



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Caracterización fenólica de miel de mielada



Marta López Villalobos



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso 2017-2018

Caracterización fenólica de miel de mielada

Marta López Villalobos

Presentación: Junio 2018

Departamento de Química Analítica

Tutora: María Dolores Hernanz Vila

Tipología del trabajo: Experimental

RESUMEN

La miel es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure. La miel de mielada es aquella que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas. Las principales diferencias entre la miel de néctar y de mielada son en la de conductividad eléctrica, el pH y la acidez. A lo largo del tiempo, la miel ha sido utilizada no solamente por sus propiedades nutritivas sino también por sus propiedades beneficiosas para la salud como son su acción antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antiséptica y cicatrizante

Los compuestos fenólicos además de contribuir a las características sensoriales de la miel participan junto a otro grupo de constituyentes minoritarios en la actividad antioxidante. La determinación de los compuestos fenólicos se lleva a cabo mediante técnicas de separación, primero se realiza una extracción en fase sólida seguida de una extracción líquido-líquido y posteriormente el extracto se analiza en un cromatógrafo de líquidos.

El proceso analítico puede entenderse como un proceso de tres etapas distintas que se construyen en relación con la etapa central de medida. Estas etapas son: toma y preparación de la muestra, medida de la señal analítica y toma de datos y el tratamiento de datos y la expresión de resultados. Mediante la calibración metodológica realizamos el tratamiento de datos estableciendo una relación entre la respuesta de un instrumento obtenida del cromatógrafo y la concentración analítica. En este estudio se han identificado distintos ácidos hidroxibenzoicos como son: el ácido gálico, protocatéquico, vainillico, siríngico y *p*-hidroxibenzoico y derivados del ácido siríngico y *p*-hidroxibenzoico, ácidos hidroxicinámicos como ácidos *p*-cumárico y cafeico y por último galangina, naringenina, crisina y pinocembrina como flavonoides.

Palabras claves: miel de mielada, compuestos fenólicos, tratamiento de datos.

ÍNDICE

RESUMEN

1.	INTRODUCCIÓN	6
1.1	La miel.....	7
1.1.1	Miel de mielada	7
1.2	Compuestos fenólicos	10
1.3	Proceso analítico general	10
1.3.1	Definición del problema	11
1.3.2	Selección del método	11
1.3.3	Toma de muestra	11
1.3.4	Preparación de la muestra	11
1.3.5	Medida y tratamiento de los datos	12
1.3.6	Interpretación de los resultados	12
1.4	Etapas de medida, tratamiento y evaluación de datos	14
2.	OBJETIVOS	14
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1	Determinación de los compuestos fenólicos	14
3.1.1	Muestras.....	14
3.1.2	Metodología	17
3.1.3	Calibración	20
3.2	Herramientas de exploración de datos.....	20
3.2.1	Estadística descriptiva: Medidas de tendencia central y dispersión	20
3.2.2	Herramientas básicas de calidad	22
3.3	Tratamiento de datos	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1	Ácidos fenólicos	23
4.1.1	Ácidos hidroxibenzoicos	25
4.1.2	Ácidos hidroxicinámicos	26
4.2	Flavonoides	27
4.3	Composición fenólica de las mieles de mielada	29

5.	CONCLUSIONES	29
6.	BIBLIOGRAFÍA	32
7.	ANEXO	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La miel

La miel es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure (RD 1049/2003). Las propiedades y la composición química de la miel dependen de su origen geográfico, tiempo de recolección, factores ambientales, así como del tratamiento de los apicultores (El Sohaimy et al., 2015). Al ser producida por las abejas, algunos componentes de la miel son agregados por las mismas, otros provienen de las plantas, y otros se deben a reacciones bioquímicas que se dan durante la maduración de esta. El resultado es una mezcla compleja principalmente de carbohidratos (70-80 % p/p), agua (10-20 % p/p) y una gran cantidad de componentes entre los que se incluyen, aminoácidos, proteínas, enzimas, hormonas, lípidos, compuestos fenólicos, vitaminas, aceites esenciales, pigmentos, esteroides, fosfolípidos y sales minerales. Debido a que la miel es alimento con una alta concentración de azúcares, si se almacena a temperaturas por debajo de 25 °C puede llegar a perder su calidad (Krell, 1996).

La miel es apreciada no sólo por su sabor sino también por su alto valor nutritivo y su contribución en la salud humana (Pita-Calvo y Vázquez, 2016). Esta es consumida mundialmente debido a que su composición química le aporta actividad antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria (Deng et al., 2018). Diversos estudios han demostrado que la principal actividad antimicrobiana se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa, por otro lado, la acidez debida a la presencia de ácidos orgánicos le da un pH de 3.5-4.5 lo que le confiere un importante factor antimicrobiano. Kassim et al. (2010) han estudiado el efecto de la miel sobre los mediadores de la inflamación, su actividad antioxidante está relacionada con la concentración de ácido ascórbico, compuestos fenólicos, carotenoides, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas. Por otra parte, la baja tensión superficial de la miel permite que sea un excelente humectante

incorporándose a productos cosméticos (Krell, 1996; Estrada et al., 2005; Güal y Pehlivan, 2018). Los parámetros fisicoquímicos que pueden caracterizar la miel son el pH, la acidez, la actividad de la enzima diastasa (que indica el grado de frescura de la miel) y el contenido de hidroximetilfurfural (Terrab et al., 2002).

Se pueden distinguir distintos tipos de miel atendiendo a diferentes parámetros (RD 1049/2003):

- *Según su origen:* miel de flores o néctar y miel de mielada.
- *Según su elaboración o su presentación:* miel en panal, con trozos de panal o panal cortado en miel, miel escurrida, miel centrifugada, miel prensada, miel filtrada y miel para uso industrial.

1.1.1 Miel de mielada

La miel de mielada es aquella que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas como las encinas, alcornoques, robles, hayas, castaños, tilos, sauces, abetos, etc.

Estos insectos tienen unas piezas en su aparato bucal con las que rompen la superficie de los vegetales. Cuando esto ocurre, la savia sale al exterior impulsada por la presión interna de la planta y por la succión del insecto. Sin embargo, el insecto succiona tal cantidad de savia que excede varias veces su propio peso, y el sobrante, después de sufrir transformaciones digestivas dentro del cuerpo, es depositado en el vegetal en forma de gotitas que se conocen como mielatos, ligamaza o mielada que recolectan otros insectos tales como las hormigas y las abejas. Los principales productores de mielato son aquellos insectos que chupan directamente de los haces vasculares (Sancho et al., 1991).

Las principales diferencias entre la miel de néctar y de mielada son en la de conductividad eléctrica, el pH y la acidez presentando mayores valores en la miel de mielada. Además estas últimas tienen mayor contenido de cenizas y son más oscuras. Las mieles de mielada tienen un perfil glucídico diferente a las mieles de néctar y también presentan mayor contenido en disacáridos y trisacáridos, y menor en glucosa

y fructosa. Por otro lado, la miel de mielada tiene mayor concentración de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, así como una mayor actividad antioxidante (Shantal et al., 2015; Pita-Calvo y Vázquez, 2016).

1.2 Compuestos fenólicos

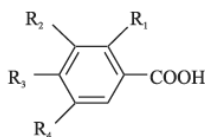
El estudio de la fracción fenólica de la miel es importante, ya que estos están íntimamente relacionados con la actividad antioxidante. Por otra parte, el contenido en compuesto fenólicos y específicamente de flavonoides de la miel, podría ser no solamente un marcador del origen floral sino también un indicador potencial de su calidad biológica (Montenegro et al., 2008).

Uno de los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar el contenido en fenoles totales en alimentos es el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivos de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (Gutiérrez et al., 2008).

Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente muy heterogéneo, con aproximadamente 10000 compuestos, que se agrupan en diferentes clases de acuerdo con su estructura química. Se pueden dividir en ácidos fenólicos y flavonoides. Los ácidos fenólicos a su vez se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, mientras que los flavonoides en flavanonas, flavonoles y flavonas (Harborne, 1989).

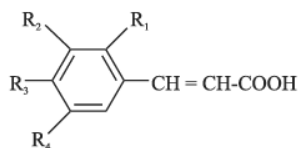
Los ácidos hidroxibenzoicos poseen una estructura general derivada del ácido benzoico C1-C6 entre ellos se encuentran el ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatético y vainillico. Por otra parte, los ácidos hidroxicinámicos, como son los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, tienen una estructura general de C3-C6 y se diferencian en el tipo de sustituyente del anillo (**Figura 1**).

a)



Ácido salicílico: $R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}$
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$
 Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$
 Ácido gálico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
 Ácido siríngico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$

b)



Ácido cinámico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido *o*-cumárico: $R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido *m*-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$
 Ácido *p*-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$
 Ácido caféico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$
 Ácido sinápico: $R_1 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}$

Figura 1.- a) ácidos hidroxibenzoicos y b) ácidos hidroxicinámicos.

Los compuestos flavonoides tienen una estructura C6-C3-C6, que implica dos anillos de benceno conectados por un anillo de pirano (**Figura 2**). Estos representan el grupo mayoritario de compuestos fenólicos presentes en los vegetales. Están ampliamente distribuidos en las semillas, cortezas, hojas y flores de plantas y árboles. En las plantas son compuestos responsables de proporcionar protección frente a la radiación ultravioleta y los patógenos.

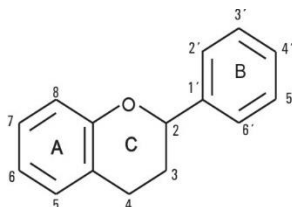


Figura 2.- Estructura general flavonoides.

Los principales componentes funcionales de la miel son los flavonoides (**Figura 3**), y contribuyen a la actividad antioxidante. Dicha actividad, en la mayoría de los casos depende del número y la posición de los grupos hidroxilo y de los otros sustituyentes. Da silva et al. (2005) estudian que la presencia de grupos hidroxilos en el anillo A y B, el doble enlace en la posición 2,3 y el grupo 4-oxo en el anillo C (**Figura 2**) aumentan la actividad antioxidante, mientras que la glicosilación la disminuye.

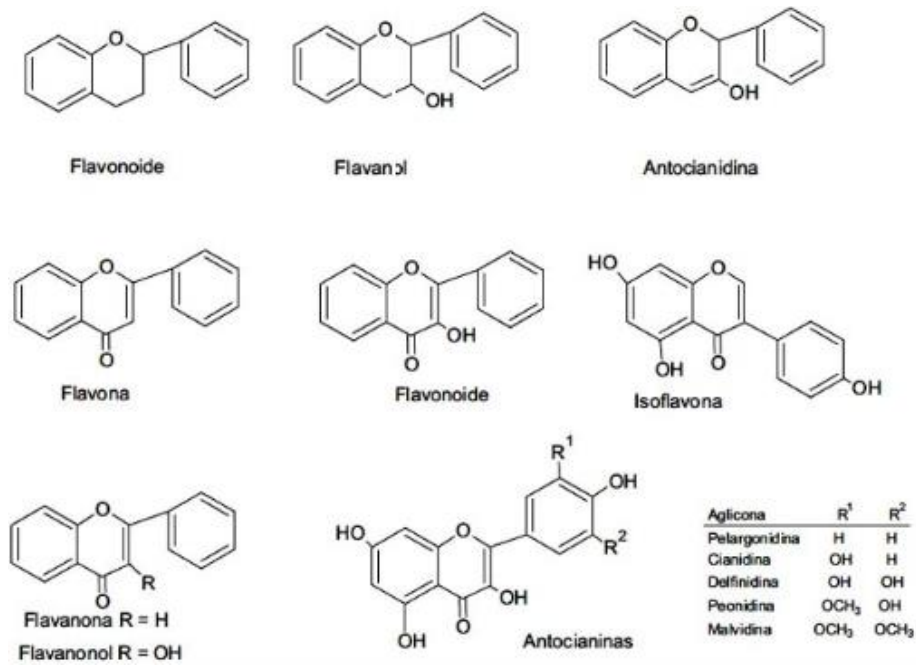


Figura 3.- Flavonoides.

1.3 Proceso analítico general

El proceso analítico es el conjunto de operaciones que transcurren desde que se plantea un problema hasta que se obtiene un resultado (Figura 4). Un científico traslada este problema a la necesidad de hacer unas medidas concretas y el químico analítico debe escoger un procedimiento para realizar estas medidas (Harris, 2007).

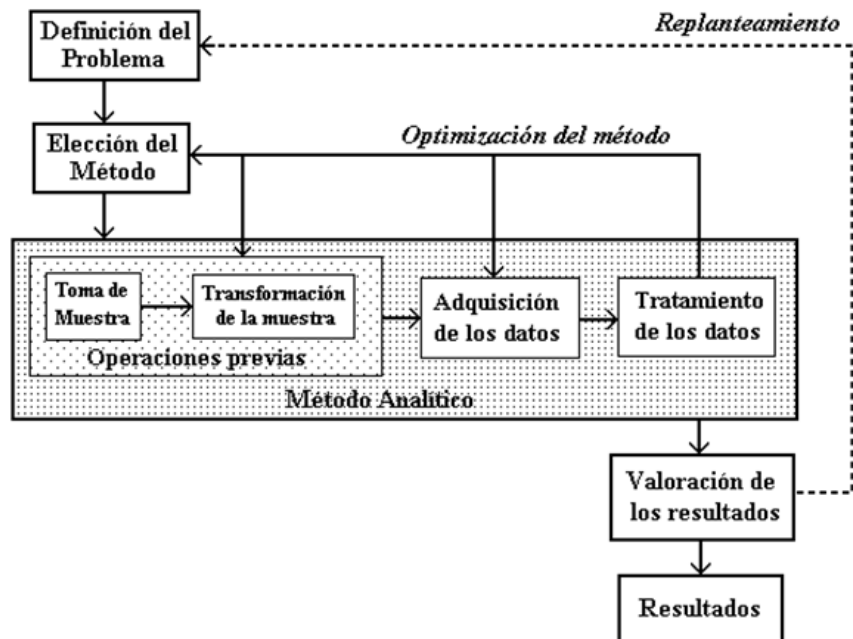


Figura 4.- Esquema del Proceso Analítico (*Valcárcel, 1999*).

Las etapas del proceso analítico general son definición del problema, selección de método analítico, toma de muestra, preparación de la muestra, medida y tratamiento de los datos y por último la Interpretación de los resultados.

1.3.1 Definición del problema

Antes de que el analista pueda elegir un procedimiento de análisis, debe saber qué información se necesita, quién la necesita, para qué propósito, y qué tipo de muestra se va a analizar. El analista debe tener buena comunicación con el cliente. La forma de realizar un análisis depende de la información que se requiera.

1.3.2 Selección de método analítico

El segundo paso esencial de cualquier proceso analítico general es la selección de un método. En esta etapa se debe decidir el diseño y planificación del proceso analítico más adecuado para alcanzar los objetivos. Para ello hay que tener en cuenta los siguientes factores: características de la información requerida; características de la muestra; medios materiales, instrumentales y humanos disponibles y el precio del análisis.

1.3.3 Toma de muestra

Esta etapa es una de la más crítica del proceso analítico, consiste en la selección de una porción de muestra de forma que ésta sea representativa o proporcione información del conjunto del material o lote. La problemática de esta etapa es que las muestras no son homogéneas, sino que por el contrario, presentan discontinuidades tanto en su composición como en el contenido del analito, pudiendo ser la heterogeneidad de la muestra tanto en el tiempo como el espacio

1.3.4 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es el proceso destinado a convertir la muestra representativa en una forma adecuada para el análisis químico, se debe tener cuidado de no alterar ni contaminar la muestra. Dependiendo del tipo de muestra se llevarán a cabo distintos tipos de procedimientos para conseguir por un lado la adecuación física

y por otro la eliminación o separación de los constituyentes de la matriz que puedan interferir en la medida de la magnitud analítica.

1.3.5 Medida y tratamiento de los datos

Esta etapa se basa en la observación y/o determinación de una propiedad de la especie que se quiere analizar mediante la utilización de un instrumento de medida. Se obtiene una señal analítica que se traduce en información química con la comparación de estándares o patrones analíticos a través de la calibración metodológica. Hay que medir en varias alícuotas con el fin de establecer la variabilidad del análisis.

1.3.6 Interpretación de los resultados

El proceso analítico comienza con el planteamiento de un problema y ha de terminar con la resolución. Para lo cual, los datos obtenidos han de relacionarse con la finalidad perseguida en el análisis. La interpretación de los datos puede realizarse mediante la aplicación de métodos estadísticos.

1.4 Etapa de medida, tratamiento y evaluación de datos

El proceso analítico puede entenderse como un proceso de tres etapas bien diferenciadas que se construyen en relación con la etapa central de medida. Estas etapas son: toma y preparación de la muestra, medida de la señal analítica y toma de datos y el tratamiento de datos y la expresión de resultados.

La etapa de medida se basa en la observación y/o determinación de una propiedad de la especie que se quiere analizar mediante la utilización de un instrumento de medida. Se obtiene una señal analítica que se traduce en información química con la comparación de estándares o patrones analíticos a través de la calibración metodológica. Con la calibración metodológica se establece la relación entre la respuesta de un instrumento y la concentración analítica (Valcárcel, 1999).

La calibración es definida en el vocabulario Internacional de Metrología (VIM, 2012) como el conjunto de operaciones que establecen, en condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por

patrones. En la calibración se requiere el uso de estándares químicos que contengan el analito, y se establece la relación entre la señal analítica y la concentración de analito realizando una gráfica de calibrado con su recta de calibración (Cuadros et al., 2013). Si la respuesta es lineal se realiza un ajuste aplicando el método de los mínimos cuadrados o regresión lineal simple (Rouessac et al., 2003).

Además, en esta última etapa del proceso analítico se pueden aplicar a los datos químicos otros métodos estadísticos que van a permitir obtener resultados fiables, expresar los resultados y extraer conclusiones (Gavira y Hernanz, 2007).

Antes de la aparición de los métodos computerizados de análisis, que hicieron posible la obtención de una gran cantidad de información analítica en tiempos relativamente cortos, los datos analíticos se obtenían principalmente a partir de procesos de análisis largos y costosos. Rápidamente, surgió la necesidad de encontrar métodos matemáticos para poder separar la información útil de aquella que no lo era, la solución de este problema propició el desarrollo de la quimiometría.

La quimiometría se define como la ciencia que aplica conocimientos matemáticos e informáticos a los sistemas químicos. La Sociedad Internacional de quimiometría la definió como la disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos y con ellos obtener la máxima información química mediante el análisis de datos químicos. Posteriormente, Massart (1997) definió la quimiometría como la disciplina química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, y obtener conocimientos a partir de sistemas químicos. Massart matizó dos hechos: que la información buscada debe ser relevante y que la información sobre el sistema químico debe transformarse en un conocimiento global sobre el problema en estudio.

Desde el punto de vista analítico, el objetivo de la quimiometría es extraer la máxima información de los sistemas materiales con unos recursos mínimos, usando datos químicos, de manera exclusiva o en combinación con datos de cualquier naturaleza que aporten información del problema que se desea resolver.

La quimiometría permite diseñar y realizar experimentos de mayor eficacia en la obtención de datos con un mínimo esfuerzo, así como extraer la mayor información de ellos, aumentando por tanto la calidad de los resultados y de las conclusiones obtenidas (Moros, 2007). Para el desarrollo de este Trabajo Fin de grado nos hemos centrado principalmente en las técnicas quimiométricas de análisis exploratorio de datos (preprocesado, reducción de dimensiones y representación gráfica) y estimación de los límites de confianza a las predicciones.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el tratamiento y evaluación de los datos obtenidos después de llevar a cabo un análisis de los compuestos fenólicos en mieles de mielada. En la realización de este estudio se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre la miel de mielada y su composición fenólica, así como conocer su importancia en las propiedades de calidad y los métodos de determinación.
- Conocer las etapas del proceso analítico general para la determinación de los compuestos fenólicos.
- Aplicar la calibración metodológica para establecer la relación entre las áreas de los picos del cromatograma y la concentración analítica.
- Realizar un análisis de los datos calculando, mediante interpolación en la recta de calibrado, las concentraciones correspondientes a cada compuesto con el fin de identificar y caracterizar la composición fenólica de las mieles de mielada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Determinación de los compuestos fenólicos

3.1.1 Muestras

Las muestras estudiadas son 58 mieles de mielada españolas proporcionadas directamente por los apicultores dedicados a la producción de este tipo de miel, siendo la mayoría de ellas de encina y roble. El valor medio de los parámetros físico-químicos se recoge en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Valor medio y desviación estándar de los parámetros físico-químicos de las mieles de mielada (Sánchez, 2016).

	Media	SD
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	1021	131
Humedad	16,5	1,5
pH	4,75	0,18
Cenizas (%)	0,68	0,13
<i>Acidez (meq/Kg)</i>		
Acidez libre	39,55	4,37
Acidez láctica	3,43	1,43
Acidez total	42,97	5,11
<i>Minerales (mg/L)</i>		
Al	0,012	0,018
Ca	1,6	0,77
Cu	0,019	0,006
Fe	0,029	0,033
K	28,1	4,7
Li	0,004	0,005
Mg	2,87	0,93
Mn	0,345	0,228
Na	0,319	0,128
P	3,2	0,48
S	1,33	0,308
Si	0,121	0,062

Entre los parámetros físico-químicos destaca la conductividad, cuyo valor medio permite clasificar a las muestras como mieles de mielada. Los valores de cenizas y acidez son acordes a los niveles encontrados en la miel de mielada en comparación con otro tipo de miel. Los valores de humedad y pH no permiten clasificar las muestras en uno u otro tipo de miel pero ambos se encuentran dentro de los límites según la norma de calidad de la miel.

En cuanto a los minerales, el potasio es el más abundante. También se encontraron en mayor proporción fósforo, magnesio, azufre, calcio, sodio y silicio; y en menor proporción aluminio, cobre, hierro y litio.

En la **Figura 5** se muestra el mapa de muestreo, donde se incluyen las provincias de Ávila, Burgos, Cáceres, Ciudad Real, Granada, León, Oviedo, Ourense, Salamanca, Toledo, Zamora y Zaragoza.

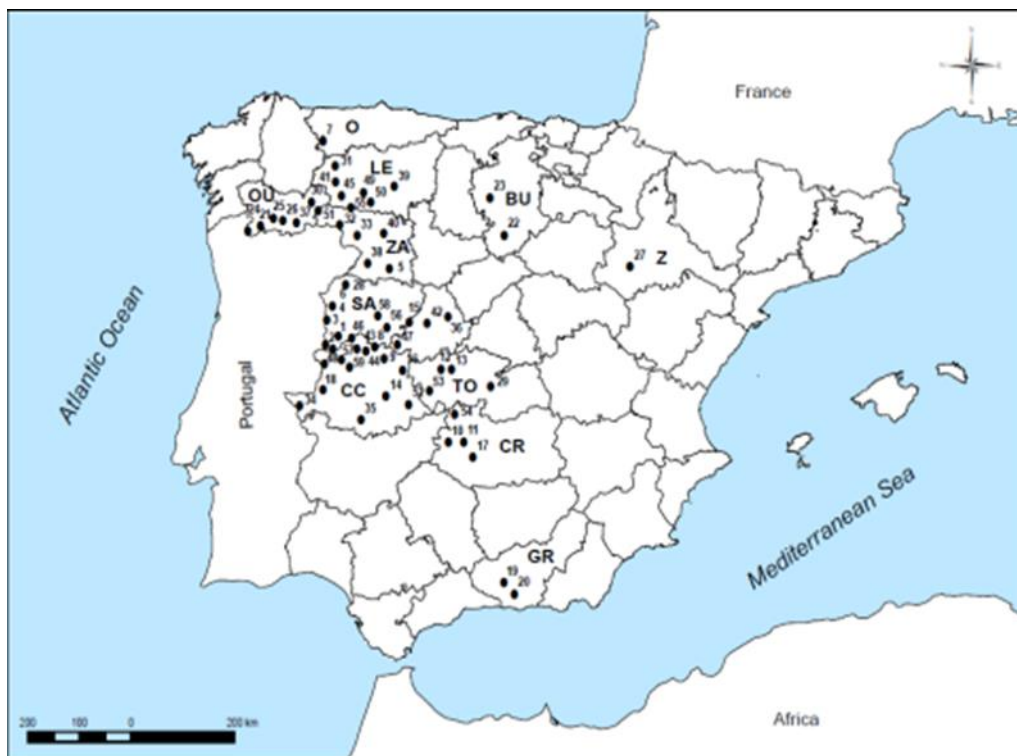


Figura 5.- Mapa de muestreo.

3.1.2 Metodología

La extracción de fenoles de las distintas muestras de mieles se llevó a cabo según el método descrito por Gheldof et al., (2002) con ligeras modificaciones. En primer lugar, se llevó a cabo una extracción en fase sólida. Esta técnica se basa en la diferente afinidad de los compuestos con una resina polimérica Amberlite XAD-2 la cual permite la adsorción de los compuestos fenólicos presentes en la miel.

La extracción en fase sólida consta de las siguientes etapas:

- *Etapas de acondicionamiento.* Para la activación de la resina polimérica es necesario pasar 3 mL de metanol, agua mili-Q y agua acidulada (pH=2 con HCl).
- *Carga de la muestra.* Se pesa 1 g de miel y se disuelve en 3 mL de agua (pH=2 con HCl). Esta disolución se hace pasar por el cartucho de manera que los compuestos fenólicos quedan retenidos en la resina.

- *Lavado*. Esta etapa permite la eliminación de los azúcares de la miel y posibles interferentes. Para ello se hace pasar por la columna 3 mL de agua mili-Q y agua acidulada.
- *Elución*. Finalmente se produce la elución de los compuestos fenólicos con 3 mL de metanol, disolvente orgánico polar que va a permitir la desorción de dichos componentes.

Para una correcta extracción es necesario controlar en todo momento el flujo de elución. Una vez obtenido el extracto, se concentró y se disolvió en 500 µL de agua mili-Q. A continuación se realizaron tres extracciones líquido-líquido con acetato de etilo (3 X 500 µL). Finalmente, las fases orgánicas se combinaron y se concentraron. El residuo seco se disolvió en 200 µL de fase móvil A (Ácido fórmico 0,01% v/v), se filtró (0,45 µm) y por último, 1 µL se inyectó en UHPLC (Palomar, 2015).

La determinación de compuestos fenólicos se realiza mediante cromatografía líquida ultra-rápida resolución (UHPLC 1260 Agilent Technologies).

Las fases móviles utilizadas son las siguientes:

- *Fase móvil A*: agua: ácido fórmico 99,99:0,01 (v:v)
- *Fase móvil B*: acetonitrilo

Para conseguir la resolución de los compuestos fenólicos en las muestras de miel se utilizó el gradiente de elución que se muestra en la **Tabla 2**. El flujo de fase móvil se mantuvo a 1 mL/min y la temperatura de la columna fue 20°C.

Tabla 2. Gradiente de elución

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
5	95	5
20	50	50
21	100	0
22	100	0

La longitud de onda de detección fue de 280 nm. La determinación cuantitativa se efectuó por calibración simple, a partir de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas.

3.1.3 Calibración simple

Para realizar la calibración se prepararon disoluciones de patrones de concentración conocida a partir de los estándares puros. Los patrones utilizados se muestran en la **Tabla 3** clasificados según su naturaleza química y el tiempo de retención como resultado del análisis cromatográfico. En la **Figura 6** se muestra un cromatograma de una muestra de miel de mielada obtenida en las condiciones definidas anteriormente.

Tabla 3. Clasificación de los patrones según su naturaleza química y tiempo de retención.

		Compuesto	TR (min)
ÁCIDOS FENÓLICOS O NO FLAVONOIDES	ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS	Ácido gálico	1.135
		Ácido protocatequico	2.193
		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	3.532
		Ácido vainílico	5.544
	ACIDOS HIDROXICINÁMICOS	Ácido sirínico	6.776
		Ácido cafeico	6.030
FLAVONOIDES	FLAVANONAS	Ácido <i>p</i> -cumárico	7.588
		Naringenina	12.807
	FLAVONA	Pinocembrina	16.106
		Crisina	15.777
		Galangina	15.281

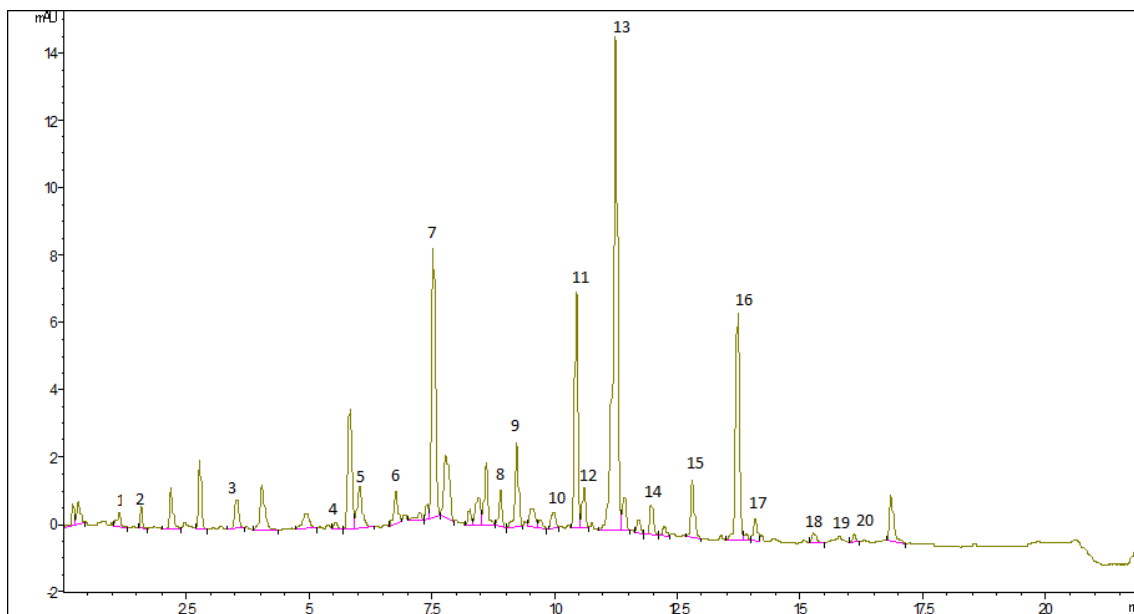


Figura 6. Cromatograma de una muestra de miel de mielada registrado a 280 nm (1: ácido gálico; 2: ácido protocatequico; 3: ácido *p*-hidroxibenzoico; 4: ácido vainillico; 5: ácido cafeico, 6: ácido siríngico, 7: ácido *p*-cumárico ; 8: ácido cafeico D1 ; 9: ácido *p*-hidroxibenzoico D1; 10: galangina D1 ;11: ácido *p*-hidroxibenzoico D2; 12: ácido siríngico D1; 13: ácido siríngico D2; 14: naringenina D1; 15: naringenina ; 16: ácido siríngico D3; 17: ácido *p*-cumárico D; 18: galangina ; 19: crisina; 20: pinocembrina.

A partir de las áreas de los picos obtenidas en los cromatogramas y las diferentes concentraciones conocidas de patrones se obtienen las rectas de calibrado individuales. Las rectas de calibrado obtenidas se recogen la **Tabla 4**. La linealidad se puede evaluar mediante la representación de datos e inspección visual del gráfico y mediante el coeficiente de correlación (r^2).

La linealidad se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del intervalo de trabajo. A partir de la curva de calibración, se puede obtener la ecuación de la recta de la que se obtiene un coeficiente de correlación r^2 . Para una buena garantía de linealidad, será conveniente medir en cinco niveles de concentración, que abarquen el intervalo de trabajo, y repetir este proceso tres veces. Se considera que un valor de r^2 representa un buen ajuste lineal, cuanto más próximo a 1 se encuentre (Jurado, 2008).

Tabla 4. Rectas de calibrado de los compuestos fenólicos.

	λ (nm)	Ecuación	Coefficiente r^2	Rango (Área)	Rango (ng)
Ácido gálico	280	$y=0,73x-0,70$	0.9991	1,50-8,30	3,12-12,48
Ácido protocatequico	280	$y=1,61x-5,76$	0.9991	1.6 - 102.9	3.33 - 66.6
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	280	$y=1,22x-1,85$	0.9916	1,50-11,50	2,80-11,20
Ácido vainílico	280	$y=1,71x-2,60$	1.0000	2,70-18,50	3,08-12,32
Ácido cafeico	280	$y=1,17x-1,05$	0.9996	1,10-7,70	1,88-7,52
Ácido siríngico	280	$y=2,27x-2,95$	0.9997	2,30-18,20	2,23-9,28
Ácido <i>p</i> -cumárico	280	$y=2,73x-3,60$	0.9996	3,10-22,80	2,40-9,60
Naringenina	280	$y=3,06x-21,50$	0.9995	13,70-116,20	11,20-44,80
Crisina	280	$y=3,63x-19,05$	1.0000	18,70-131,70	10,40-41,60
Pinocembrina	280	$y=1,09x-5,75$	1.0000	3,00-29,00	8,00-32,00
Galangina	280	$y=2,15x-5,65$	0.9995	6,90-45,70	6,00-24,00

3.2 Herramientas de exploración de datos

3.2.1 Estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión (Miller y Miller, 2002)

- Medidas de Tendencia central:

Media aritmética (\bar{X}): se define como la suma de una serie de datos dividida por el número de datos considerados. En el caso de una población, es decir, cuando realizásemos una serie infinita de medidas obtendríamos la media de la población (μ).

La media aritmética se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Siendo, x_i cada uno de los valores obtenidos y n el número de valores considerados.

Mediana (M): Para un conjunto de n datos ordenados de menor a mayor, la mediana es el valor de la observación que ocupa el lugar $(n+1)/2$ si n es impar o bien la media de los valores que ocupan los lugares $n/2$ y $(n/2+1)$ si n es par.

- Medidas de Dispersión:

Desviación estándar (S): es un parámetro que nos informa de la dispersión de los datos obtenidos. En el caso de una población hablaremos de la desviación estándar de la población (σ). Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

Siendo, x_i cada uno de los valores obtenidos, \bar{X} el valor medio y n el número de valores considerados.

Varianza (V): se calcula como el cuadrado de la desviación estándar.

Coefficiente de variación (CV): es otra medida de la variabilidad también conocido como desviación estándar relativo y se puede calcular aplicando la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{s}{X}(100\%)$$

Rango: es el intervalo entre el valor máximo y el valor mínimo. Permite obtener una idea de la dispersión de los datos.

3.2.2 Herramientas básicas de calidad

Según la norma de gestión de la calidad y elementos del sistema de la calidad, UNE 66 904-4:1995, un histograma es una herramienta que sirve para visualizar la dispersión de los datos, comunicar visualmente la información sobre el comportamiento del proceso, así como para la toma de decisiones sobre los puntos donde concentrar los esfuerzos de mejora.

Un histograma se usa para:

- Representar gráficamente los modelos de variación.
- Comunicar visualmente información sobre el comportamiento de un proceso.
- Tomar decisiones acerca de donde se deben concentrar los esfuerzos de mejora.

El procedimiento que se debe llevar a cabo para realizar un histograma es:

- Recopilar los valores de los datos.
- Determinar el recorrido de los datos restando del dato de mayor valor el dato de menor valor.
- Determinar el número de intervalos en el histograma y dividir el recorrido por el número de intervalos para determinar la amplitud de cada intervalo.
- Marcar la escala para el valor de los datos del eje horizontal.
- Marcar la escala de frecuencias sobre el eje vertical.
- Trazar la altura de cada intervalo igual al número de valores de los datos que se sitúan dentro de ese intervalo.

3.3 Tratamiento de los datos

Para el análisis de los datos se ha empleado el programa Microsoft Excel (2013).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del estudio de los cromatogramas de las 58 muestras de miel de mielada se han obtenido las áreas de los veinte compuestos fenólicos identificados. Para cada compuesto identificado, se ha interpolado el valor del área en la recta de calibración correspondiente y se ha calculado su concentración en la muestra.

Existen tres tipos de calibración metodológica: calibración externa, patrón interno y adición estándar. En este Trabajo hemos aplicado la calibración externa en la cual la respuesta del instrumento o sistema de medida se expresa en forma de una magnitud distinta de la del patrón o patrones de calibración, esta calibración se realiza mediante patrones que contienen cantidades conocidas del analito, que generalmente consisten en disoluciones del mismo en un disolvente apropiado, que son sometidas a la etapa de medida instrumental. Tienen como ventaja la sencillez y rapidez, pero es necesario asegurar que no existe efecto de la matriz o que se haya corregido convenientemente. Por otra parte, la adición estándar se emplea cuando un efecto de la matriz es imposible de corregir, tiene como inconveniente que es un método laborioso. Por último, la calibración con patrón interno, cuyo objetivo es minimizar las fluctuaciones instrumentales, por lo tanto se emplea cuando existen problemas en la reproducibilidad de la técnica de medida.

Las mieles de mielada estudiadas presentan un perfil fenólico común caracterizado por la presencia de ácidos fenólicos como los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vainílico, siríngico, cafeico y *p*-cumárico y de flavonoides como la galangina y naringenina. Todas las mieles tienen un perfil fenólico común pero existen diferencias cuantitativas con respecto a la composición fenólica de las misma (ANEXO 1).

4.1 Ácidos fenólicos

4.1.1 Ácidos hidroxibenzoicos

En la **Tabla 3** se muestran los valores de los ácidos hidroxbenzoicos identificados en las mieles de mielada. Se han determinado diez ácidos hidroxibenzoicos que corresponden a los ácidos gálico, protocatéquico, vainílico, siríngico y *p*-hidroxibenzoico y derivados del ácido siríngico y *p*-hidroxibenzoico. Cabe destacar que el compuesto mayoritario es el ácido siríngico y sus derivados, seguido

del ácido *p*-hidroxibenzoico. En la **Figura 7** se ha representado gráficamente en histograma la concentración de ácidos hidroxibenzoicos en las mieles de mielada.

Tabla 3. Valores medios (mg/100 g) y de dispersión de la concentración de ácidos hidroxibenzoicos en las muestras de mielada (n = 58).

	\bar{X}	M	S	V	Max	Min	Rango	CV
Ác. gálico	0,021	0	0,033	0,001	0,136	0,000	0,136	>100
Ác. protocatequico	0,195	0,19	0,094	0,009	0,435	0,000	0,435	48
Ác. vainillico	0,031	0,037	0,031	0,001	0,095	0,000	0,095	>100
Ác. siríngico	0,059	0,053	0,051	0,003	0,205	0,000	0,205	86
Ác. siríngico D 1	0,091	0,079	0,057	0,003	0,291	0,000	0,291	42
Ác. siríngico D 2	0,494	0,359	0,358	0,358	3,746	0,000	3,746	72
Ác. siríngico D 3	0,096	0,069	0,127	0,016	0,704	0,000	0,704	>100
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	0,122	0,122	0,04	0,002	0,245	0,058	0,186	33
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico D 1	0,114	0,08	0,133	0,018	0,791	0,000	0,791	>100
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico D 2	0,189	0,105	0,299	0,090	1,944	0,000	1,944	>100

\bar{X} =media, M = mediana, S = desviación estándar, V = Varianza, Max = valor máximo, Min = valor mínimo, CV = coeficiente de variación.

Las muestras de miel de mielada presentaron un intervalo de concentración de ácido gálico entre 0,034 y 0,136 mg/100 g, con un valor medio de 0,021 ± 0,033 mg/100 g. En la **Figura 7** se ha representado gráficamente en histograma los resultados obtenidos de ácido gálico en las mieles, y se observa que la mayoría de las muestras presentan valores comprendidos entre los 0,059 y 0,110 mg/100 g.

En cuanto a la concentración de ácido protocatequico, las mieles presentaron un rango más amplio entre 0,099 y 0,435 mg/100 g. El ácido siríngico y sus derivados presentaron una concentración entre 0,658 y 1,229 mg/ 100 g. La variabilidad del ácido vainillico es mucho menor ya que la mayoría de las muestras presentan valores entre 0,055 y 0,069 mg/100 g. Por último el ácido hidroxibenzoico presente en las muestras de mielada es el ácido *p*-hidroxibenzoico junto a sus tres derivados, la gran parte de las muestras presentaron una concentración entre 0,374 y 0,682 mg/100 g.

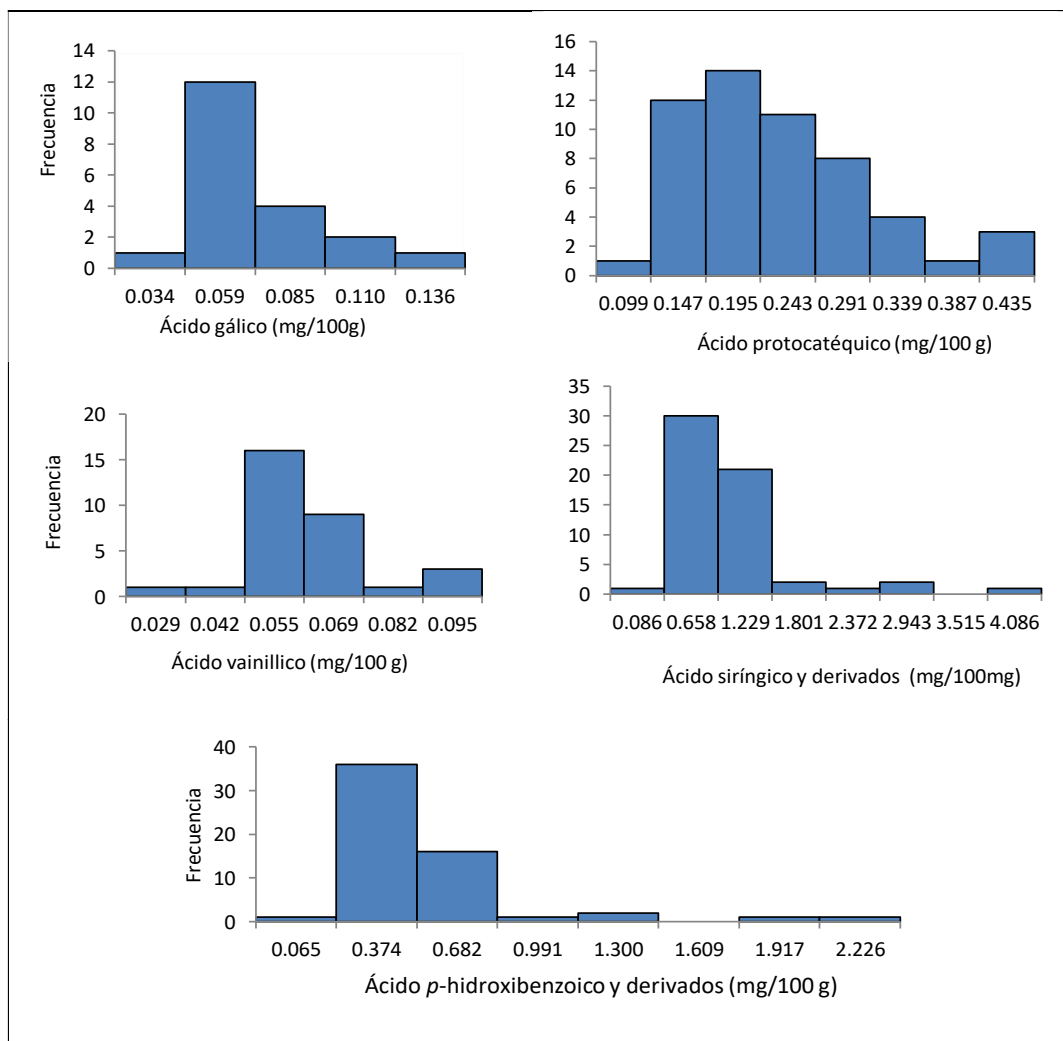


Figura 7.- Histogramas de los ácidos hidroxibenzoicos.

4.1.2 Ácidos hidroxicinámicos

En la **Tabla 4** se muestran los valores de los ácidos hidroxicinámicos identificados en las mieles de mielada. Se han determinado cuatro ácidos que corresponden a los ácidos *p*-cumárico y un derivado del mismo, cafeico y su derivado. En la **Figura 8** se ha representado gráficamente en histograma los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados.

Tabla 4. Valores medios (mg/100 g) y de dispersión de la concentración de ácidos hidroxicinámicos en las muestras de mielada (n = 58).

	\bar{X}	M	S	V	Máx	Mín	Rango	CV
Ác. <i>p</i> -cumárico	0,322	0,203	0,383	0,146	2,386	0,000	2,386	>100
Ác. <i>p</i> -cumárico D 1	0,272	0,107	0,388	0,150	1,319	0,000	1,319	>100
Ác. cafeico	0,095	0,071	0,095	0,009	0,334	0,000	0,334	>100
Ác. cafeico D 1	0,082	0,065	0,048	0,002	0,215	0,000	0,215	60

\bar{X} =media, M = mediana, S = desviación estándar, V = Varianza, Max = valor máximo, Min = valor mínimo, CV = coeficiente de variación.

En cuanto al ácido *p*-cumárico las muestras de mieles de mielada presentan un intervalo de concentración entre 0,411 y 1,567 mg/100 g, teniendo la muestra de mielada 45 la máxima concentración con un valor de 2,386 mg/100 g. Por otra parte, la variabilidad del ácido cafeico y su derivado es mayor con valores comprendidos entre 0,033 y 0,484 mg/100 g, 42 de las muestras presentaron valores entre 0,097 y 0,226 mg/100 g.

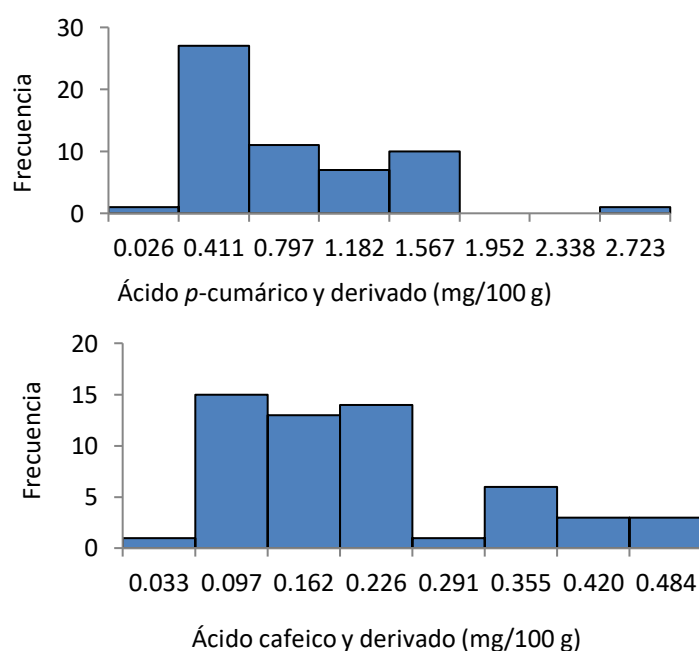


Figura 8. Histogramas de los ácidos hidroxicinámicos.

4.1.3 Flavonoides

En la **Tabla 5** se muestran los valores de los flavonoides que se han identificado en las mieles de mielada. Se han determinado seis flavonoides siendo estos la

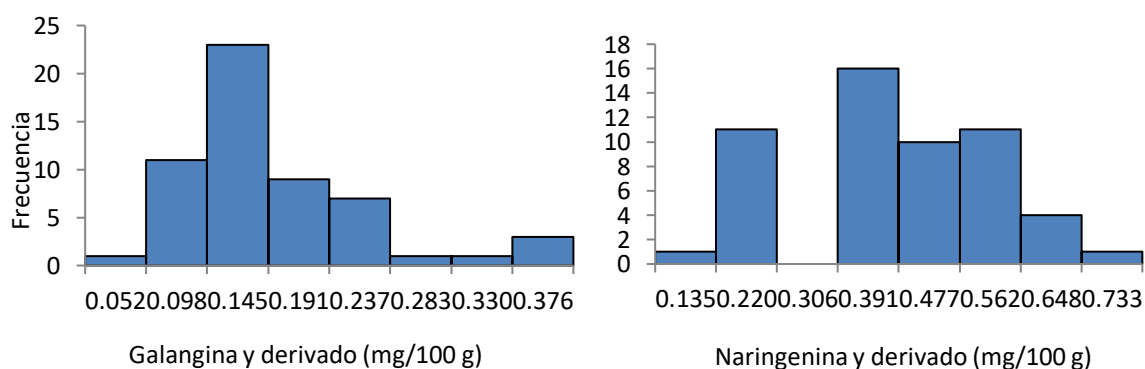
galangina, naringenina, crisina, pinocembrina y un derivado de la galangina y de la naringenina. La **Figura 9** representa gráficamente en histograma la concentración de flavonoides en las mieles de mielada.

Tabla 5. Valores medios (mg/100 g) y de dispersión de la concentración de flavonoides en las muestras de mielada (n = 58).

	\bar{X}	M	S	V	Máx	Mín	Rango	CV
Galangina	0,020	0,000	0,041	0,002	0,113	0,000	0,113	>100
Galangina D 1	0,126	0,111	0,074	0,005	0,376	0,000	0,376	58
Naringenina	0,208	0,199	0,090	0,008	0,433	0,000	0,433	43
Naringenina D 1	0,153	0,178	0,095	0,009	0,345	0,000	0,345	62
Crisina	0,077	0,119	0,075	0,006	0,249	0,000	0,249	98
Pinocembrina	0,020	0,000	0,055	0,003	0,214	0,000	0,214	>100

\bar{X} =media, M = mediana, S = desviación estándar, V = Varianza, Max = valor máximo, Min = valor mínimo, CV = coeficiente de variación.

La naringenina es el flavonoide con mayor concentración en las muestras con un intervalo de concentración de 0,135 y 0,733 mg/ 100g. Dieciséis muestras presentaron una concentración de 0,391 mg/100 g. Siguiendo en concentración está la galangina y su derivado presentando un menor rango, ya que la mayoría de las muestras presentaron concentraciones entre 0,098 y 0,145 mg/100 g. En veinte de las muestras presentaron una concentración de crisina de 0,143 mg/ 100 g. El último flavonoide que ha sido encontrado en nuestras muestras de mielada es la pinocembrina que con una variabilidad menor, estando presente solamente en siete de las muestras analizadas y con un valor medio de $0,020 \pm 0,055$ mg/100 g.



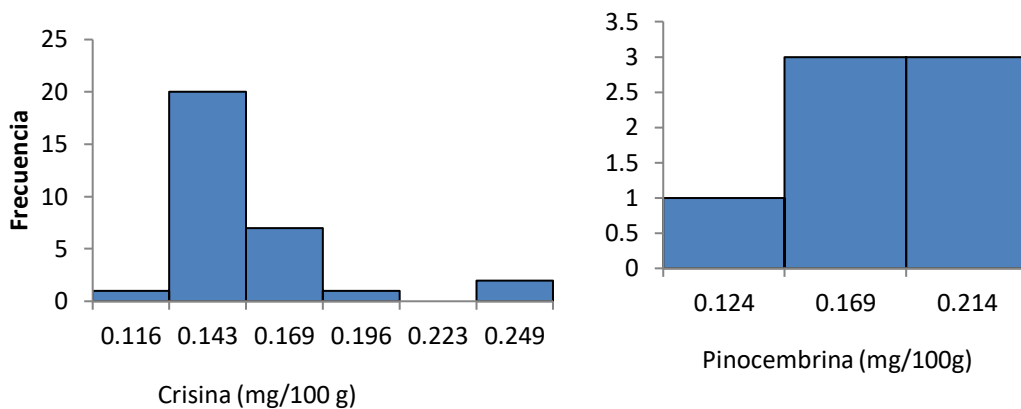


Figura 9. Histogramas de los flavanoides.

4.2 Composición fenólica de las mieles de mielada

En la **Figura 10** se representa en diagrama de caja y bigotes los valores de ácidos benzoicos, cinámicos y flavonoides totales en las muestras de mieles de mielada analizadas. Se observa que la mediana esta en el centro de las cajas tanto para los ácidos benzoicos como los flavonoides pero no para los ácidos hidroxicinámicos, esto indica que la mayoría de los valores de concentración de los mismos aparecen en intervalo más reducido.

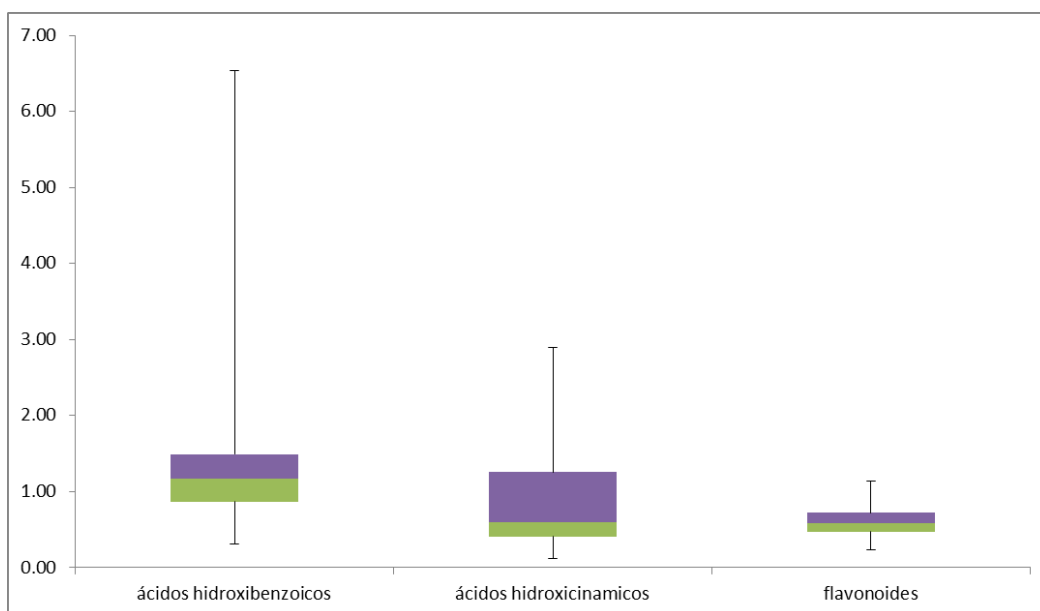


Figura 10. Diagrama de caja para los datos de ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos y flavonoides.

Son escasos los trabajos que estudian el perfil fenólico individual de las mieles de mielada españolas. Recientemente Oroiam y Ropciuc (2007) en un estudio de mieles de mielada en Rumania encuentran los ácidos gálico, cafeico, *p*-cumárico y flavonoides en niveles de concentración similares.

5. CONCLUSIONES

La mieles de mielada son cada vez más valoradas por los consumidores debido a sus efectos beneficiosos para la salud. De este estudio se pueden extraer como conclusiones:

1. El proceso analítico es el conjunto de etapas realizadas para resolver el problema analítico y que engloba tres etapas bien diferenciadas toma y preparación de la muestra, medida de la señal analítica y toma de datos y tratamiento de datos y la expresión de resultados.
2. Mediante calibración metodológica se ha establecido la relación entre la respuesta del cromatógrafo de líquidos y la concentración analítica. Se ha calculado la concentración de los compuestos fenólicos en las mieles a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas y su interpolación en las rectas de calibrado.
3. Se han identificado ácidos fenólicos y flavonoides, siendo los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vainílico, sirínico, cafeico y *p*-cumárico y como flavonoides la galangina y naringenina los compuestos fenólicos característicos en las mieles analizadas. Los ácidos hidroxinámicos son los fenoles mayoritarios, seguidos de los hidroxibenzoicos y flavonoides.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Oliveira Costa, A.C., Fett, R., Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry* 2015; (196):309-323
- Deng J, Liu R, Lu Q, Hao P, Xu A. Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to manuka honey. *Food Chemistry* 2011; 125: 243–249.
- Cuadros L., Gamiz L., Carrasco A., Ruiz C. *Glosario de términos analíticos*. Ed: Graseqa (grupo regional Andaluz de la sociedad Española de química analítica). 2013.
- El Sohaimy, Masry S.H.D., Shehata M.G. Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Science* (2015) 60(2), 279–287.
- Estrada H., Gamboa M., Chaves C. y Arias M.L. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbológica. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 2005; 55(2).
- Gheldof N, Wang X-H, Engeseth N J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chemistry*. 2002; 50:5870–5877.
- Güal A., Pehlivan T. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of biological sciences*. 2018; 30:30-30.
- Gutiérrez Avella D.M, Oriz García C. A, Mendoza Cisneros. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Symposium de Metrología*. 2008.
- Harborne, J.B (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry: Volume 1*; en *Plant Phenolics*. Academic Press, London, 1-28.
- Harris D. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª Ed. Barcelona: Reverté S.A.; 2007.
- Jurado J.M. *Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos*. Departamento de Química Analítica; 2008.

- Krell R. (1996). Value-added Products from Beekeeping. Fao Agricultural Services Bulletin Nº 124. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Manisha Deb Manda, Manda S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2011;1(2):154-160
- Mircea O., Ropciuc S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. Computers and Electronics in Agriculture 2017; 138:148–156.
- Montenegro, G. Implementación de un panel sensorial para mieles chilenas. Cienc. Inv. Agr., Santiago, 2008; 35(1):51-58.
- Moros Portolés J. Tratamiento numérico de los datos en el análisis cuantitativo por espectrometría vibracional. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Departamento de Química Analítica. 2007.
- Kassim M., Achoui M., Mustafa M., Mohd M., Yusoff K. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. Nutrition Research, 2010; 30: 650-659.
- Palomar M.A. Determinación de la composición fenólica por UHPLC y medida del color como parámetro de interés en la calidad final de mieles monoflorales. Departamento de Química Analítica. Universidad de Sevilla. 2015
- Pita-Calvo, C., Vázquez, M., Differences between honeydew and blossom honeys: a review, Trends in Food Science & Technology 2016; 59: 79-89.
- Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. (BOE núm. 186, de 5 de agosto de 2003, páginas 30181 a 30183) Disponible en: <https://www.boe.es/>
- Sánchez González N. Determinación de parámetros de calidad de mieles de mieladas. Universidad de Sevilla. Departamento química analítica. 2016.
- Shantal Rodríguez Flores M., Escuredo O., Seijo M. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of Quercus pyrenaica honeydew honeys. Food Chemistry 2015; 166: 101–106.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am. J. Enol. Vitic., 16, 144-158.

- Terrab A., Diez MJ, Heredia FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*. 2002;79(3): 373–379.
- Sancho M.T., Muniategui S., Huibodro J.F. y J. Simal. Mieles del País Vasco. VI: Elementos de mielada .*Anales de Bromatología* 1991;43: 165-. 172.
- Valcárcel M. *Principios de Química Analítica*. 1ª ed. Barcelona Springer-Verlag Ibérica S.A.;1999.
- Estrada H., Gamboa M., Chaves C. y Arias M.L. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 2005; 55(2)

8. ANEXOS

ANEXO A: concentraciones de ácidos hidroxibenzoicos en las mieles de mielada.

	ác.gálico	ác. protocatequico	ác. vainillico	ác. siríngico	ác. siríngico D1	ác. siríngico D2	ác. siríngico D3	ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico	ác. <i>p</i> -hidroxibenzoico D1	ác. <i>p</i> - hidroxibenzoico D2
Muestra 1	0,000	0,109	0,030	0,000	0,000	0,068	0,000	0,065	0,059	0,000
Muestra 2	0,000	0,111	0,000	0,052	0,000	0,071	0,000	0,065	0,000	0,000
Muestra 3	0,000	0,220	0,052	0,058	0,087	0,576	0,059	0,184	0,071	0,095
Muestra 4	0,000	0,138	0,029	0,000	0,083	0,303	0,048	0,077	0,056	0,131
Muestra 5	0,058	0,184	0,046	0,000	0,130	1,681	0,704	0,134	0,269	0,617
Muestra 6	0,068	0,145	0,000	0,051	0,153	0,246	0,024	0,085	0,054	0,067
Muestra 7	0,000	0,104	0,000	0,000	0,080	0,118	0,168	0,069	0,073	0,078
Muestra 8	0,000	0,172	0,051	0,054	0,075	0,161	0,053	0,102	0,043	0,063
Muestra 9	0,037	0,201	0,000	0,056	0,087	0,259	0,000	0,147	0,066	0,075
Muestra 10	0,000	0,203	0,000	0,037	0,074	0,178	0,062	0,097	0,053	0,068
Muestra 11	0,041	0,256	0,000	0,000	0,061	0,729	0,071	0,110	0,085	0,198
Muestra 12	0,000	0,244	0,000	0,065	0,073	0,644	0,067	0,103	0,057	0,324
Muestra 13	0,000	0,395	0,046	0,038	0,133	0,317	0,061	0,146	0,059	0,089
Muestra 14	0,000	0,435	0,045	0,000	0,057	0,352	0,057	0,118	0,109	0,091
Muestra 15	0,000	0,126	0,000	0,000	0,109	0,321	0,070	0,094	0,065	0,113
Muestra 16	0,000	0,000	0,000	0,057	0,069	0,080	0,082	0,067	0,107	0,000
Muestra 17	0,000	0,239	0,000	0,080	0,061	0,167	0,165	0,110	0,065	0,073
Muestra 18	0,000	0,227	0,000	0,072	0,105	0,473	0,085	0,153	0,153	0,074
Muestra 19	0,000	0,143	0,066	0,000	0,062	0,133	0,000	0,102	0,179	0,122
Muestra 20	0,000	0,245	0,000	0,059	0,056	0,130	0,068	0,129	0,103	0,076
Muestra 21	0,000	0,129	0,069	0,000	0,000	0,000	0,086	0,069	0,071	0,000
Muestra 22	0,000	0,099	0,057	0,000	0,055	0,094	0,123	0,092	0,081	0,085
Muestra 23	0,000	0,266	0,068	0,087	0,056	0,378	0,290	0,239	0,791	0,164
Muestra 24	0,000	0,152	0,000	0,061	0,070	0,676	0,085	0,085	0,061	0,175

Muestra 25	0,000	0,127	0,000	0,046	0,057	0,213	0,047	0,081	0,063	0,086
Muestra 26	0,000	0,152	0,000	0,043	0,081	0,635	0,149	0,099	0,083	0,182
Muestra 27	0,000	0,195	0,000	0,060	0,055	0,516	0,000	0,137	0,070	0,125
Muestra 28	0,000	0,114	0,000	0,057	0,061	0,150	0,000	0,066	0,070	0,056
Muestra 29	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	0,399	0,000	0,100	0,104	0,084
Muestra 30	0,051	0,174	0,065	0,033	0,085	0,558	0,129	0,127	0,124	0,164
Muestra 31	0,055	0,189	0,000	0,085	0,291	0,125	0,133	0,132	0,100	0,176
Muestra 32	0,000	0,242	0,059	0,000	0,153	0,513	0,000	0,138	0,097	0,224
Muestra 33	0,000	0,329	0,054	0,034	0,145	0,473	0,000	0,144	0,098	0,199
Muestra 34	0,039	0,320	0,050	0,000	0,043	0,202	0,071	0,149	0,056	0,060
Muestra 35	0,000	0,270	0,000	0,088	0,058	0,222	0,000	0,151	0,047	0,087
Muestra 36	0,000	0,319	0,068	0,079	0,157	0,518	0,000	0,245	0,427	0,114
Muestra 37	0,000	0,189	0,000	0,069	0,156	1,120	0,545	0,217	0,641	0,587
Muestra 38	0,000	0,241	0,055	0,137	0,199	0,354	0,000	0,149	0,093	0,132
Muestra 39	0,000	0,256	0,056	0,151	0,127	0,391	0,087	0,157	0,096	0,128
Muestra 40	0,000	0,250	0,058	0,035	0,116	0,367	0,095	0,152	0,099	0,099
Muestra 41	0,068	0,160	0,094	0,031	0,097	2,475	0,116	0,147	0,260	1,220
Muestra 42	0,086	0,223	0,054	0,093	0,139	0,048	0,114	0,151	0,122	0,070
Muestra 43	0,042	0,201	0,053	0,051	0,052	0,347	0,138	0,116	0,086	0,110
Muestra 44	0,000	0,258	0,053	0,092	0,062	0,245	0,024	0,143	0,061	0,079
Muestra 45	0,000	0,125	0,095	0,044	0,000	3,746	0,154	0,058	0,224	1,944
Muestra 46	0,000	0,113	0,000	0,000	0,000	0,364	0,321	0,088	0,029	0,148
Muestra 47	0,106	0,400	0,000	0,075	0,083	0,460	0,347	0,142	0,087	0,077
Muestra 48	0,000	0,190	0,000	0,040	0,193	0,932	0,000	0,133	0,085	0,422
Muestra 49	0,136	0,353	0,000	0,059	0,126	0,245	0,000	0,181	0,061	0,062
Muestra 50	0,057	0,175	0,054	0,076	0,176	1,177	0,070	0,143	0,080	0,341
Muestra 51	0,034	0,155	0,000	0,195	0,089	0,477	0,065	0,096	0,053	0,092
Muestra 52	0,083	0,168	0,053	0,037	0,060	0,939	0,054	0,094	0,068	0,337
Muestra 53	0,055	0,000	0,090	0,164	0,078	0,409	0,084	0,133	0,054	0,129
Muestra 54	0,064	0,172	0,051	0,042	0,067	0,433	0,000	0,120	0,071	0,090

Muestra 55	0,000	0,214	0,000	0,205	0,069	0,228	0,110	0,095	0,000	0,051
Muestra 56	0,057	0,317	0,058	0,116	0,196	0,587	0,127	0,116	0,107	0,182
Muestra 57	0,039	0,000	0,055	0,125	0,157	0,051	0,109	0,125	0,095	0,191
Muestra 58	0,042	0,196	0,052	0,186	0,134	0,555	0,069	0,136	0,091	0,118

Concentraciones de ácidos hidroxicinámicos en las mieles de mielada.

	ác. <i>p</i> -cumárico	ác <i>p</i> -cumárico D1	ác. Cafeico	ác. cafeico D1
Muestra 1	0,063	0,000	0,057	0,035
Muestra 2	0,079	0,000	0,000	0,035
Muestra 3	0,241	0,000	0,104	0,079
Muestra 4	0,089	0,000	0,058	0,034
Muestra 5	0,804	0,094	0,191	0,113
Muestra 6	0,202	0,000	0,138	0,146
Muestra 7	0,109	0,000	0,072	0,090
Muestra 8	0,159	0,000	0,076	0,047
Muestra 9	0,196	0,000	0,142	0,083
Muestra 10	0,100	1,052	0,069	0,053
Muestra 11	0,110	1,142	0,054	0,042
Muestra 12	0,124	1,091	0,076	0,058
Muestra 13	0,207	1,116	0,000	0,116
Muestra 14	0,106	1,216	0,000	0,033
Muestra 15	0,166	1,276	0,070	0,088
Muestra 16	0,082	1,152	0,000	0,041
Muestra 17	0,103	1,319	0,000	0,051
Muestra 18	0,095	0,000	0,000	0,047
Muestra 19	0,098	0,301	0,000	0,058
Muestra 20	0,181	0,333	0,000	0,074

Muestra 21	0,106	0,336	0,000	0,000
Muestra 22	0,210	0,055	0,000	0,096
Muestra 23	0,100	0,104	0,070	0,040
Muestra 24	0,245	0,185	0,137	0,041
Muestra 25	0,131	0,000	0,057	0,037
Muestra 26	0,267	0,000	0,137	0,050
Muestra 27	0,127	0,144	0,117	0,045
Muestra 28	0,101	0,346	0,057	0,049
Muestra 29	0,082	0,150	0,000	0,046
Muestra 30	0,162	0,140	0,131	0,072
Muestra 31	0,470	0,026	0,211	0,086
Muestra 32	0,686	0,575	0,056	0,142
Muestra 33	0,641	0,330	0,000	0,145
Muestra 34	0,026	0,000	0,093	0,051
Muestra 35	0,252	0,327	0,000	0,041
Muestra 36	0,604	0,245	0,334	0,143
Muestra 37	1,175	0,114	0,238	0,145
Muestra 38	0,447	0,360	0,000	0,203
Muestra 39	0,277	0,183	0,225	0,112
Muestra 40	0,265	0,000	0,235	0,114
Muestra 41	1,224	0,210	0,000	0,122
Muestra 42	0,307	0,120	0,289	0,135
Muestra 43	0,155	0,000	0,078	0,043
Muestra 44	0,206	0,325	0,000	0,049
Muestra 45	2,368	0,355	0,000	0,171
Muestra 46	0,213	0,000	0,000	0,000
Muestra 47	0,332	0,000	0,000	0,087
Muestra 48	0,783	0,392	0,000	0,130
Muestra 49	0,190	0,099	0,266	0,086
Muestra 50	0,831	0,110	0,263	0,156

Muestra 51	0,320	0,055	0,143	0,070
Muestra 52	0,509	0,073	0,093	0,049
Muestra 53	0,204	0,099	0,134	0,060
Muestra 54	0,130	0,077	0,143	0,053
Muestra 55	0,000	0,000	0,112	0,052
Muestra 56	0,305	0,000	0,269	0,215
Muestra 57	0,693	0,093	0,255	0,164
Muestra 58	0,211	0,079	0,228	0,108

Concentraciones de los flavonoides en las mieles de mielada.

	Galangina	Galangina D1	Naringenina	Naringenina D1	Crisina	Pinocembrina
Muestra 1	0,112	0,084	0,198	0,000	0,000	0,000
Muestra 2	0,113	0,000	0,199	0,000	0,152	0,000
Muestra 3	0,111	0,101	0,200	0,168	0,000	0,000
Muestra 4	0,091	0,050	0,169	0,156	0,000	0,000
Muestra 5	0,094	0,119	0,313	0,222	0,144	0,124
Muestra 6	0,097	0,071	0,228	0,213	0,000	0,000
Muestra 7	0,102	0,000	0,180	0,172	0,000	0,000
Muestra 8	0,107	0,246	0,222	0,193	0,000	0,000
Muestra 9	0,105	0,111	0,212	0,182	0,000	0,000
Muestra 10	0,000	0,102	0,164	0,151	0,117	0,000
Muestra 11	0,000	0,248	0,135	0,000	0,223	0,000
Muestra 12	0,000	0,071	0,197	0,153	0,116	0,000

Muestra 13	0,000	0,163	0,216	0,264	0,000	0,000
Muestra 14	0,000	0,218	0,154	0,170	0,121	0,000
Muestra 15	0,000	0,096	0,195	0,160	0,135	0,000
Muestra 16	0,000	0,372	0,170	0,206	0,128	0,000
Muestra 17	0,000	0,376	0,156	0,158	0,000	0,000
Muestra 18	0,000	0,161	0,000	0,000	0,136	0,000
Muestra 19	0,000	0,134	0,000	0,215	0,150	0,000
Muestra 20	0,000	0,106	0,000	0,000	0,135	0,000
Muestra 21	0,000	0,083	0,000	0,000	0,146	0,000
Muestra 22	0,000	0,140	0,204	0,000	0,000	0,000
Muestra 23	0,000	0,163	0,197	0,000	0,137	0,000
Muestra 24	0,000	0,096	0,177	0,000	0,000	0,000
Muestra 25	0,108	0,079	0,159	0,000	0,000	0,000
Muestra 26	0,000	0,095	0,182	0,164	0,000	0,000
Muestra 27	0,000	0,296	0,167	0,000	0,000	0,000
Muestra 28	0,000	0,052	0,184	0,167	0,129	0,000
Muestra 29	0,000	0,164	0,000	0,176	0,136	0,000
Muestra 30	0,000	0,159	0,198	0,164	0,130	0,000
Muestra 31	0,106	0,114	0,248	0,345	0,134	0,187
Muestra 32	0,000	0,111	0,245	0,315	0,133	0,000
Muestra 33	0,000	0,115	0,212	0,183	0,000	0,000
Muestra 34	0,000	0,080	0,167	0,000	0,000	0,000
Muestra 35	0,000	0,095	0,158	0,000	0,134	0,000
Muestra 36	0,000	0,138	0,312	0,235	0,134	0,000
Muestra 37	0,000	0,104	0,339	0,200	0,134	0,000
Muestra 38	0,000	0,126	0,254	0,221	0,138	0,000
Muestra 39	0,000	0,196	0,320	0,203	0,130	0,000
Muestra 40	0,000	0,172	0,243	0,210	0,135	0,000
Muestra 41	0,000	0,125	0,212	0,178	0,000	0,000
Muestra 42	0,000	0,093	0,226	0,224	0,134	0,000

Muestra 43	0,000	0,107	0,165	0,150	0,122	0,000
Muestra 44	0,000	0,136	0,178	0,164	0,000	0,000
Muestra 45	0,000	0,133	0,272	0,211	0,000	0,000
Muestra 46	0,000	0,186	0,192	0,179	0,000	0,000
Muestra 47	0,000	0,000	0,231	0,249	0,000	0,000
Muestra 48	0,000	0,103	0,286	0,220	0,000	0,000
Muestra 49	0,000	0,097	0,433	0,300	0,151	0,131
Muestra 50	0,000	0,112	0,399	0,186	0,164	0,189
Muestra 51	0,000	0,136	0,264	0,190	0,145	0,151
Muestra 52	0,000	0,103	0,193	0,000	0,000	0,000
Muestra 53	0,000	0,113	0,325	0,193	0,249	0,214
Muestra 54	0,000	0,095	0,220	0,193	0,000	0,000
Muestra 55	0,000	0,000	0,221	0,188	0,171	0,152
Muestra 56	0,000	0,128	0,324	0,204	0,000	0,000
Muestra 57	0,000	0,125	0,312	0,251	0,000	0,000
Muestra 58	0,000	0,095	0,347	0,248	0,000	0,000