	1.1
82	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	3.4	0.0	0.0	0.5	0.0	-0.1	5.3	0.0	0.2	5.2	-0.2	1.3	0.4	0.6	0.6	0.4	0.0	0.0	2.0	0.5
83	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.4	4.1	0.0	-0.2	0.9	0.5	-0.1	1.0	3.2	0.0	5.8	0.0	1.0	0.5	0.7	0.4	0.5	0.0	0.0	3.3	0.9
84	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	2.5	0.0	-0.2	0.5	0.2	-0.2	4.0	1.8	0.0	5.0	0.0	0.9	0.5	1.0	1.1	1.1	0.0	0.0	1.8	0.6
85	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.4	3.9	0.0	-0.2	0.8	0.2	-0.1	0.6	1.9	-0.1	2.2	1.6	0.7	0.9	1.7	0.1	1.0	0.0	0.0	2.7	0.8
86	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	3.4	0.0	-0.2	0.8	0.0	-0.2	2.3	0.5	-0.1	2.6	0.3	0.0	0.7	0.9	0.7	0.8	0.0	0.0	1.4	0.4
87	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	3.7	0.0	-0.2	0.7	0.0	-0.2	4.6	0.0	0.0	1.6	0.0	0.6	0.6	0.9	0.4	0.6	0.0	0.0	0.8	0.2
88	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	3.3	0.0	-0.2	0.5	0.1	-0.2	6.7	0.1	0.0	3.6	0.0	1.4	0.5	0.9	0.8	0.6	0.0	0.0	1.6	0.5
89	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	2.8	0.0	-0.1	0.4	1.0	-0.2	5.7	0.4	0.0	2.9	0.0	1.0	0.6	0.9	0.5	0.6	0.0	0.0	1.5	0.3
90	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	3.0	0.0	-0.2	1.0	0.0	-0.2	1.1	0.1	0.0	5.5	-0.2	0.0	0.5	0.7	0.9	0.9	0.0	0.0	1.1	0.5
91	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	3.3	0.0	-0.2	2.0	0.1	-0.2	4.5	0.0	0.0	2.9	-0.2	0.7	0.4	0.3	0.6	0.7	0.0	0.0	1.0	0.3
92	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.8	3.6	0.0	-0.2	2.0	0.0	-0.2	3.5	0.4	0.0	1.1	0.0	0.9	0.5	0.5	0.1	0.4	0.0	0.0	1.3	0.4
93	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	2.3	0.0	0.0	0.8	-0.1	-0.2	0.0	0.0	-0.2	5.5	0.0	-0.2	0.7	0.9	0.8	0.5	0.0	0.0	1.5	0.5
94	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.8	2.3	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	2.3	0.0	0.4	0.9	-0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.0	0.0	0.1	0.0
95	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.2	0.7	-0.1	0.0	-0.1	0.0	1.1	0.1	-0.2	4.9	0.1	-0.2	0.0	0.1	0.9	0.3	0.0	0.0	0.7	0.0
96	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	2.7	0.0	-0.2	0.7	0.1	-0.2	1.8	0.9	0.0	4.2	0.0	0.4	0.5	0.5	1.2	1.1	0.0	0.0	1.5	0.4
97	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.4	2.4	0.0	-0.2	0.4	0.2	-0.2	2.1	0.0	0.0	3.0	0.0	0.4	0.4	0.7	0.6	0.6	0.0	0.0	0.7	0.2
98	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	5.0	0.0	-0.2	0.6	0.8	3.8	12.2	0.												

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
99	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.3	2.8	0.0	-0.2	0.7	0.8	-0.2	2.1	1.2	0.0	2.7	0.0	0.4	0.5	0.8	0.8	0.4	0.0	0.0	0.8	0.4
100	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.5	2.9	0.0	-0.2	0.8	0.1	-0.2	4.1	0.0	0.0	2.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.2	0.1	0.0	0.0	1.1	0.1
101	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.1	3.2	0.0	-0.2	0.7	0.1	-0.2	4.3	0.1	0.0	3.6	-0.1	0.8	0.4	0.5	0.6	0.5	0.0	0.0	1.4	0.5
102	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	3.0	0.0	-0.2	0.5	0.2	-0.2	4.1	0.0	0.0	3.5	-0.1	0.7	0.3	0.4	0.5	0.4	0.0	0.0	1.5	0.4
103	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	3.1	0.0	-0.1	0.9	0.1	-0.2	2.9	0.0	0.0	4.1	0.0	0.5	0.2	0.3	0.7	0.7	0.0	0.0	1.6	0.5
104	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	2.1	0.0	-0.2	0.5	0.1	-0.2	3.6	0.9	0.0	3.4	0.0	0.9	0.3	0.3	0.5	0.5	0.0	0.0	2.0	0.4

**Tabla 2.** Valores de los residuos (mg/g) de las ventanas en FeSi.

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0.0	0.1	0.1	0.7	1.1	0.2	0.7	-0.1	0.9	0.1	2.9	-0.1	4.2	0.0	0.0	0.2	0.5	0.3	0.1	0.0	0.6	0.0	0.3
2	0.0	0.0	0.1	0.8	1.4	0.1	0.6	-0.2	0.2	0.2	2.8	-0.1	4.0	0.1	0.0	0.2	0.5	0.2	0.1	0.0	0.6	0.0	0.4
3	0.0	0.0	0.2	1.0	1.7	0.3	0.7	-0.2	0.7	0.0	4.1	-0.2	4.1	0.5	0.0	0.1	0.6	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1
4	0.0	0.1	0.0	1.4	1.4	1.5	0.9	0.0	0.1	0.3	-0.1	0.0	2.6	1.1	0.0	0.4	0.3	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2
5	0.0	0.2	0.0	1.2	3.0	0.6	0.9	0.0	0.2	0.2	-0.2	-0.1	2.1	0.8	0.0	0.3	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.3
6	0.0	2.0	0.0	1.8	3.1	0.9	1.3	1.4	1.5	1.4	1.4	3.6	3.4	1.1	0.0	0.7	0.2	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.2
7	0.0	0.0	0.0	3.8	6.0	1.2	1.9	-0.1	1.3	0.5	0.2	0.0	4.2	1.8	0.0	0.5	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.9
8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	3.5	1.0	-0.2	2.2	-0.2	5.2	0.0	5.0	0.6	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	2.9	0.9	-0.1	0.7	0.0	4.4	-0.1	8.9	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	3.4
10	0.0	0.1	0.0	1.4	2.8	0.9	1.5	-0.2	0.3	-0.1	2.3	-0.2	6.7	0.8	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
11	0.0	0.1	0.0	0.0	1.4	3.1	1.1	-0.2	0.6	-0.2	-0.1	-0.1	2.9	1.3	0.0	0.6	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2
12	0.0	2.8	0.0	0.0	1.4	4.4	1.4	-0.2	0.4	-0.2	-0.1	0.6	3.0	1.7	0.0	0.8	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2
13	0.0	0.2	0.0	0.0	1.7	4.0	1.3	-0.2	1.6	0.0	4.8	-0.1	6.5	-0.2	0.0	1.1	0.0	1.7	0.0	0.0	2.5	0.0	0.9
14	0.0	0.6	0.1	0.5	1.3	0.1	0.6	0.7	1.8	0.2	3.0	0.0	0.4	0.1	0.0	0.2	0.8	0.1	0.5	0.2	1.0	0.0	0.5
15	0.0	0.1	0.2	1.2	1.7	0.4	0.9	-0.2	0.1	-0.2	4.3	-0.2	4.5	-0.1	0.0	0.2	0.4	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.1
16	0.0	0.1	0.3	2.1	3.1	0.7	1.2	0.0	0.5	0.2	4.3	-0.2	0.8	0.8	0.0	0.4	0.7	0.1	0.5	0.1	0.3	0.0	0.2
17	0.0	0.0	0.2	1.6	2.5	0.5	1.1	-0.1	0.8	0.6	1.2	-0.2	1.7	0.5	0.0	0.3	0.7	0.1	0.5	0.1	0.5	0.0	0.3
18	0.0	1.3	0.2	1.3	1.9	0.4	0.8	0.0	0.3	0.2	1.3	-0.2	2.1	0.1	0.0	0.1	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2
19	0.0	0.0	0.2	1.9	1.8	0.5	0.7	-0.2	0.5	-0.1	5.1	-0.2	2.7	0.5	0.0	0.2	0.5	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.4
20	0.0	0.1	0.4	2.7	3.6	0.9	1.1	-0.2	1.3	0.4	0.5	-0.1	1.0	-0.1	0.0	0.2	0.6	0.1	0.4	0.1	0.4	0.0	0.3
21	0.0	0.0	0.1	0.9	1.2	0.2	0.5	-0.1	0.6	0.0	1.8	0.0	2.2	0.1	0.0	0.1	0.5	0.1	0.2	0.0	0.4	0.0	0.3
22	0.0	0.1	0.2	1.3	2.5	0.3	0.9	-0.1	0.4	0.3	1.1	-0.2	2.3	0.5	0.0	0.4	0.1	0.4	0.2	0.0	0.3	0.0	0.2
23	0.0	0.0	0.2	0.4	2.3	0.2	1.6	-0.2	1.3	-0.1	2.0	-0.1	1.7	-0.1	1.2	0.7	1.5	0.1	1.4	0.3	0.2	0.0	0.2
24	0.0	0.1	0.1	0.3	1.9	0.2	1.1	-0.1	0.7	0.0	0.9	-0.1	0.7	0.0	0.3	0.5	0.7	0.1	0.6	0.0	0.3	0.0	0.9
25	0.0	0.3	0.4	0.6	3.1	0.4	1.8	-0.1	0.0	-0.1	0.8	-0.2	2.2	0.4	0.0	0.3	0.4	0.0	0.3	0.5	0.0	0.0	0.2
26	0.0	5.4	0.0	1.6	2.4	0.0	3.5	0.0	-0.2	6.4	-0.2	-0.1	-0.2	1.9	1.9	0.5	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.2
27	0.0	0.9	0.0	1.1	2.1	0.0	0.9	1.8	1.3	0.5	0.0	-0.2	2.1	0.4	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.2	0.7	0.0	0.6
28	0.0	0.1	0.0	0.0	1.7	0.0	0.7	2.9	4.4	0.8	-0.1	0.0	0.9	0.0	0.0	0.8	0.0	0.7	0.0	0.0	3.5	0.0	1.1
29	0.0	0.3	0.0	0.0	1.5	0.0	0.7	2.7	4.2	1.1	1.3	0.0	2.9	-0.2	0.0	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2
30	0.0	0.0	0.0	2.8	8.0	0.0	3.0	0.7	0.0	0.3	1.3	-0.2	6.1	0.1	0.0	0.6	0.0	0.0	0.9	0.4	0.0	0.0	0.5
31	0.0	0.1	0.0	0.0	2.3	0.2	0.8	-0.2	1.6	1.8	1.8	-0.1	0.5	-0.2	5.4	0.7	0.0	0.1	0.9	0.0	0.0	0.0	0.3
32	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.9	-0.2	1.0	1.5	1.3	0.0	4.3	-0.2	0.0	0.3	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3
33	0.0	0.6	0.0	0.0	4.3	0.0	1.7	-0.2	0.7	0.2	2.0	-0.2	4.6	-0.2	0.0	0.2	0.0	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.2
34	0.0	0.5	0.0	1.2	1.6	0.3	0.7	-0.2	1.6	0.4	1.5	0.0	0.7	-0.2	0.0	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4
35	0.0	0.1	0.0	0.8	1.7	0.0	0.8	-0.1	1.8	0.0	-0.2	2.2	0.8	0.6	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2
36	0.0	0.2	0.0	0.8	2.3	0.0	1.2	0.0	1.5	1.3	2.7	-0.1	1.6	-0.2	5.3	1.2	0.8	0.1	0.4	0.0	0.2	0.0	0.1
37	0.0	0.4	0.0	1.5	1.6	0.2	0.7	0.2	0.5	0.6	3.1	-0.2	5.6	0.3	0.0	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
38	0.0	0.1	0.0	2.6	3.2	0.5	0.9	-0.2	1.2	0.7	2.5	-0.1	3.9	-0.2	0.0	0.2	0.0	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.2
39	0.0	0.1	0.0	1.1	3.8	0.0	1.2	-0.1	1.3	0.7	4.8	0.0	5.0	-0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2
40	0.0	0.2	0.0	2.0	2.9	0.5	0.9	-0.1	0.2	0.2	2.3	-0.2	3.4	0.6	0.0	0.1	0.5	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0
41	0.0	0.0	0.0	1.2	1.9	0.0	0.5	0.0	0.3	0.0	1.9	-0.2	2.9	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
42	0.0	0.0	0.0	1.5	2.3	0.0	0.4	0.0	0.4	0.2	1.8	-0.1	3.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2
43	0.0	0.1	0.0	1.0	1.5	0.0	0.4	-0.1	0.2	0.3	1.3	0.0	3.2	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2
44	0.0	0.1	0.0	2.6	4.1	0.0	1.0	0.1	0.0	0.0	1.1	-0.2	4.8	0.9	0.0	0.1	0.2	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1
45	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.7	0.0	0.3	0.3	1.8	-0.1	4.9	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.1
46	0.0	0.1	0.0	0.0	2.4	0.0	1.0	0.0	1.0	0.2	1.4	-0.2	4.8	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
47	0.0	0.0	0.0	1.3	2.0	0.0	0.9	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	1.4	-0.1	0.0	0.4	0.2	0.4	0.2	0.0	0.1	0.0	0.2
48	0.0	0.0	0.0	2.2	2.8	0.0	1.0	-0.1	0.5	0.3	1.9	-0.2	1.8	0.4	0.0	0.2	0.6	0.1	0.6	0.0	0.0	0.0	0.3
49	0.0	0.2	0.0	2.5	4.1	0.0	1.0	0.1	1.3	0.1	1.9	0.0	1.5	-0.1	0.0	0.4	0.7	0.3	0.5	0.0	0.1	0.0	0.6
50	0.0	0.0	0.0	2.0	2.3	0.0	1.4	0.7	0.0	0.0	1.1	-0.1	3.5	0.0	0.0	0.1	0.6	0.1	0.4	0.2	0.0	0.0	0.3
51	0.0	1.0	0.0	1.2	1.4	0.0	0.4	-0.1	0.2	0.3	1.2	-0.2	4.5	1.1	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1
52	0.0	0.8	0.0	3.7	3.0	0.9	0.8	-0.2	0.9	-0.2	1.0	0.0	1.6	0.3	0.3	0.3	0.8	0.1	0.7	0.2	0.0	0.0	0.1
53	0.0	0.0	0.0	3.7	4.6	0.0	1.5	-0.2	0.6	0.5	2.5	0.0	2.7	-0.2	0.7	0.4	1.0	0.1	0.9	0.2	0.0	0.0	0.3
54	0.0	0.1	0.0	0.0	3.7	0.0	0.7	1.3	0.1	0.0	4.4	-0.2	-0.2	0.8	0.0	0.8	0.9	0.7	0.9	0.0	0.0	0.0	0.5
55	0.0	0.2	0.0	0.0	2.7	0.0	1.6	-0.2	2.7	0.6	4.1	0.0	0.6	0.1	0.6	1.2	1.1	0.8	1.0	0.0	0.1	0.0	0.5
56	0.0	0.3	0.0	0.0	2.3	0.0	0.6	-0.2	2.8	2.2	4.8	-0.1	2.1	-0.2	0.6	1.4	0.0	0.3	0.8	0.0	0.1	0.0	0.7
57	0.0	0.5	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	-0.1	0.6	0.2	3.7	0.0	5.1	-0.1	0.0	0.3	0.0	0.2	0.3	0.0	0.1	0.0	0.1
58	0.0	0.3	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.9	0.7	2.7	0.0	5.8	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.4	0.0	0.1	0.0	0.3
59	0.0	0.1	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	-0.2	1.2	0.6	2.5	0.0	5.5	0.3	0.0	0.1	0.0	0.2	0.4	0.0	0.1	0.0	0.3
60	0.0	0.1	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.1	1.6	0.8	2.4	0.0	5.2	0.3	0.0	0.2	0.0	0.1	0.4	0.0	0.1	0.0	0.3
61	0.0	0.1	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.7	0.8	2.6	0.0	6.6	0.4	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.6	0.0	0.4
62	0.0	0.1	0.0	0.0	2.2	0.0	0.6	0.0	0.9	0.4	2.4	-0.2	4.2	0.2	0.0	0.3	0.0	0.1	0.5	0.0	0.6	0.0	0.2
63	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	1.7	1.0	2.8	0.0	2.7	0.2	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.6	0.0	0.1
64	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.0	0.7	4.1	0.3	2.2	1.4	0.1	0.3	0.0	0.5	0.6	0.0	0.0	0.0	0.1
65	0.0	0.3	0.0	0.0	1.7	0.0	2.0	-0.1	2.5	1.9	3.1	-0.1	2.9	-0.1	0.4	0.7	0.0	0.1	1.1	0.0	0.1	0.0	0.4
66	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.6	-0.1	2.0	1.5	8.5	-0.2	7.0	-0.2	0.0	0.8	1.1	0.1	0.6	0.0	2.4	0.0	0.0
67	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	2.5	1.5	1.1	2.0	2.7	6.6	-0.2	7.7	-0.2	0.0	1.1	0.7	0.1	0.7	0.0	2.5	0.0	0.0
68	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	2.7	5.8	-0.2	8.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0
69	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	2.1	10.9	-0.2	8.6	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
70	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.3	4.8	2.1	-0.2	6.6	-0.1	0.0	0.3	0.6	0.1	0.4	0.0	1.8	0.0	0.0
71	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.2	0.0	10.4	-0.2	10.4	0.4	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
72	0.0	16.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	-0.2	4.7	5.8	-0.2	3.8	0.4	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
73	0.0	0.3	0.0	0.0	1.1	0.0	0.6	0.8	1.1	1.7	3.7	-0.2	6.0	0.1	0.0	0.5	0.4	0.1	0.2	0.0	0.5	0.0	0.0
74	0.0	0.1	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.4	1.3	5.0	2.4	-0.2	5.9	0.4	0.0	0.5	0.4	0.1	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0
75	0.0	0.1	0.0	0.0	3.8	0.0	0.9	1.7	1.1	2.9	4.0	-0.2	5.6	0.1	0.0	0.9	0.0	0.1	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0
76	0.0	0.6	0.0	0.0	3.0	2.8	0.9	1.6	1.3	2.8	2.4	-0.2	3.7	-0.1	0.0	0.7	0.4	0.1	0.2	0.0	0.3	0.0	0.0
77	0.0	0.1	0.0	0.0	1.6	2.4	0.0	1.1	1.7	0.0	4.8	-0.2	4.5	-0.1	0.0	1.4	0.6	0.1	0.4	0.0	1.2	0.0	0.0
78	0.0	0.5	0.0	0.0	1.3	2.2	0.0	0.8	1.5	3.7	0.0	-0.2	3.4	-0.1	0.0	1.2	0.9	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.7
79	0.0	0.1	0.0	0.0	2.7	2.8	0.0	1.6	0.7	4.1	1.4	-0.2	5.4	0.3	0.0	1.8	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
80	0.0	0.1	0.0	0.0	1.0	1.4	0.6	6.0	5.7	2.4	0.0	0.0	11.0	3.8	0.0	1.3	0.6	0.7	0.3	0.0	5.8	0.0	1.2
81	0.0	0.1	0.0	0.0	1.1	1.9	0.8	1.4	3.6	2.4	7.0	-0.1	2.4	-0.2	0.0	0.8	0.7	0.0	0.5	0.0	1.9	0.0	0.0
82	0.0	2.0	0.0	0.0	0.6	1.3	0.9	0.3	0.0	2.9	4.0	-0.2	6.9	0.2	0.0	0.5	0.5	0.1	0.3	0.0	1.0	0.0	0.0
83	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	3.5	2.5	6.1	-0.2	5.7	-0.2	0.0	1.1	0.8	0.1	0.4	0.0	2.0	0.0	0.0
84	0.0	0.3	0.0	0.0	0.4	1.1	0.8	0.3	0.4	0.0	9.8	-0.2	6.7	-0.2	0.0	0.1	0.8	0.4	0.3	0.0	1.2	0.0	0.0
85	0.0	0.1	0.0	0.0	1.3	1.8	0.9	0.7	2.2	2.9	3.5	-0.2	2.9	-0.2	0.0	0.5	1.5	0.1	0.4	0.0	1.8	0.0	0.0
86	0.0	0.1	0.0	0.0	1.2	1.1	1.7	0.7	0.8	2.1	2.4	-0.1	3.1	-0.2	0.0	0.1	1.0	0.2	0.3	0.0	1.4	0.0	0.0
87	0.0	0.4	0.0	0.0	1.3	1.0	0.0	0.7	0.0	3.1	4.0	-0.2	4.3	-0.1	0.0	0.1	0.6	0.1	0.4	0.0	0.3	0.0	0.0
88	0.0	0.1	0.0	0.0	0.7	1.6	0.9	0.8	0.6	0.0	9.0	-0.2	5.7	-0.1	0.0	0.7	0.8	0.1	0.4	-0.0	0.5	0.0	0.0
89	0.0	1.6	0.0	0.0	0.4	1.2	0.9	0.5	0.0	2.7	6.0	-0.2	4.8	-0.2	0.0	0.0	1.0	0.1	0.4	0.0	0.8	0.0	0.0
90	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.4	0.6	0.3	1.5	0.0	3.7	-0.2	4.7	0.0	0.0	0.1	0.4	0.2	0.3	0.0	0.8	0.0	0.0
91	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.6	0.8	1.0	1.2	1.8	4.2	-0.2	4.9	0.0	0.0	0.8	0.5	0.1	0.2	0.0	0.7	0.0	0.0
92	0.0	0.1	0.0	0.0	0.7	1.8	1.0	0.6	0.0	2.0	4.7	-0.2	3.3	-0.2	0.0	0.6	0.6	0.1	0.4	0.0	0.7	0.0	0.0
93	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9	0.5	0.2	1.8	0.0	1.7	0.7	3.2	0.2	0.0	0.9	0.9	0.1	0.5	0.0	1.5	0.0	0.0
94	0.0	0.1	0.0	0.0	0.8	0.9	0.0	0.2	0.0	2.2	1.7	-0.2	2.3	0.0	0.0	0.3	0.2	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0
95	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.6	0.4	2.0	0.0	4.8	0.0	0.0	0.2	0.0	0.3	0.0	0.0	0.5	0.0	0.3
96	0.0	0.1	0.0	0.0	0.5	1.1	0.6	0.6	1.1	2.8	3.6	-0.2	4.8	-0.2	0.0	0.1	0.4	0.1	0.2	0.0	1.0	0.0	0.0
97	0.0	0.3	0.0	0.0	0.4	1.2	0.8	0.1	0.2	2.5	1.8	-0.2	4.3	-0.2	0.0	0.1	0.5	0.2	0.3	0.0	0.6	0.0	0.0

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
98	0.0	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.2	0.6	0.0	13.1	-0.2	13.1	-0.2	0.0	0.1	1.2	0.1	0.8	0.0	3.3	0.0	0.3
99	0.0	0.1	0.0	0.0	0.6	1.6	1.1	0.3	0.6	2.3	3.2	-0.2	4.1	-0.2	0.0	0.1	0.7	0.1	0.5	0.0	0.4	0.0	0.0
100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.7	1.0	0.6	0.6	3.3	1.6	-0.2	3.4	-0.2	0.0	0.5	0.5	0.1	0.4	0.0	0.7	0.0	0.0
101	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.8	0.8	0.9	1.0	3.4	1.8	-0.2	4.6	-0.1	0.0	0.5	0.5	0.1	0.3	0.0	0.7	0.0	0.0
102	0.0	0.2	0.0	0.0	1.1	1.6	0.9	0.6	0.4	3.2	1.7	-0.2	5.0	-0.1	0.0	0.4	0.4	0.0	0.3	0.0	0.9	0.0	0.0
103	0.0	0.1	0.0	0.0	1.2	1.4	0.6	0.9	0.9	1.8	2.8	-0.2	3.9	-0.1	0.0	0.5	0.4	0.1	0.2	0.0	1.1	0.0	0.0
104	0.0	0.1	0.0	0.0	0.8	1.0	0.5	0.3	0.2	3.3	1.6	-0.2	5.6	-0.2	0.0	0.4	0.4	0.1	0.1	0.0	1.6	0.0	0.0

**Tabla 1.** Composición cuantitativa relativa de mieles de azahar (3), trébol (6) y zarzamora (2) obtenida mediante spme y mediante destilación a presión reducida seguida de extracción líquido-líquido.

COMPUESTOS	t R	AZAHAR						TREBOL												ZARZAMORA						
		SD+E			SPME			SD+E						SPME						SD+E		SPME				
		S6	S9	S11	S6	S9	S11	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S3	S5	S3	S5			
Sulfuro de dimetilo	4.1	0.0	0.0	0.0	3.8	5.1	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.6	7.6	0.0	6.4	7.7	0.0	0.0	6.9	13.8	
Acetona	4.8	0.0	0.0	0.0	5.2	4.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.8	19.4	0.9	10.4	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	11.5	
Acetato de etilo	5.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	7.7	0.0	0.0	5.5	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Etanol	6.7	0.0	0.0	0.0	3.7	6.9	16.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.0	0.0	0.0	3.5	5.3	4.3	0.0	0.0	2.1	5.8	0.0	0.0	0.0	
2,3-Butanodiona	7.8	0.0	0.0	0.0	5.9	3.5	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	0.0	5.9	5.1	4.4	3.9	0.0	0.0	8.2	10.8	0.0	0.0	0.0	
n.i. (97, 55, 85)	8.3	0.0	0.0	0.0	2.0	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Acetonitrilo	9.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0
Tolueno	10.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Disulfuro de dimetilo	10.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Butanol o metilpropanol	11.2	0.0	0.0	0.8	0.0	0.6	1.4	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4-Metil-3-Penten-2-ona	12.8	0.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.6	0.4	0.7	0.7	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0
n.i. (110, 137)	15.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metil-1-butanol	15.3	0.0	0.0	1.8	1.6	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	2.1	1.7	1.9	2.3	1.5	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (110, 137)	16.5	0.0	0.0	0.0	0.9	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-metil-3-buten-1-ol	17.1	0.0	0.0	0.0	0.8	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dihidro-2-metil-3(2H)-Furanona	17.6	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4-Cianobuteno	17.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Acetoina	18.4	5.8	3.0	16.5	1.6	0.5	1.9	4.8	1.7	3.4	1.7	4.7	2.4	0.7	0.0	0.6	0.6	0.7	0.0	3.2	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hidroxiopropanona	19.0	2.4	4.9	5.2	0.0	0.8	0.2	3.0	2.9	0.7	1.6	9.9	9.9	0.0	0.0	2.6	0.0	0.4	0.0	10.4	2.7	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Hidroxiopropanoato de etilo	20.3	0.0	0.0	4.2	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4-Hidroxi-4-metil-2-pentanona	21.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-hidroxi-2-butanona	21.6	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

COMPUESTOS	t R	AZAHAR						TREBOL												ZARZAMORA			
		SD+E			SPME			SD+E						SPME						SD+E		SPME	
		S6	S9	S11	S6	S9	S11	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S3	S5	S3	S5
3-hexen-1-ol	21.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.5	1.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	1.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Trisulfuro de dimetilo	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 45	22.0	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4-penten-2-ol	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nonanal	22.1	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	4.9	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Butoxietanol	22.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 59,93	22.5	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.7	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4,4-Dimetilheptano (85,113,128)	23.6	1.0	0.6	0.0	0.6	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Óxido de linalilo (cis)	23.8	7.7	4.0	2.1	11.4	3.8	1.6	3.1	3.2	2.6	6.1	1.4	0.4	1.4	4.4	1.8	4.9	2.5	1.5	3.8	2.7	2.7	3.8
1-Metoxi-4-metilbenceno	24.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3
Ácido acético	24.4	0.5	0.8	2.0	2.0	5.3	3.5	0.0	0.8	1.2	0.0	1.2	1.1	4.2	6.0	9.5	4.8	5.7	3.7	2.1	1.2	10.0	3.3
Óxido de linalilo (trans)	24.7	2.4	2.2	1.1	2.8	1.1	0.5	2.2	2.3	1.3	2.7	0.6	0.2	0.5	2.1	0.6	1.8	0.8	0.5	4.4	1.6	0.3	1.2
Furfural	24.8	2.8	7.6	23.1	19.1	17.4	35.4	12.3	7.6	2.9	8.4	11.9	17.1	18.6	19.7	28.6	25.0	33.3	40.9	14.1	8.0	26.0	25.1
2-methyl-1,3-dioxolano	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Etil-1-hexanol	25.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Decanal	25.8	0.6	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	4.9	2.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-(2-Furanil)etanona	26.2	0.2	0.7	1.2	0.7	0.6	0.9	0.0	0.0	0.4	0.8	1.3	0.0	0.9	0.0	0.8	1.1	1.5	0.0	2.2	0.8	13.3	2.0
(3,9-Epoxi-delta-menteno)	26.5	0.1	0.7	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-(1,4-dimetil-3-ciclohexen-1-il)etanona	26.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Benzaldehido	26.9	0.2	1.0	0.6	2.2	2.9	2.0	3.2	2.7	3.5	6.3	1.7	2.2	7.9	4.0	10.2	12.7	9.0	3.9	3.7	1.6	3.2	3.1
a-terpinoleno	27.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.6	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
aldehido de lila 1	27.3	5.0	5.2	1.1	7.0	7.1	0.7	0.0	0.0	0.9	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.7	0.0	0.0	3.8	0.0	11.5	0.0
aldehido de lila 2	27.8	5.7	5.4	1.0	7.0	7.0	0.8	0.0	0.0	1.1	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	1.6	0.0	0.0	0.7	0.0	1.0	0.0
aldehido de lila 3	28.1	4.4	4.3	0.5	5.4	4.5	0.5	0.0	0.0	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.3	0.0	0.0	1.0	0.0	0.5	0.0
Ácido 2-metilpropanoico	28.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.7	0.5	2.0	3.7	0.0	2.1	0.7	0.7	1.1	1.9	0.9	1.8	0.4	0.0
5-Metilfurfural	28.5	0.2	0.6	1.1	0.0	1.1	1.0	0.0	0.0	0.9	0.6	0.7	0.0	0.0	1.3	0.0	0.9	1.6	0.0	1.2	0.5	1.1	0.0



COMPUESTOS	t R	AZAHAR						TREBOL												ZARZAMORA			
		SD+E			SPME			SD+E						SPME						SD+E		SPME	
		S6	S9	S11	S6	S9	S11	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S3	S5	S3	S5
Dimetilsulfóxido	28.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (71,113)	28.7	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
aldehido de lila 4	28.9	6.5	5.9	0.7	5.7	5.7	0.6	0.0	0.0	1.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	1.2	0.0	0.0	0.4	0.0	0.8	0.0
hexadecano	29.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
isoforona	29.2	0.0	1.9	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	1.6	4.9	1.4	0.0	0.0	0.0	1.8	1.6	0.8	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	2.4
hotrienol	29.3	0.0	0.8	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	2.8	1.7	2.1	0.8	0.0	0.0	0.6	0.0	0.9	0.0	0.0	1.7	4.4	1.1	1.4
n.i. (79,94) isómero 1	29.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (79,94) isómero 2	29.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ácido butanoico	30.1	2.8	1.7	1.0	2.4	0.9	0.5	6.5	2.0	3.1	4.8	6.9	2.9	7.3	2.4	4.0	6.4	3.8	2.2	0.9	6.5	0.5	4.4
Decanoato de etilo	30.2	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.8	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0
5-Metil-2-(1-metiletil)ciclohexanol	30.4	0.0	0.5	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2(3H)-Furanone, dihydro-	30.6	0.4	0.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Fenilacetaldehido	30.8	0.8	1.4	14.0	0.0	0.9	2.8	3.9	10.0	1.7	5.4	2.9	0.0	0.0	6.0	0.0	1.1	1.2	0.0	1.6	6.3	0.8	1.4
2-Furanmetanol	31.1	0.0	0.0	1.7	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	0.0	0.0
Ácido 3-metilbutanoico	31.4	0.8	1.1	1.0	1.0	0.4	0.5	0.0	6.0	3.5	4.2	8.0	14.8	1.1	2.1	2.6	2.9	5.1	10.0	1.7	4.9	1.2	3.6
5-Etenildihidro-5-metil-2-(3H)furanona	31.7	0.9	0.8	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (79,94,152)	32.0	1.2	1.6	0.0	1.9	2.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
a-terpineol + Oxoisoforona	32.3	0.8	1.0	0.0	0.6	0.3	0.0	0.0	2.4	0.0	0.3	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.7	2.5	0.0	1.9
Heptadecano	32.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dodecanal	32.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. (111,93,155)	33.1	0.5	1.3	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Eucarvona	33.5	0.7	1.1	0.0	0.9	0.8	0.4	0.0	1.0	1.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.7	0.9	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
Epoxilinalol	33.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0
n.i. (111,93,155)	33.7	0.4	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,4,5-Trimetilfenol	34.1	0.6	1.3	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Epoxilinalol	34.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	4.8	2.6	0.0	0.0	0.0	

COMPUESTOS	t R	AZAHAR						TREBOL												ZARZAMORA				
		SD+E			SPME			SD+E						SPME						SD+E		SPME		
		S6	S9	S11	S6	S9	S11	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S2	S4	S7	S8	S10	S12	S3	S5	S3	S5	
7-Etil-1,4-Dimetilazuleno	35.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2,2,6-Trimetil-1,4-Ciclohexanediona	35.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
n.i. (111,93,155)	35.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
n.i. (60,87)	35.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Octadecano	35.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
n.i. (115,126,140,159)	36.2	4.9	1.3	2.8	0.0	0.0	0.0	6.0	6.2	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	2.4	0.0	0.0
Ácido hexanoico	36.6	0.9	0.7	1.8	1.7	0.7	0.8	0.0	1.2	0.0	1.0	3.3	0.7	0.8	0.0	1.2	1.8	0.8	3.7	0.7	1.0	1.2	2.0	
p-cimen-1-ol	36.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	8.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
n.i. (71, 89, 173)	37.2	0.8	0.5	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	4.5	2.4	1.1	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.9	0.0	0.0
Alcohol bencílico	37.7	0.6	0.9	1.7	0.0	0.0	0.2	31.5	1.8	0.0	7.2	1.0	18.9	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	5.7	0.6	0.0	0.0	
n.i. (71, 89, 173)	37.8	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	1.3	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
n.i. (93,119,134)	38.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2-Feniletanol	38.7	3.4	4.0	8.6	0.0	0.2	0.6	5.0	3.4	7.2	2.9	4.1	3.4	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	7.3	2.1	0.0	0.0	
alfa-etilidenbenzeneacetaldehido	39.4	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ácido heptanoico	39.6	0.0	0.0	0.0	0.7	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.7	0.0	1.5	0.0	0.0	0.7	0.0	
2-Methoxy-6-methyl-piracina	40.8	10.1	3.7	0.0	0.0	0.5	0.2	0.0	3.4	7.2	2.8	8.8	4.6	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p-Menta-1(7),8(10)-dien-9-ol	40.9	0.0	1.4	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Fenol	41.4	0.0	6.8	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol	41.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2-Furancarboxylic acid, methyl ester	42.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
4-Metoxibenzaldehido	42.2	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.2	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	35.2	0.0	0.0	
3-Fenil-2-Propenal	42.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	
n.i. (60,73,131)	42.7	1.5	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	1.8	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
n.i. (71,87,107)	45.9	3.9	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ácido nonanoico	46.6	0.9	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	1.5	6.8	1.7	2.3	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2-Metoxi-4-(2-propenyl)fenol	47.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	



Composición volátil de las 104 mieles estudiadas de azahar, brezo, roble y eucalipto. Los compuestos cuantificados han sido los siguientes:

Nº	COMPUESTOS	Nº	COMPUESTOS	Nº	COMPUESTOS
1	2,3-Butanodiona	12	Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	23	Isoforona
2	2,3-Pentanodiona	13	n.i. 2	24	Hotrienol
3	3-Metilbutanonitrilo	14	1-(2-Furanil)etanona	25	Fenilacetaldehido
4	3-Metil-1-butanol	15	Benzaldehido	26	Alcohol furfúrico
5	3-Metil-3-buten-1-ol	16	2,3-Butanodiol ( <i>threo</i> )	27	Benzoato de etilo
6	Acetoina	17	Linalol	28	2-Hidroxi-3,5,5-trimetilciclohexanona
7	2-Metil-2-buten-1-ol	18	Aldehido de lila I	29	4-Oxoisoforona
8	1-Hexanol	19	Aldehido de lila II	30	Fenilacetato de etilo
9	3-Hidroxi-2-pentanona	20	Aldehido de lila III	31	Alcohol bencílico
10	Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	21	2,3-Butanodiol ( <i>erythro</i> )	32	2-Feniletanol
11	n.i. 1	22	Aldehido de lila IV	33	Antranilato de metilo

Nº	O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	E	30.9	2.5	0.4	2.4	1.0	21.6	0.7	0.0	7.8	12.7	1.5	2.9	1.2	0.0	0.8	0.0	1.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	4.1	0.5	0.1	0.0	0.9	0.8	0.0	0.1	0.2	0.0
2	E	17.3	1.4	2.5	3.4	1.5	14.2	0.9	0.0	6.3	17.1	0.5	4.3	0.7	0.5	2.3	0.4	0.4	0.0	0.7	0.2	0.0	0.0	0.7	4.4	2.3	0.0	0.0	1.2	1.0	0.0	0.4	0.4	0.0
3	E	45.8	4.3	0.0	2.0	0.6	13.0	0.7	0.2	5.8	3.1	1.0	1.3	0.5	0.6	3.9	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.3	0.7	7.4	0.0	0.0	0.3	1.3	0.0	0.2	0.2	0.0
4	E	34.5	1.9	0.7	2.8	1.9	15.3	1.4	0.0	6.1	8.5	0.4	2.6	1.0	0.6	1.5	0.7	0.8	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.5	1.6	6.0	0.3	0.0	0.8	1.0	0.0	0.2	0.3	0.0
5	R	1.7	0.0	0.7	12.3	4.4	3.4	1.2	1.6	0.0	2.0	0.0	0.8	0.0	1.6	11.0	0.0	2.6	0.0	0.8	0.6	0.0	0.0	0.8	5.5	13.8	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0
6	R	0.0	0.0	0.0	17.2	15.3	1.7	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	7.5	8.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	B	0.0	0.0	0.0	4.8	7.1	1.0	3.5	1.6	0.0	6.7	0.0	2.3	0.0	0.0	16.4	2.3	2.1	0.3	4.6	0.4	0.5	0.0	0.4	5.4	9.5	3.1	0.8	0.0	1.9	0.0	0.8	1.6	0.0
8	B	7.5	0.0	0.0	25.8	10.5	5.6	1.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.3	0.0	1.2	5.7	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	0.8	1.6	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0
9	E	6.0	0.0	0.0	5.4	3.7	3.9	1.4	0.7	0.0	1.7	1.4	0.4	2.9	1.3	10.7	0.0	2.4	0.0	0.8	0.7	0.5	0.8	0.3	4.0	9.0	1.0	1.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.9	0.0
10	E	26.4	0.0	0.0	2.7	0.8	18.1	0.0	0.7	0.0	1.6	5.2	0.6	8.7	0.0	7.5	0.0	0.9	0.9	1.1	0.7	0.0	0.7	0.5	1.3	7.8	0.3	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.5	0.0
11	A	8.7	0.0	0.0	5.3	3.3	3.4	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.2	0.0	0.0	4.7	0.0	0.0	4.8	3.4	3.5	0.0	3.8	0.0	0.0	1.9	0.0	1.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
12	A	11.2	0.0	0.0	3.6	4.4	2.8	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.8	0.0	0.0	2.2	0.0	5.5	9.9	9.2	6.5	0.0	7.5	0.0	0.2	3.3	0.7	0.0	0.0	7.5	0.0	0.0	0.6	0.0
13	B	0.0	0.0	0.0	9.1	7.2	1.1	4.2	0.7	0.0	18.5	0.0	4.6	0.0	0.6	3.8	1.3	0.9	0.0	0.3	0.2	1.1	0.2	2.6	14.1	4.8	2.5	0.0	0.0	5.6	0.0	3.3	1.9	0.0
14	E	8.7	0.0	0.0	16.8	2.5	28.1	0.6	1.3	0.0	2.0	3.8	1.4	7.3	1.2	2.3	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0	0.8	0.2	0.0	1.5	0.0	1.6	0.0	0.5	0.7	0.0	
15	E	32.3	0.8	0.1	4.0	0.8	17.2	0.0	0.0	1.6	2.5	2.8	0.9	3.2	0.6	6.2	0.0	0.0	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.4	1.6	0.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.3	0.0

N°	O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
16	A	4.5	0.0	0.0	2.8	1.7	0.0	1.1	0.0	0.0	5.4	0.0	1.2	0.0	1.5	5.1	0.0	0.0	7.7	6.5	4.1	0.0	5.1	1.7	0.8	2.4	0.6	0.0	0.5	2.4	0.0	0.0	0.4	0.0		
17	R	0.0	0.0	0.0	46.6	18.4	0.0	11.3	0.6	0.0	0.8	0.0	0.4	0.0	0.6	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.7	0.5	0.2	0.2	0.8	0.7	0.9	0.0		
18	R	0.0	0.0	0.0	10.6	17.8	0.6	13.0	3.8	0.0	2.6	0.0	1.1	0.0	1.5	6.5	0.5	0.4	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	2.5	6.9	1.9	0.0	1.0	1.0	0.0	1.3	0.9	0.0		
19	R	0.0	0.0	0.0	24.3	3.9	0.2	1.1	2.1	0.0	2.9	0.0	0.7	0.0	2.3	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.2	1.0	3.0	1.3	0.0	0.0	0.5	0.0	0.4	0.5	0.0		
20	R	6.7	0.0	2.6	3.5	13.8	0.3	2.8	0.0	0.0	1.4	0.0	0.4	0.0	0.8	22.5	0.0	1.9	0.0	2.0	1.3	0.0	1.6	3.4	0.3	1.1	0.8	0.0	1.0	3.3	0.0	0.2	0.4	0.0		
21	R	5.0	0.0	0.0	5.3	20.1	0.0	6.2	0.0	0.0	8.5	0.0	5.0	0.0	1.1	12.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.2	2.4	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.6	0.0		
22	B	0.0	0.0	0.0	13.2	10.8	2.6	5.9	0.8	0.4	2.9	0.0	2.0	0.0	0.8	6.6	0.9	0.6	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	11.8	4.9	2.2	3.5	0.0	8.2	3.1	0.0	1.1	0.8	0.0		
23	B	0.0	0.0	0.0	18.5	4.9	1.2	2.5	0.6	0.0	0.9	0.0	0.6	0.0	0.4	11.7	0.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	21.1	0.7	1.9	1.6	5.9	6.6	4.1	3.5	0.8	0.6	0.0		
24	B	0.0	0.0	0.0	12.6	12.9	1.8	10.6	0.6	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.0	5.7	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	12.1	0.0	2.6	2.9	1.3	3.2	3.1	1.1	0.9	0.0		
25	R	0.0	0.0	0.0	22.1	8.1	1.7	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0		
26	R	4.3	0.0	0.0	6.5	7.5	0.9	4.1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.8	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	11.5	10.6	6.6	0.0	7.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
27	B	14.0	0.0	3.6	6.8	5.5	6.6	2.1	0.0	0.0	0.6	0.0	0.4	0.0	0.0	6.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	0.0	0.0	0.0	16.6	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
28	E	41.0	2.1	0.0	3.6	1.9	29.6	1.9	0.0	7.0	1.8	0.3	0.9	0.4	0.0	1.6	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
29	B	2.3	0.0	1.0	3.7	3.2	2.7	0.3	0.0	0.0	1.4	0.0	0.8	0.0	0.0	11.8	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	4.5	12.3	8.3	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	13.2	0.0	0.0	
30	B	4.0	0.0	5.9	8.6	6.0	5.6	4.5	0.3	0.0	0.5	0.0	0.3	0.0	0.0	8.9	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	11.6	0.0	0.0	0.4	1.9	1.5	0.0	0.0	1.7	0.0	0.9	0.8	0.0	0.0	
31	B	4.2	0.0	4.6	5.2	6.8	5.1	2.8	0.3	0.0	0.4	0.0	0.3	0.0	0.0	15.3	10.3	0.0	0.0	0.0	0.0	8.9	0.0	1.9	0.2	2.5	0.7	0.0	0.0	2.8	0.0	1.0	1.2	0.0	0.0	
32	B	1.3	0.0	2.7	6.4	3.8	1.8	0.9	0.7	0.0	2.0	0.0	1.1	0.0	0.8	14.5	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	2.0	15.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	15.4	0.0	0.0	
33	B	0.0	0.0	0.0	8.3	14.5	1.9	5.5	0.0	0.0	12.3	0.0	2.7	0.0	0.1	13.3	6.8	0.0	0.0	0.0	0.0	10.1	0.0	0.0	2.9	1.2	0.6	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
34	B	3.4	0.0	0.0	9.1	5.6	4.8	1.7	0.7	0.0	0.6	0.0	0.4	0.0	0.0	11.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	0.0	0.6	0.0	3.8	0.9	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
35	B	2.1	0.0	0.0	7.5	6.7	4.3	2.7	0.5	0.0	24.5	0.0	5.6	0.0	0.3	5.2	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	0.0	2.3	2.5	0.5	2.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.3	0.4	0.0	0.0	
36	R	22.1	0.0	2.9	6.0	10.0	0.0	6.7	0.5	0.0	0.8	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	5.5	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
37	R	10.6	0.0	4.6	3.6	5.4	0.0	1.7	0.0	0.0	1.9	0.0	1.7	0.0	0.0	4.9	0.0	2.0	0.0	1.7	0.5	0.0	1.0	0.0	24.1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
38	E	19.7	3.8	0.0	3.1	1.5	34.6	0.8	0.0	14.2	4.4	0.7	1.6	0.9	0.0	1.8	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	2.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
39	R	4.3	0.0	15.8	13.1	8.8	1.4	2.5	1.7	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	7.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
40	R	2.7	0.0	0.0	2.0	15.7	0.0	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.6	0.0	0.7	1.3	0.0	0.0	
41	R	5.2	0.0	0.0	7.3	22.4	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	24.5	0.0	0.0	0.7	0.4	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
42	R	6.5	0.0	0.0	7.2	28.2	0.0	17.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	13.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
43	R	1.6	0.0	0.0	3.6	5.8	0.9	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.8	0.0	1.6	8.1	0.0	0.0	1.6	2.1	0.8	0.0	1.7	0.5	0.0	8.6	1.8	0.5	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0
44	R	1.3	0.0	0.0	1.3	2.0	0.5	0.7	0.0	0.0	1.6	0.0	0.3	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	22.4	22.9	12.2	0.0	17.2	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0
45	R	0.0	0.0	0.0	15.2	6.6	2.6	3.9	4.9	0.0	1.7	0.0	0.5	0.0	1.8	5.2	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0	9.8	0.0	3.8	0.0	6.6	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.9	0.0	0.0	
46	R	5.7	0.0	0.0	2.5	4.5	0.0	1.3	0.0	0.0	0.9	0.0	0.3	0.0	0.8	9.3	0.0	0.0	2.2	2.3	1.2	0.0	1.7	0.0	0.0	38.2	0.0	0.3	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
47	R	2.4	0.0	0.0	4.8	10.0	0.0	2.1	0.5	0.0	2.4	0.0	0.5	0.0	1.7	7.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.7	0.0	0.0	1.6	4.4	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.4	0.4	0.8	0.0	0.0	

Nº	O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
48	R	0.0	0.0	0.0	45.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.7	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.5	0.0
49	A	0.0	0.0	0.0	29.3	5.3	0.0	1.7	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
50	A	1.1	0.0	0.0	0.0	0.8	0.1	0.3	0.0	0.0	1.9	0.0	0.4	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	22.4	19.0	13.5	0.0	16.5	0.0	0.9	17.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
51	R	81.5	0.0	0.0	12.2	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0
52	E	3.5	0.0	0.0	4.0	1.4	4.5	0.0	0.0	0.0	2.2	1.8	0.8	2.3	2.8	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.2	0.0	0.0	0.6	0.0	0.4	0.4	0.0
53	R	2.3	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.7	0.0	0.0	3.3	0.0	0.9	0.0	1.5	1.5	0.0	1.9	8.4	9.4	5.1	0.0	7.1	0.2	0.7	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.1	0.5	0.0
54	A	2.1	0.0	1.2	1.7	1.7	0.0	1.4	0.0	0.0	4.5	0.0	1.0	0.0	2.4	1.1	0.0	5.1	11.0	11.6	6.1	0.0	9.1	0.0	1.2	2.3	0.5	0.0	0.0	0.7	0.0	0.2	1.2	0.1
55	B	1.1	0.0	0.0	0.8	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	19.9	0.0	4.5	0.0	2.6	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8	6.0	1.4	0.4	0.0	1.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0
56	B	0.0	0.0	2.9	38.5	3.5	4.3	0.0	0.6	0.0	1.1	0.0	0.7	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.8	0.0	0.0	0.0	0.0
57	A	2.2	0.0	0.0	2.3	1.8	0.2	1.0	0.2	0.0	4.2	0.0	0.9	0.0	0.0	2.1	0.0	12.1	11.1	12.0	6.9	0.0	9.0	0.0	1.8	20.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
58	R	0.0	0.0	0.0	31.7	4.3	0.0	4.1	0.8	0.0	1.0	0.0	0.5	0.0	0.9	1.4	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	0.8	0.0	0.0	0.0	0.6	1.5	0.0	
59	E	34.9	0.5	0.0	2.6	0.8	17.0	0.0	0.0	1.0	0.4	3.5	0.3	5.7	1.0	1.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
60	R	0.0	0.0	7.4	7.3	4.7	0.0	1.5	2.7	0.0	0.8	0.0	0.2	0.0	1.1	17.2	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	2.5	6.9	1.6	0.0	0.7	3.4	0.0	0.0	1.8	0.0
61	E	31.0	2.8	0.0	3.3	1.8	25.5	0.9	0.0	0.0	4.9	1.0	1.7	1.3	0.3	2.1	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	2.8	1.3	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	
62	B	1.5	0.0	1.1	3.3	3.1	0.7	1.3	0.5	0.0	21.1	0.0	5.0	0.0	0.8	3.6	0.0	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	1.0	16.3	4.3	1.6	1.3	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0
63	B	0.0	0.0	0.0	11.5	9.1	1.4	7.2	1.7	0.0	2.9	0.0	2.4	0.0	0.8	4.3	3.8	1.0	0.0	0.0	0.0	6.4	0.0	2.7	7.8	4.6	3.1	1.7	3.1	1.0	0.9	1.3	1.7	0.0
64	R	1.7	0.0	2.1	2.1	2.5	0.0	1.2	0.4	0.0	4.0	0.0	1.1	0.0	1.6	9.2	0.0	0.0	2.4	2.3	1.3	0.0	1.7	12.1	1.0	1.8	0.0	0.0	1.5	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0
65	R	0.0	0.0	0.0	3.1	4.5	0.0	2.7	0.7	0.0	3.7	0.0	1.2	0.0	0.7	6.2	0.0	0.0	2.6	1.1	0.5	0.8	0.9	2.4	52.0	5.6	1.1	0.0	0.0	1.1	0.0	0.5	1.5	0.0
66	B	3.1	0.0	0.0	13.2	2.7	4.2	0.4	0.0	0.0	9.1	0.0	2.0	0.0	0.7	17.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.4	1.5	4.4	2.1	0.0	0.0	1.8	0.0	0.5	0.6	0.0
67	E	8.5	0.0	0.0	5.3	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	7.9	0.7	2.9	0.8	0.0	2.8	0.0	0.3	3.5	3.2	2.2	0.0	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6	0.0	0.0
68	A	6.3	0.0	0.0	0.0	1.9	0.6	0.5	0.0	0.0	3.4	0.0	0.6	0.0	0.0	3.2	0.0	1.4	17.0	17.1	12.2	0.0	14.6	0.0	0.0	5.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.8	0.5
69	R	14.0	0.0	0.0	10.6	14.7	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.4
70	R	0.0	0.0	0.0	7.9	7.7	1.1	1.1	1.4	0.0	0.9	0.0	5.1	0.0	0.9	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
71	A	3.3	0.0	0.0	0.0	1.8	0.4	0.4	0.1	0.0	2.6	0.0	0.3	0.0	0.4	2.4	0.0	0.2	9.1	10.7	6.0	0.0	8.2	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0
72	A	4.3	0.0	0.0	1.4	3.0	1.6	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.6	0.0	0.0	10.0	0.0	2.1	12.7	9.6	8.3	0.0	9.4	0.0	0.0	9.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	2.4	1.0	0.0
73	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.9	0.0	14.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0	2.4	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8
74	B	8.4	0.0	0.0	4.4	6.7	2.1	1.1	0.0	0.0	0.9	0.0	6.5	0.0	1.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.4	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
75	B	4.3	0.0	0.0	5.8	4.6	6.5	1.4	0.4	0.0	0.3	0.0	0.7	0.0	0.4	1.3	9.8	0.0	0.0	0.0	0.0	20.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.6	0.0
76	B	0.0	0.0	0.0	5.2	3.1	7.7	1.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.6	0.0	0.9	1.6	5.8	0.0	0.0	0.0	0.0	16.9	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	2.6	0.0
77	B	0.0	0.0	0.0	50.2	6.5	4.0	0.6	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.0	0.6	4.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.2	0.0	4.0	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.5	0.0
78	B	0.0	0.0	0.0	16.7	1.9	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.3	0.0	7.8	0.0	4.4	6.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.8	0.0
79	B	5.0	0.0	0.0	6.2	7.7	6.3	2.5	0.0	0.0	0.7	0.0	18.3	0.0	0.5	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.0	2.2	0.0	7.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	9.0	0.0
80	B	3.0	0.0	0.0	18.4	6.8	5.8	1.7	0.0	0.0	3.2	0.0	1.9	0.0	1.2	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	3.0	2.3	0.0	0.0	3.4	0.0	1.1	5.2	0.0

Nº	O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
81	B	0.0	0.0	0.0	6.3	2.0	3.6	0.0	0.7	0.0	2.8	0.0	14.0	0.0	1.1	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	0.0	7.1	3.2	0.0	0.0	3.7	0.0	1.3	6.1	0.0	
82	A	6.3	0.0	0.0	0.0	3.4	0.8	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	0.9	0.0	0.0	3.6	0.0	2.9	11.5	13.2	9.3	0.0	11.0	0.0	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	2.0	0.0	
83	E	22.0	0.0	0.0	9.8	0.9	33.8	0.0	0.0	2.2	0.4	5.5	0.0	6.5	0.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.2	0.2	0.5	
84	R	10.5	0.0	0.0	8.0	11.8	2.7	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	1.1	0.0	1.1	7.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
85	E	14.1	0.0	0.0	6.8	4.7	20.3	0.0	0.0	0.0	0.5	1.6	0.0	2.4	1.0	2.8	0.0	0.0	1.5	1.3	0.9	0.0	1.4	0.0	0.0	0.9	1.3	0.0	0.5	0.0	0.2	1.5	0.0		
86	R	3.2	0.0	0.0	14.2	7.5	6.2	2.0	3.4	0.0	0.7	0.0	0.2	0.0	1.3	8.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	1.7	0.0	
87	A	0.0	0.0	0.0	6.8	4.5	1.5	1.9	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	1.2	2.7	0.0	0.6	4.1	4.5	3.8	0.0	4.8	0.0	0.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.5	0.0	
88	E	12.6	0.0	0.0	8.5	1.7	31.6	0.0	0.0	0.0	1.2	4.6	4.6	5.8	0.9	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.2	1.6	1.4	0.0	0.0	1.0	0.0	0.3	0.3	0.9	
89	A	8.2	0.0	0.0	6.7	5.6	3.8	0.7	0.2	0.0	6.1	0.0	1.5	0.0	3.6	4.8	0.0	1.3	3.8	3.4	4.1	0.0	3.0	1.4	0.5	1.9	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.3	0.0	
90	B	2.7	0.0	0.0	7.3	15.9	3.0	7.1	0.0	0.0	8.7	0.0	2.6	0.0	0.6	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	2.9	2.7	4.1	0.0	0.0	1.9	0.0	2.7	2.2	0.6	
91	E	11.6	0.0	9.3	2.7	3.8	12.1	0.6	0.0	3.0	7.4	0.2	1.6	0.2	0.5	7.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.0	6.7	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	0.5	3.6	0.0	
92	R	0.0	0.0	0.0	10.4	6.6	2.4	0.0	0.0	0.0	2.2	0.0	0.7	0.0	1.7	9.7	0.0	0.0	2.8	2.9	1.4	0.0	2.2	0.0	0.0	3.4	0.8	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
93	B	0.0	0.0	0.0	8.5	6.2	1.6	1.5	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.8	22.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0	0.0	6.0	6.1	0.0	0.0	4.9	0.0	1.0	2.3	0.0	
94	B	2.7	0.0	0.0	1.6	3.0	0.3	1.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.1	0.0	0.5	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	36.9	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.7	12.8	0.0
95	R	3.0	0.0	0.0	6.1	20.0	0.0	16.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	1.2	17.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	2.4	3.6	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	3.2	2.3	0.0	
96	E	13.0	0.0	0.0	6.9	1.5	32.7	0.6	0.0	3.9	1.1	4.3	0.1	7.3	0.6	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	1.3	5.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.8	0.0	
97	B	2.7	0.0	3.7	4.7	2.6	0.0	0.9	0.0	0.0	4.8	0.0	0.0	0.0	0.9	9.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	0.7	18.1	1.9	0.0	0.0	1.8	0.0	1.5	1.7	0.0	
98	A	2.8	0.0	0.0	2.7	1.9	0.8	1.2	0.3	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	1.7	2.7	0.0	4.8	11.7	13.2	8.7	0.0	11.4	0.3	0.7	8.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	2.8	0.0	
99	R	3.4	0.0	0.0	5.6	6.0	2.2	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	1.6	9.1	0.0	1.3	0.6	1.2	0.6	0.0	1.2	1.1	1.3	7.3	1.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	1.4	4.8	
100	R	0.0	0.0	0.0	6.8	7.5	1.2	3.1	0.9	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	1.8	7.7	0.0	0.5	2.5	2.6	1.3	0.0	2.2	0.8	0.4	7.6	1.1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.4	1.8	0.0	
101	E	16.9	0.0	0.0	10.6	1.5	23.4	0.0	0.0	0.0	2.4	3.0	0.9	4.2	1.5	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.0	
102	A	2.6	0.0	0.0	4.6	3.1	0.7	0.5	0.8	0.0	6.1	0.0	17.6	0.0	1.3	8.8	0.0	1.8	9.0	10.8	5.6	0.0	7.1	0.0	0.8	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.7	0.0	0.0	
103	B	0.0	0.0	0.0	11.3	5.2	2.4	3.6	1.9	0.0	7.4	0.0	4.4	0.0	1.3	10.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	6.2	9.5	3.8	0.0	0.0	2.2	0.0	1.9	6.0	0.9	
104	E	33.9	5.5	0.0	0.0	1.5	8.8	0.0	0.0	8.0	3.4	1.6	0.0	1.6	0.0	2.7	0.0	4.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	4.3	6.5	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	1.3	0.0		

Composición volátil (%) de las mieles de los orígenes estudiados: abeto (ABE), aguacate, ajedrea (AJE), albaida (ALB), almendro (ALM), encina, madroño, multifloral, níspero, pitera (PIT), retama, sauce (SAU) y tajinaste, con los valores medios (Med), mínimo (Mín) y máximo (Máx) del número de muestras (n) analizadas de cada origen.

COMPUESTOS	ABE	AGUACATE			AJE	ALB	ALM	ENCINA			MADROÑO			MULTIFLORAL			NISPERO			PIT	RETAMA			SAU	TAJINASTE		
	(n=1)	(n=5)			(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=2)			(n=2)			(n=3)			(n=)			(n=1)	(n=2)			(n=1)	(n=3)		
		Med	Mín	Máx				Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx		Med	Mín	Máx		Med	Mín	Máx
Sulfuro de dimetilo	4.9	51.6	38.5	74.4	22.8	0.0	0.0	20.6	7.4	33.7	1.1	0.0	2.2	57.8	49.9	65.7	13.7	3.2	25.9	0.0	12.6	0.0	25.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Acetato de etilo	0.0	1.1	0.0	2.9	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Metilbutanal	0.0	2.0	0.0	8.2	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.5	3.7	0.0	7.3	0.4	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metilbutanal	0.0	2.0	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	1.8	3.5	0.0	7.1	0.7	0.0	1.3	0.0	2.5	0.0	5.0	0.0	5.4	0.0	16.3
2,3-Butanodiona	0.0	4.5	0.0	14.8	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.7	6.2	4.4	8.1	3.0	0.0	6.2	1.5	28.1	24.6	31.7	0.0	14.2	4.1	21.0
2,3-Pentanodiona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
a-Pineno	9.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Disulfuro de dimetilo	1.8	1.1	0.0	1.8	0.0	1.0	1.8	1.1	0.7	1.5	0.9	0.2	1.5	2.0	0.9	3.2	10.1	0.0	17.1	19.4	0.0	0.0	0.0	2.3	3.7	0.0	10.0
b-Pineno	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Metil-1-propanol	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Metil-2-butenal	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	3.5	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C4H5N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C4H5N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C4H5N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.4	0.0	27.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metil-1-butanol	0.0	5.3	4.2	6.4	9.6	1.0	0.0	9.3	6.3	12.3	0.6	0.5	0.7	7.7	7.0	8.3	2.7	0.0	5.8	10.2	8.7	4.2	13.2	3.6	3.8	0.0	10.8
3-Metil-3-buten-1-ol	6.5	0.3	0.0	1.4	0.0	0.9	0.3	9.2	7.7	10.7	0.4	0.2	0.6	0.5	0.0	0.9	1.1	0.5	1.7	0.9	1.2	0.0	2.5	2.6	2.6	1.4	4.1
4-Ciano-1-buteno	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5	0.0	16.5
Acetoina	0.0	1.5	0.0	6.6	0.0	0.0	0.0	2.1	1.4	2.8	0.2	0.0	0.4	1.0	0.9	1.1	0.0	0.0	0.0	1.8	2.6	1.5	3.8	0.0	0.3	0.0	0.9
1-Hidroxi-2-propanona	0.0	2.6	0.0	9.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.3	3.5	2.7	4.2	0.2	0.0	0.7	2.2	0.7	0.0	1.4	0.0	2.7	0.0	7.2
2-Metil-2-buten-1-ol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	5.5	4.6	6.4	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.7	0.0	0.5	0.0	1.1	1.5	0.2	0.0	0.6
1-Hexanol	0.5	0.5	0.0	1.9	3.2	0.0	0.5	4.7	1.6	7.8	0.2	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.6	1.1	2.4	0.0	4.8	0.0	2.2	0.9	4.0







## ANEXO VII (CAPÍTULO 8)

### • EFECTO DEL ALMACENAMIENTO PROLONGADO EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE LA MIEL.

**Tabla 1.** Concentraciones relativas (%) de los compuestos volátiles de una miel de AZAHAR fresca y tras 1 año de almacenamiento a 10°, 20° y 40°C, obtenidos mediante fraccionamiento por SPME y análisis por GC-MS.

COMPUESTOS	Miel fresca	1 año		
		10°C	20°C	40°C
Sulfuro de dimetilo	3.9	1.7	3.4	0.3
Etanol	2.1	2.5	2.0	0.8
2,3-Butanodiona	1.5	2.7	1.9	0.5
Disulfuro de dimetilo	1.3	1.3	2.5	8.4
Limoneno	0.3	0.1	0.5	0.1
n.i. (96,110,137)	1.4	1.2	2.0	2.1
3-Metil-1-butanol	0.1	0.8	0.4	0.0
n.i. (96,110,137)	2.3	1.9	2.5	2.9
3-Metil-3-butanol	0.7	0.9	0.3	0.3
Acetoina	0.5	0.8	0.2	0.0
2-Hidroxiopropanona	0.1	0.8	0.4	0.5
6-Metil-5-hepten-1-ona	0.6	1.0	0.4	0.0
2-Metil-2-buten-1-ol	0.4	0.0	0.0	0.0
1-Hexanol	0.3	0.2	0.0	0.0
Trisulfuro de dimetilo	0.7	0.5	1.0	3.1
Nonanal	3.7	1.8	1.7	0.0
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	4.2	4.9	6.0	5.6
Ácido acético	3.1	7.5	5.3	2.1
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	0.5	0.7	0.6	1.1
Furfural	14.4	16.0	16.6	43.5
2-Etil-1-etanol	0.2	0.8	1.1	2.7
Decanal	0.6	0.5	0.3	0.0
1-(2-Furanil)etanona	0.9	0.8	0.7	1.2
3,9-epoxi- $\Delta$ -p-menteno	2.7	1.4	2.4	2.0
1-(1,4-Dimetil-3-ciclohexen-1-il)-etanona	1.1	0.5	0.3	0.3
Benzaldehido	1.9	2.1	1.5	0.9
Linalol	1.5	0.4	0.6	0.0
Aldehido de lila I	5.0	3.3	3.3	0.9
Aldehido de lila II	8.7	7.5	7.5	1.7
Aldehido de lila III	5.1	4.8	4.7	1.1
5-Metil-2-furancarboxaldehido	0.3	0.9	0.5	1.9
Aldehido de lila IV	6.9	5.3	5.9	1.5
Dimetil-3-ciclohexen-1-acetaldehido (I)	2.3	1.7	2.0	0.9
Dimetil-3-cyclohexen-1-acetaldehido (II)	2.9	2.1	2.4	1.2
Ácido butanoico	0.2	0.7	0.6	0.1
Fenilacetaldehido	8.6	6.4	5.1	1.2

COMPUESTOS	Miel fresca	1 año		
		10°C	20°C	40°C
n.i. (94,79,152)	1.9	2.0	2.8	6.4
$\alpha$ -Terpinoleno	0.4	0.2	0.5	0.1
2,6,6-Trimetil-2,4-Cicloheptadien-1-ona	0.2	0.3	0.3	0.1
n.i. (94,79,119,152)	0.0	0.3	0.3	0.5
n.i. (94,79,119,152)	0.0	0.2	0.2	0.4
Alcohol bencílico	0.2	0.0	0.0	0.0
2-Feniletanol	0.8	1.9	0.6	0.3
Ácido 2-etilhexanoico	2.3	7.4	8.0	3.5
Antranilato de metilo	3.0	1.4	1.0	0.3

**Tabla 2.** Concentraciones relativas (%) de los compuestos volátiles de una miel de BREZO fresca y tras 1 año de almacenamiento a 10°, 20° y 40°C, obtenidos mediante fraccionamiento por SPME y análisis por GC-MS.

COMPUESTOS	Miel fresca	1 año		
		10°C	20°C	40°C
Sulfuro de dimetilo	5.2	4.2	4.2	1.9
Acetona	4.7	5.5	6.0	1.5
2-Butanona	0.6	1.2	0.8	0.0
2-Metilbutanal	0.0	0.0	0.0	0.5
3-Metilbutanal	0.0	0.6	0.3	1.0
Etanol	0.0	5.7	3.2	1.3
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	1.5	1.9	1.4	0.8
2,5-Dimetilfurano	0.3	0.4	0.4	0.0
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	0.5	0.8	0.6	0.4
Acetonitrilo	0.6	0.5	0.6	0.1
$\alpha$ -Pino	0.1	0.0	0.0	0.0
Tolueno	2.2	3.6	4.5	1.7
Disulfuro de dimetilo	0.2	0.3	0.3	0.1
2-Metil-2-butenal	0.2	1.5	1.5	0.4
n.i. 1 (138,95,109,123)	1.3	0.7	0.6	0.1
n.i. 2 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.2
n.i. 3 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.2
n.i. 4 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.1
n.i. 5 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.1
Tetrahidro-2-metoxi-(2H)-pirano	0.5	0.9	1.0	0.0
n.i. 6 (84,110,137)	0.0	0.0	0.0	0.2
1-butanol, 3-methyl	4.0	4.6	4.9	7.0
n.i. 7 (84,110,137)	0.0	0.0	0.0	0.1
3-Metil-3-buten-1-ol	2.9	2.6	3.1	1.2
Estireno	0.4	1.3	0.8	0.5
Acetoina	0.7	0.7	0.5	0.2
Hidroxipropanona	0.4	0.3	0.1	0.2

COMPUESTOS	Miel fresca	1 año		
		10°C	20°C	40°C
2-Metil-2-buten-1-ol	2.7	1.7	1.4	0.6
1-Hexanol	0.8	0.6	0.5	0.3
3-Hexen-1-ol	0.6	0.5	0.5	0.1
Nonanal	1.1	0.6	0.3	0.3
Ciclohexanol	0.3	0.2	0.1	0.2
n.i. 9 (117,132)	0.3	0.1	0.0	0.0
Óxido de linalilo (cis)	1.2	1.2	1.3	3.5
4-Octen-1-ol	1.2	0.9	0.6	0.4
1-Heptanol	0.3	0.2	0.1	0.0
Ácido acético	6.5	6.8	6.2	2.9
Óxido de linalilo (trans)	0.6	0.5	0.7	1.3
Furfural	1.7	2.7	4.4	24.0
2-Etil-1-hexanol	1.9	0.6	0.6	0.8
Decanal	0.6	0.2	0.0	0.0
1-(2-Furanyl)etanona	0.4	0.3	0.6	3.2
Benzaldehido	5.6	5.0	4.6	3.1
Linalol	0.5	0.5	0.5	0.0
2-Metil-4-hexin-3-ona	1.4	0.8	1.1	0.2
2,3-Butanodiol	2.2	1.4	2.2	0.0
5-Metil-2-furancarboxaldehido	0.0	0.0	0.0	15.0
Isoforona	2.4	2.3	2.7	1.1
Hotrienol	1.8	1.1	1.3	0.2
Fenilacetaldehido	10.9	12.7	11.6	4.2
2-Furanmetanol	1.9	1.4	0.9	1.8
2-Hidroxi-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexenona	1.6	1.4	1.6	0.8
Ácido 3-metilbutanoico	0.7	1.0	1.3	0.4
4-Oxoisoforona	2.8	3.0	3.3	0.8
Endo-borneol	0.3	0.0	0.0	0.0
4-Octino	0.2	0.0	0.0	0.0
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	0.8	0.4	0.3	2.0
2,6,6-trimetil-2,4-cicloheptadien-1-ona	0.3	0.0	0.0	0.0
2,2,6-trimetil-1,4-ciclohexanodiona	0.6	0.4	0.6	0.5
Fenilacetato de etilo	0.6	0.0	0.0	0.0
β-Damascenona	1.1	0.7	1.3	2.0
3-Fenilfurano	0.3	0.6	0.4	0.0
Alcohol bencílico	2.3	1.2	1.6	1.1
2-Feniletanol	4.2	2.1	3.1	1.8
4-Metil-1-naftalenol	0.7	0.3	0.0	0.0
Ácido 2-etilhexanoico	3.3	5.8	4.4	1.0
Benzenacetnitrilo	1.5	0.7	0.8	0.7
n.i. (123)	1.1	0.2	0.2	0.6
n.i. (109,194)	1.3	0.7	0.9	0.9
2-(2-Metil-2-propenil)fenol	0.8	0.6	0.9	2.5
n.i. (127)	2.2	1.3	2.2	1.7

**Tabla 3.** Concentraciones relativas (%) de los compuestos volátiles de una miel de ROBLE fresca y tras 1 año de almacenamiento a 10°, 20° y 40°C, obtenidos mediante fraccionamiento por SPME y análisis por GC-MS.

COMPUESTOS	Miel fresca	1 año		
		10°C	20°C	40°C
Sulfuro de dimetilo	4.7	9.3	13.9	3.0
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	1.8	1.1	4.1	2.6
Etanol	4.4	4.7	5.8	1.8
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	1.4	1.1	1.7	0.9
Disulfuro de dimetilo	0.5	0.7	0.6	0.1
2-Metil-2-butenal	1.1	2.3	0.9	0.8
Metilbutenal	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metil-1-butanol	2.2	3.9	3.7	5.5
3-Metil-3-buten-1-ol	4.9	4.7	4.3	1.2
Dihidro-2-metil-3(2H)-Furanona	0.0	0.0	0.0	3.2
Acetoina	2.5	2.5	1.6	0.5
1-Hidroxi-2-propanona	0.0	0.3	0.3	0.5
2-Metil-2-buten-1-ol	3.6	1.8	1.7	0.4
1-Hexanol	0.4	0.8	0.5	0.3
3-Hexen-1-ol	1.0	0.6	2.6	0.4
Nonanal	0.6	0.7	0.0	0.2
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	3.2	3.2	2.8	2.1
Ácido acético	14.4	21.9	21.3	9.3
Furfural	4.7	3.9	4.4	21.0
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	2.8	2.4	2.3	1.1
2-Etil-1-hexanol	0.9	0.6	0.3	1.1
1-(2-Furanil)etanona	1.0	1.1	0.6	4.0
Benzaldehido	20.9	10.6	7.8	1.3
n.i. (67,109)	6.2	3.5	3.5	0.6
2,3-Butanodiol	2.9	2.0	2.0	1.6
5-Metilfurfural	1.0	6.0	3.6	27.6
Hotrienol	0.0	0.0	0.0	0.0
Dihidro-2(3H)-Furanona	0.7	0.5	0.4	0.4
Fenilacetaldehido	2.4	1.8	2.3	0.9
2-Furanmetanol	0.9	0.6	0.4	2.4
Ácido 3-metilbutanoico	1.3	1.0	0.9	1.3
2-Hidroxibenzaldehido	0.6	0.3	0.6	0.0
alpha-terpinoleno	0.6	0.4	0.3	0.1
endo-Borneol	1.5	1.5	1.1	0.8
1-Decanol	0.8	0.0	0.0	0.0
3,5-Dimetil-4H-piran-4-ona	0.0	0.0	0.0	0.0
Alcohol bencílico	0.4	0.5	0.2	0.2
2-Feniletanol	1.8	1.4	0.9	0.5
Ácido 2-etilhexanoico	2.1	2.5	2.6	1.9
2-Metoxi-6-metilpirazina	0.0	0.0	0.0	0.4
3,4,5-Trimetilfenol	0.0	0.0	0.0	0.0
Ácido benzoico	0.0	0.0	0.0	0.0



COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
		2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
n.i. (94,79,119,152)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Alcohol bencílico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.4	0.7	0.2	0.2	0.2
2-Feniletanol	0.0	0.8	0.9	0.7	1.2	0.9	1.0	1.4	0.8	2.1	1.1	1.0	1.0
Ácido 2-etilhexanoico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Antranilato de metilo	2.4	2.9	2.4	2.8	2.6	2.0	2.1	1.5	1.4	1.6	0.9	1.4	1.0

**Tabla 5.** Concentraciones relativas de los compuestos volátiles de la miel de BREZO calentadas a 40°C (2, 8 y 16h), 60°C (1, 2, 4, 12 y 16h) y 80°C (1, 2, 4 y 8h), así como la obtenida para la miel sin calentar (Sin Cal).

COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
		2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
Sulfuro de dimetilo	6.9	7.1	6.9	9.8	9.3	6.8	5.9	7.4	4.2	7.7	7.9	5.5	4.5
Acetona	2.8	4.3	4.1	4.0	6.9	5.4	2.7	2.3	0.8	4.2	4.1	2.6	1.2
2-Butanona	0.5	1.1	0.7	0.3	0.7	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5	0.4	0.3	0.2
2-Metilbutanal	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.5	0.2	0.4	0.6	0.7	1.3
3-Metilbutanal	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.5	0.8	1.2	1.1	1.9
Etanol	3.6	2.3	2.8	5.8	3.6	2.7	2.9	2.2	1.0	3.5	3.6	2.0	1.6
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	1.3	1.0	1.0	1.7	0.9	1.1	0.8	1.3	0.9	0.6	0.6	0.3	0.3
2,5-Dimetilfurano	0.0	1.5	1.1	0.8	0.8	0.7	0.2	0.6	0.2	0.5	0.5	0.4	0.2
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	0.5	0.4	0.7	0.7	0.6	0.4	0.2	0.4	0.1	0.6	0.5	0.4	0.3
Acetonitrilo	0.3	0.4	0.5	0.7	0.6	0.4	0.4	0.5	0.1	0.6	0.7	0.3	0.3
α-Pineno	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tolueno	0.0	8.5	2.7	3.6	2.5	4.4	1.3	1.5	3.8	1.8	1.4	1.9	1.3
Disulfuro de dimetilo	0.2	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.1	0.4	0.2	0.4	0.3	0.3	0.2
2-Metil-2-butenal	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	0.6	0.3	0.9	0.2	0.7	0.7	0.6	0.6
n.i. 1 (138,95,109,123)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 2 (101,55,73)	0.0	0.0	1.0	0.9	0.8	0.9	1.4	0.7	0.6	0.6	1.2	0.8	0.2
n.i. 3 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 4 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 5 (101,55,73)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tetrahydro-2-metoxi-2H-pirano	0.6	0.5	0.7	0.6	0.4	0.5	0.8	0.8	0.7	0.6	0.9	0.8	0.6
n.i. 6 (84,110,137)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-butanol, 3-methyl	4.1	2.3	2.5	2.8	3.4	2.3	2.1	2.3	1.3	2.3	1.9	0.8	0.7
n.i. 7 (84,110,137)	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3-Metil-3-buten-1-ol	2.3	2.2	2.4	2.8	2.8	2.3	2.0	1.8	1.3	1.9	1.7	1.0	0.8
Estireno	0.3	1.9	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.3
Acetoina	0.7	0.5	0.6	0.4	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.5	0.3	0.2	0.2
Hidroxiopropanona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.9	0.1	0.1	0.3
2-Metil-2-buten-1-ol	3.0	1.7	2.0	2.2	2.3	1.6	1.9	1.7	1.1	1.7	1.5	0.9	0.7
1-Hexanol	0.7	0.8	1.0	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.5	0.6	0.5	0.5	0.3
3-Hexen-1-ol	0.8	0.5	0.6	0.5	0.4	0.6	0.6	0.4	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3
Nonanal	0.3	0.7	1.0	0.9	0.3	0.6	0.8	0.7	0.9	0.5	0.9	1.1	0.6
Ciclohexanol	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n.i. 9 (117,132)	0.2	0.2	0.2	0.2	1.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.2



COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
		2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
Óxido de linalilo (cis)	1.2	1.1	1.2	1.4	1.3	0.8	0.8	1.2	0.7	1.1	0.8	0.7	0.6
4-Octen-1-ol	1.1	1.5	1.7	1.4	0.2	1.3	1.2	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.6
1-Heptanol	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0
Ácido acético	8.1	5.7	4.9	6.0	6.9	6.7	6.0	3.3	3.7	5.9	4.1	3.1	3.9
Óxido de linalilo (trans)	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
Furfural	1.3	1.4	1.7	1.8	1.6	2.7	4.1	14.0	20.1	5.9	9.0	11.7	22.6
2-Etil-1-hexanol	2.5	0.5	0.0	0.0	1.2	0.8	3.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Decanal	0.5	0.7	0.6	0.5	0.5	0.5	0.7	0.3	0.7	0.4	0.8	0.5	0.3
1-(2-Furanil)etanona	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.7	0.6	0.8	0.9	0.5	0.4	0.5	0.7
Benzaldehido	6.7	5.9	6.1	5.5	5.4	6.3	10.4	4.9	7.6	8.8	10.8	13.4	12.8
Linalol	0.5	0.7	0.7	0.6	0.3	0.2	0.5	0.6	0.2	0.2	0.3	0.6	0.2
2-Metil-4-hexin-3-ona	0.0	0.0	2.0	0.6	1.6	1.8	1.4	1.4	1.4	1.1	1.1	1.0	0.7
2,3-Butanodiol	2.8	0.8	1.6	3.1	0.3	1.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.4	1.3	0.8
5-Metil-2-furancarboxaldehido	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.3	0.0	0.3	0.5
Isoforona	2.9	1.8	3.0	3.0	2.8	2.6	1.9	1.8	1.3	1.9	1.8	1.6	1.1
Hotrienol	1.1	1.6	2.4	1.9	2.3	2.0	0.7	4.9	3.3	3.3	4.0	5.2	5.0
Fenilacetaldehido	15.2	12.1	13.4	10.9	11.4	13.1	19.6	13.0	17.8	16.7	16.5	18.3	13.4
2-Furanmetanol	1.9	3.0	1.6	1.6	2.8	2.7	1.9	3.2	1.6	3.0	1.0	1.2	2.7
2-Hidroxi-3,5,5-trimethyl-2-ciclohexenona	0.6	0.7	0.9	0.7	0.7	0.6	0.5	0.5	0.3	0.6	0.5	0.5	0.3
Ácido 3-metilbutanoico	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	0.8	1.0	0.6	0.4	0.7	0.6	0.5	0.7
4-Oxoisoforona	3.3	2.6	3.1	2.2	2.3	2.3	2.1	1.7	1.4	2.1	1.8	1.5	1.3
Endo-borneol	0.0	0.0	0.0	0.8	0.4	0.2	0.0	0.2	0.0	0.3	0.2	0.2	0.2
4-Octino	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1,2-Dihidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	0.0	1.5	1.4	1.1	1.0	0.9	0.8	1.4	1.8	0.8	1.1	1.0	0.8
2,6,6-trimetil-2,4-cicloheptadien-1-ona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,2,6-trimetil-1,4-ciclohexanodiona	0.2	0.5	0.4	0.3	0.3	0.5	0.0	0.5	0.0	0.3	0.2	0.2	0.3
Fenilacetato de etilo	0.5	0.6	0.6	0.5	0.3	0.7	0.4	0.3	0.3	0.5	0.2	0.3	0.2
β-Damascenona	1.5	1.8	2.0	1.3	1.4	1.4	1.1	2.0	1.9	1.1	1.5	1.5	1.4
3-Fenilfurano	0.9	1.3	1.2	1.1	1.3	1.1	0.7	0.8	1.0	1.0	1.0	0.9	0.6
Alcohol bencílico	2.9	2.0	1.9	1.7	2.0	2.2	2.4	1.8	1.0	1.2	1.2	1.1	1.2
2-Feniletanol	5.2	3.8	3.7	3.0	3.6	4.0	4.7	3.0	3.9	3.1	2.2	3.0	2.9
4-Metil-1-naftalenol	0.7	0.8	0.7	0.6	0.8	0.7	0.8	0.5	0.8	0.6	0.6	0.6	0.4
Ácido 2-etilhexanoico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Benzenacetnitrilo	1.6	1.4	1.4	1.2	1.4	1.5	1.3	1.1	1.3	1.1	1.1	1.2	1.0
n.i. (123)	0.5	0.7	0.8	0.5	0.3	0.7	0.4	0.5	0.5	0.5	0.2	0.5	0.3
n.i. (109,194)	0.0	1.1	1.1	0.9	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	1.0	0.6	0.6	0.5
2-(2-Metil-2-propenil)fenol	0.6	0.9	0.9	0.6	0.7	1.1	0.4	1.4	1.4	1.0	1.0	1.1	0.9
n.i. (127)	2.7	2.3	2.5	1.9	1.8	2.2	2.0	1.4	1.6	1.5	1.1	1.4	1.4

**Tabla 6.** Concentraciones relativas de los compuestos volátiles de la miel de ROBLE calentadas a 40°C (2, 8 y 16h), 60°C (1, 2, 4, 12 y 16h) y 80°C (1, 2, 4 y 8h), así como la obtenida para la miel sin calentar (Sin Cal).

COMPUESTOS	Sin Cal.	T=40° C			T=60° C					T=80° C			
		2h	8h	16h	1h	2h	4h	12h	16h	1h	2h	4h	8h
Sulfuro de dimetilo	5.4	15.5	11.2	11.4	17.1	13.1	8.9	8.4	4.9	16.2	17.8	15.6	8.3
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	3.1	1.4	2.4	4.7	2.6	7.2	4.4	3.2	1.7	3.8	2.5	3.6	1.7
Etanol	3.1	3.6	1.0	1.4	1.6	1.5	1.2	1.1	0.8	2.0	2.3	1.4	1.5
2,4,5-Trimetil-1,3-dioxolano	1.1	1.6	1.2	1.4	1.5	1.3	1.0	0.7	0.4	1.5	1.7	1.1	0.7
Disulfuro de dimetilo	0.7	0.9	0.5	0.5	0.9	0.7	0.6	0.4	0.0	0.5	1.2	0.7	0.2
2-Metil-2-butenal	1.9	1.2	1.2	1.4	1.3	1.5	1.0	1.2	0.5	1.8	0.7	1.7	1.6
Metilbutenal	0.9	1.1	0.9	1.3	0.9	0.9	1.2	1.1	0.4	2.8	2.5	1.8	1.0
3-Metil-1-butanol	4.4	2.2	1.7	2.4	2.3	2.7	1.7	1.8	0.6	2.7	2.4	1.7	1.2
3-Metil-3-buten-1-ol	3.9	3.8	3.2	3.6	4.7	3.6	2.5	2.6	1.8	4.3	2.0	2.1	1.6
Dihidro-2-metil-3(2H)-Furanona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Acetoina	2.3	1.7	1.8	2.0	2.0	1.7	1.1	1.5	0.7	1.8	2.0	1.1	1.0
1-Hidroxi-2-propanona	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3	0.0	0.2	0.2
2-Metil-2-buten-1-ol	1.8	2.3	1.6	1.9	2.5	2.1	1.7	1.4	0.7	1.1	1.2	0.8	0.5
1-Hexanol	0.5	0.8	0.7	0.7	0.9	0.6	0.6	0.7	0.4	0.7	0.7	0.6	0.3
3-Hexen-1-ol	0.6	1.0	0.6	0.4	0.3	0.4	0.5	0.9	0.5	0.8	0.6	0.6	0.5
Nonanal	0.0	0.0	0.2	0.5	0.4	0.4	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	0.6
Óxido de linalilo ( <i>cis</i> )	2.4	3.0	2.1	2.8	2.9	2.7	2.4	2.6	1.3	2.9	2.5	2.7	1.5
Ácido acético	25.0	19.2	22.1	19.1	18.5	13.9	17.2	18.7	18.2	11.9	8.0	7.5	6.2
Furfural	3.1	2.2	2.9	3.3	2.5	2.8	5.5	12.5	24.1	9.3	10.4	11.3	23.7
Óxido de linalilo ( <i>trans</i> )	2.3	2.2	1.5	1.9	2.2	1.7	0.3	1.8	0.3	2.0	1.7	1.5	0.8
2-Etil-1-hexanol	0.0	0.0	0.0	2.2	5.4	4.0	13.0	0.2	0.3	0.4	4.3	0.1	0.0
1-(2-Furanyl)etanona	0.4	0.8	0.1	0.2	1.1	0.5	0.4	0.9	1.0	1.0	0.6	0.8	1.0
Benzaldehido	8.9	8.4	10.0	11.0	7.7	10.8	10.5	8.2	11.4	6.8	13.6	14.4	11.8
n.i. (67,109)	3.6	4.2	4.2	2.9	3.9	3.9	3.3	4.7	2.9	4.3	3.2	3.9	3.2
2,3-Butanodiol	8.7	7.8	8.5	9.4	7.0	2.4	2.6	3.2	2.6	3.7	2.5	3.9	2.4
5-Metilfurfural	0.7	0.5	0.5	0.6	0.5	0.5	0.2	1.2	1.5	0.8	0.9	1.1	2.3
Hotrienol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	1.1	1.2	1.6	0.4
Dihidro-2(3H)-Furanona	0.7	0.4	0.5	0.4	0.4	4.9	0.2	0.5	0.2	0.6	0.2	0.0	0.3
Fenilacetaldehido	1.4	2.1	2.6	2.4	2.6	2.8	5.7	5.0	6.5	5.1	6.1	5.3	5.7
2-Furanmetanol	1.0	1.1	1.0	0.9	1.2	0.9	1.0	1.8	0.9	0.6	0.5	0.5	0.4
Ácido 3-metilbutanoico	0.6	0.9	0.4	0.7	0.9	1.3	0.6	0.6	0.4	0.9	0.5	0.7	0.5
2-Hidroxibenzaldehido	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.3	0.3	0.3	0.4	1.6	0.8	1.2	0.8
α-Terpinoleno	0.4	0.6	0.3	0.2	0.0	0.3	0.3	0.4	0.3	0.6	0.5	0.5	0.4
endo-Borneol	0.8	1.3	1.6	1.3	1.3	1.3	1.5	1.1	1.0	1.4	0.9	1.9	1.6
1-Decanol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3,5-Dimetil-4H-piran-4-ona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
Alcohol bencílico	0.4	0.5	0.7	0.3	0.6	0.4	0.2	0.8	0.7	0.2	0.0	0.0	0.0
2-Feniletanol	1.7	1.3	1.9	1.5	1.4	1.2	2.0	1.7	2.0	1.8	0.9	1.2	1.3
Ácido 2-etilhexanoico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Methoxi-6-metilpiracina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.2
3,4,5-Trimetilfenol	7.5	3.6	7.3	3.7	0.5	2.6	4.6	5.4	6.4	0.9	1.2	4.4	6.5
Ácido benzoico	0.2	2.3	3.2	1.3	0.0	2.6	1.1	2.0	2.2	1.2	0.2	0.3	5.8