

## **Determinación de marcadores de origen botánico para mieles de citrus (citrus spp) de la región fronteriza: Concordia (República Argentina) – Salto (República Oriental del Uruguay)**

*Tamaño, María G.\*; Locaso, Delia E.\*; Giudici, Vanesa A.\*; Maffioly, Rodolfo H.\*; Pisonero, Mario O.\*; Bonini Arambillete, Ana C.\*\*; Dellacassa Beltrame, Eduardo S.\*\*; Fariña Iriarte, Laura C.\*\*; Fagundez, Guillermina A.\*\*\**

AUTORES: \*Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos. (Concordia, Entre Ríos, Argentina).

\*\*Universidad de la República, Uruguay. \*\*\* Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

CONTACTO: [tamanog@fcal.uner.edu.ar](mailto:tamanog@fcal.uner.edu.ar)

### **Resumen**

Argentina y Uruguay son productores de mieles de alta calidad que destinan en más de un 95% a exportación, especialmente a países de la CEE. Mercados exigentes que valorizan mieles diferenciadas por origen botánico y geográfico.

La región fronteriza Concordia-Salto se caracteriza por ser una zona de producción cítrica, que cuenta con extensas plantaciones dedicadas a la producción de naranjas y mandarinas, lo que constituye una fuente de néctar para las colmenas instaladas en el área por apicultores de ambos países.

La miel de cítricos es muy apreciada comercialmente con un valor agregado importante cuando es posible diferenciarla. Una de las dificultades que se presentan, es que debido a características propias la especie, el número de gránulos de polen en la miel suele ser escaso, dificultando determinar origen botánico solo con este parámetro. El estudio complementario de las características físico-químicas y composición del aroma, resulta un aporte importante para diferenciar y valorizar estas mieles.

El objetivo general de este proyecto es disponer en la región fronteriza Concordia-Salto de una miel tipificada de Citrus con el fin de aumentar su valor agregado y mejorar su posicionamiento en los mercados internacionales, a partir de hallar componentes aromáticos marcadores de origen botánico.

**Palabras clave:** miel citrus – calidad – aroma – diferenciación

## Objetivos: propuestos y cumplidos

El objetivo general de este trabajo es disponer en esta región de una miel de cítricos (*Citrus sp.*) caracterizada de acuerdo a sus parámetros físico-químicos y palinológicos, con el fin de aumentar su valor agregado y mejorar su posicionamiento en los mercados internacionales. En este sentido, se plantearon como objetivos específicos de la investigación los siguientes:

- Evaluación de las características físico-químicas: pH, color, humedad, HMF, acidez, conductividad, azúcares reductores, cenizas, índice de diastasa.
- Determinación del contenido en minerales esenciales para la dieta humana.
- Estudio del contenido polínico (cuali-cuantitativo).
- Determinación del perfil de composición de aromas de la miel de cítricos.
- Establecer, a través del estudio de la distribución isotópica de las muestras georeferenciadas, un criterio de origen certificable para la región de productiva
- Evaluar, y validar, la metodología de NIR como herramienta rápida en la determinación de parámetros de calidad

Todos los objetivos han sido emprendidos con éxito, restando finalizar con análisis de distribución isotópica para emitir resultados finales al respecto.

## Marco teórico y metodológico (síntesis)

Como cualquier otro producto alimenticio la miel tiene propiedades organolépticas y aromáticas únicas que determinan la preferencia de los consumidores. Presenta una gran variabilidad de sabores y aromas (flavour) y basado en esto es que el consumidor la selecciona, más que en sus propiedades nutritivas. Esta gran variabilidad en el aroma característico de la miel es producido por sus compuestos volátiles, en general moléculas de bajo peso molecular, que en su mayoría derivan de las flores visitadas por las abejas (por lo tanto tienen un origen floral), pero también durante el procesamiento y almacenamiento (por degradación térmica o acción de microorganismos) se da la formación de componentes volátiles. El aroma asimismo es una de las características más importantes que permite la detección de adulteraciones en el producto.

Desde un punto de vista químico, la miel es un sustrato complejo para analizar, contiene muchos componentes volátiles con diferentes estructuras químicas, en bajas concentraciones, en una matriz compuesta mayormente por glucosa y fructosa. La miel comercializada más frecuentemente es polifloral la determinación de su origen floral normalmente se hace mediante:

- análisis del polen (análisis melisopalinológico)
- análisis de parámetros físicoquímicos
- propiedades organolépticas

El análisis melisopalinológico consiste en el estudio de los granos de polen que se encuentran en la miel (von der Ohe, 2004). Su realización requiere de recursos humanos altamente especializados en esta área para poder llevarlo a cabo, consume tiempo y depende del juicio y habilidad de estos expertos (Persano Oddo, et al. 2007).

Los compuestos presentes en la miel pueden sufrir modificaciones durante el tiempo y las condiciones de almacenamiento, por lo cual la fiabilidad de los métodos basados en la cuantificación de parámetros físico-químicos se ve reducida.

La evaluación sensorial presenta dificultades en el sentido que es necesario el entrenamiento de un panel sensorial específico para este producto y luego requiere el manejo objetivo y reproducible de los resultados utilizando herramientas estadísticas.

La introducción de sistemas que aseguran la extracción de las mezclas imitando la forma en que el ser humano percibe el aroma y sabor de una miel, así como la disponibilidad de herramientas cromatográficas basadas en sistemas de detección más sofisticados como es el caso de la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS), cromatografía gaseosa acoplada a olfatometría (GC-O), han permitido avanzar en forma importante en la identificación y cuantificación de los componentes sensorialmente activos involucrados. Considerando que las mieles se diferencian por sus propiedades sensoriales, mediante el análisis de compuestos volátiles se puede realizar la clasificación de las mismas, así como permitir el establecer su origen botánico (Bogdanov, S., 2012).

Dentro de los compuestos volátiles se pueden destacar tres grandes grupos: terpenos, norisoprenoides, y los derivados del ácido shikímico. Si bien también se encuentran otros compuestos que presentan grupos funcionales del tipo alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos y ésteres. Estos compuestos han sido estudiados fundamentalmente con el objetivo de determinar el origen floral de las mieles (Cuevas-Glory, L.F. et al., 2007). En las mieles de Citrus fue encontrado el primer marcador volátil de una miel monofloral: el metilantranilato (Bogdanov et al., 2004; Maldonado et al., 2008).

Para la extracción de la fracción volátil de una miel se utilizan diferentes metodologías donde el factor fundamental a tener en cuenta es que el extracto aromático recuperado sea lo más representativo posible del perfil aromático y de sabor de la miel en cuestión. Las técnicas para la extracción de los componentes volátiles en mieles reportadas son variadas:

- extracción por solventes orgánicos (extracción líquido – líquido)
- extracción en fase sólida (SPE) y
- micro extracción en fase sólida (SPME)

Una vez obtenido el extracto, por cualquiera de estas técnicas de extracción, éste puede ser estudiado por GC-MS para poder determinar (identificar y cuantificar) los compuestos volátiles presentes. Esta técnica combina una alta eficiencia en la separación y una sensibilidad adecuada, por lo que es la técnica de referencia para la determinación del perfil aromático de mezclas complejas como la que forma el aroma de una miel.

Estas técnicas más allá de arrojar resultados confiables y reproducibles implican en la mayoría de los casos largos tiempos de extracción y altos costos asociados a su utilización.

### **Técnicas espectroscópicas en alimentos**

Las propiedades ópticas de los alimentos y en particular la aplicación de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se emplea desde la década del 70 en la industria alimenticia, farmacéutica, petroquímica, como alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales (Cozzolino, D. et al., 2000).

El NIRS es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante, de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración. En los últimos años se han desarrollado numerosas aplicaciones NIRS para evaluar la composición, el procesamiento y certificación de la calidad de los alimentos tanto para la alimentación humana como para la alimentación animal (Givens, D.I. et al., 1999). El método utiliza la región del infrarrojo cercano (700 y 2500 nm) del espectro electromagnético. Este método se basa en que, cuando la luz (energía) incide sobre una muestra, una parte de los fotones se transmite a través de la misma, siendo el resto absorbida. La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces C-H, O-H y N-H, principales constituyentes de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en distintas formas. La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación.

Esto determina que para un material de naturaleza química heterogénea el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano sea una combinación de bandas de absorción parciales superpuestas o muy cercanas, que suelen confundirse en una línea suavizada, en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombro.

Al desarrollar una calibración en NIRS, se relaciona mediante un algoritmo la información espectral (óptica) con la información de la composición físico-química (método de referencia) a través de la aplicación de modelos estadísticos (regresión múltiple, componentes principales y cuadrados mínimos parciales).

La particularidad de estas técnicas es que son rápidas, tiene un relativo bajo costo, y proveen mucha información con solamente un análisis. Son técnicas con alta sensibilidad, no destructivas, no invasivas y amigables con el medio ambiente (Cozzolino, D., 1998).

Algunas de las aplicaciones de esta técnica incluyen el control de la calidad de granos, control de manejo de poscosecha en frutas y hortalizas, control de calidad en raciones de alimentación animal y genuinidad en alimentos.

En particular, en muestras de miel la medida del espectro al infrarrojo cercano (NIR) combinado con métodos quimiométricos ha sido utilizada para identificar el origen botánico de muestras de miel estimado por observaciones apibotánicas (realizado por el productor en el momento en que las abejas están pecoreando para coleccionar el néctar y/o los granos de polen), así como para la identificación de la adulteración de las misma (Cozzolino, D., 2002) (Corbella, E. et al., 2005).

## Metodología

### Evaluación de las características físico-químicas

Los métodos analíticos a empleados para las siguientes determinaciones son los de Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 1990:

1. PH: se realizó con Ph-metro marca TOA (HM-30 V) de una solución conteniendo 10 g de miel en 75 ml de agua destilada libre de anhídrido carbónico –AOAC método 962.19-
2. Humedad: se determinó con un refractómetro marca KYOWA (70-635) a 20°C, usando la tabla Wedmore expresando el resultado como %- AOAC método 969.38b-
3. HMF: se trató la muestra con reactivos Carrez y adición de Bisulfito de Sodio, midiendo luego la absorbancia a 284nm y 336nm en un espectrofotómetro marca METROLAB (325 BD UV/Visible) expresando los resultados en mg/Kg. -AOAC método 980.23.-
4. Acidez: se determinó Acidez libre por titulación potenciométrica según el método AOAC 920.18.-
5. Conductividad: se preparó una solución de miel al 20% (base seca) en agua desionizada libre de anhídrido carbónico y se midió a 20°C en un Conductímetro marca Oakton, expresado en  $\mu\text{S cm}^{-1}$  método AOAC ,1990.
6. Azúcares reductores y sacarosa aparente: se determinaron mediante la reducción del reactivo de Fehling, modificada por Soxhlet, titulando a punto de ebullición y a volumen constante, según método AOAC 920.183 b –
7. Cenizas: se realizaron por calcinación a 550°C en mufla hasta peso constante los resultados son expresados como %, según el método AOAC 920.181a -
8. Determinación de Color: se hizo por colorimetría utilizando un comparador visual de colores Pfund, expresado en mm. Norma IRAM 15941-2.
9. Índice de Diastasa: se realizó en base a la capacidad de la enzima de hidrolizar almidón. Se observo por medición de absorbancia a 660nm en un espectrofotómetro marca METROLAB (325 BD UV/Visible) expresando los resultados en mg/Kg. -AOAC método 958.09.

10. Caracterización viscosimétrica: se desarrolló y puso a punto una técnica para determinación de viscosidad en miel utilizando Reómetro DISCOVERY HR-1, con tecnología de avanzada. Se realizaron ensayos en tres temperaturas diferentes para las distintas muestras: 20°, 30°C y 40°C.

### **Determinación del contenido de metales**

Para la digestión de las muestras se utilizó un equipo de digestión acelerada por microondas MARS 5 marca CEM provisto de contenedores de teflon HP 500 Plus y un sistema de control de presión y temperatura. En la selección de las variables óptimas se diseñó un factorial: cantidad de muestra (0,5-1 g), temperatura (170-190°C) y tiempo de mantenimiento (5-15 minutos).

La cuantificación de metales se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica AA-6800 marca SHIMADZU, provisto de "autosampler" ASC 6100 y software WizaArd. Se aplicó el método de análisis por llama dependiendo de acuerdo al Manual Standard Methods –Edición 22 th, 2012.- sección 3111.

### **Estudio del contenido polínico**

Se aplicó el método propuesto por The International Honey Commission (von der Ohe, 2004).

Para la preparación de la muestra: pesar 10 g de miel, agregar 20 ml de agua destilada (20-40°C) y disolver. Centrifugar esta solución en un tubo de centrifuga (50 ml de capacidad), durante 10 min. a 1000 g. Decantar el líquido sobrenadante. Agregar 20 ml de agua destilada para disolver completamente los cristales de azúcar remanente. Centrifugar por 5 min a 1000 g. Decantar el líquido sobrenadante. Dejar escurrir el líquido del tubo colocando el mismo boca abajo en un ángulo de 45° sobre un papel absorbente.

A continuación se realizó acetólisis (Erdtman, 1960):

- Re-suspender el sedimento en ácido acético glacial para eliminar el agua contenida en la muestra a procesar, centrifugar y decantar.

- Preparar una solución de anhídrido acético y ácido sulfúrico en relación 9:1, agregando el ácido lentamente.

- Agregar 5 a 10 ml de la mezcla a cada tubo, revolver con varilla de vidrio y calentar en un baño térmico desde temperatura de ambiente (o al menos 70 °C) a ebullición. El calentamiento debe realizarse bajo una campana extractora de gases. Mientras se realiza el proceso, se debe revolver un par de veces con una varilla de vidrio. El calentamiento es detenido 1-2 minutos luego que la temperatura ha alcanzado los 100 °C.

- Cortar el proceso mediante el agregado de unas gotas de ácido acético.

- Transferir los tubos a la centrifuga (velocidad de rotación 2400 rpm 1000 g) y centrifugar.

- Descartar la mezcla acetolítica, después de centrifugar, dentro de un recipiente de almacenamiento.

- Agregar 5 ml de agua destilada y lavar el sedimento mediante agitación vigorosa del tubo.

- Luego agregar otra porción de agua destilada (5 ml), centrifugar, y decantar.

- Repetir el lavado una vez y verter el líquido eventualmente a través de un tamiz, previamente humedecido con algún alcohol (95%). (El tamiz se debe elegir teniendo en cuenta el tamaño de los granos de polen). El tamiz es ubicado en un embudo a través del cual el líquido que contiene el polen es vertido en otro tubo de centrifuga.

- Centrifugar, decantar, y agregar alrededor de 12 gotas de una mezcla de agua-glicerina (50:50).

- Dejar que la mezcla repose 15 minutos, centrifugar, decantar y luego colocar los tubos de centrifuga con el sedimento polínico boca abajo sobre un papel de filtro por 2 horas (si se considera apropiado, los tubos pueden ser colocados en una estufa a 50 °C o durante la noche a 20 °C).

- Tomar con una pipeta Pasteur o similar, 0.02 ml y depositarlos uniformemente en el centro de un portaobjetos, secar a no más de 40 °C, agregar solución de glicerina-gelatina y cubrir con cubreobjeto, sellando la preparación con parafina.

Posteriormente para a determinación:

Se observo al microscopio realizando los recuentos de entre 500 a 1000 granos –para poder estimar la frecuencia relativa de cada tipo polínico- (anotando la proporción de cada especie que aparece en ellos, previa comparación e identificación con la palinoteca de referencia, utilizando además bibliografía de referencia (Heusser, 1971; Markgraf & D’Antoni, 1978; Erdtman, 1986; Wingenroth & Heusser, 1984; Tellería, 1987; 1991; 1995; 2000; Roubik & Moreno Patiño, 1991; Pire et al., 1998; 2002; 2006).

Los parámetros que se evaluaron para la identificación del grano de polen son: forma, tamaño, polaridad, simetría, elementos esculturales y estructurales de la esporodermis, aberturas, etc.

Los resultados se expresan en porcentajes.

### **Medidas espectroscópicas**

Las muestras de miel se analizaron en el rango de longitud de onda de 1100 – 2500 nm en un instrumento monocromador NIRS 5000 (NIR Systems, Silver Spring, Maryland, USA) en una cubeta de 2 mm. Los datos de reflectancia se guardan como el logaritmo (1/R) (donde R = reflectancia) a 2 nm de intervalo. La luz difusa reflejada (R) por la muestra se registra en detectores de sulfuro de plomo, luego es amplificada, digitalizada, transformada en log 1/R y enviada a una computadora para su almacenamiento y procesamiento.

### **Extracción de compuestos volátiles en miel**

La resina polimérica del tipo estireno divinilbenzeno es un soporte adsorbente muy hidrofóbico derivatizado con la presencia de grupos fenoles. Esto determina que se disponga de una superficie fácilmente hidrofílica, eliminando la necesidad del acondicionamiento previo en el uso con soluciones acuosas, y presentando una gran capacidad de adsorción. La extracción de los compuestos volátiles se realizó utilizando cartuchos tipo ISOLUTE ENV+ según el método puesto a punto para mieles en nuestro laboratorio por Bonini (Bonini, A. et al., 2011).

El procedimiento a utilizar permite la extracción de compuestos volátiles a partir de 80 g de miel.

### **Identificación y cuantificación de compuestos volátiles**

La identificación de los compuestos volátiles presentes mieles se realizó mediante GC-MS utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado con un detector de masa Shimadzu QP 5050 y equipado con columnas capilares de sílica fundida. Las condiciones de trabajo fueron las reportadas en Bonini (Bonini, A. et al., 2011).

La identificación se realizó utilizando bases de datos con espectros de referencia y base de datos propia realizada con estándares datos reportados en la literatura. La identificación de los compuestos se confirma por medio de la determinación de índices de retención lineal (Kovats), obtenidos utilizando una mezcla de n-alcános de referencia (C9-C26).

### **Cuantificación de los compuestos aromáticos**

La cuantificación de los compuestos volátiles presentes en miel, se realizó por cromatografía gaseosa de alta resolución (HRGC) utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo GC-14, equipado con detector de ionización de llama (FID) y software de procesamiento de datos Shimadzu EZ-Chrom. Se utilizaron las mismas condiciones y el mismo tipo de columna capilar descriptos en la identificación por GC-MS.

## Síntesis de resultados y conclusiones

### Resultados

#### 1: Evaluación de las características físico-químicas

La Tabla 1 muestra los promedios, desviaciones estándar y rangos de referencia para los diferentes parámetros físicoquímicos estudiados en tres cosechas consecutivas. Las diferencias entre los parámetros físicoquímicos en las mieles de ambas regiones aparecen también en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Parámetros físicoquímicos de muestras de miel (promedio±desviación estándar)

SAMPLES	pH	MOISTURE (%)	HMF (MG/KG)	ACIDITY (MEQ/KG)	CONDUCTIVITY (MS/CM)	INVERT SUGAR (%)	SUCROSE (%)	ASH (%)	COLOR (MM PFUND)	DIASTASE (DN)
CONCORDIA										
HARVEST 1	3,31±0,20	18,76±0,68	0,70±0,22	22,86±4,48	0,28±0,01	70,18±2,35	3,15±2,18	0,19±0,13	52,44±3,78	7,29±1,03
HARVEST 2	3,73±0,01	19,67±0,22	0,20±0,06	24,17±1,32	0,39±0,01	71,87±2,16	5,11±3,38	0,23±0,06	59,84±6,32	13,90±0,68
HARVEST 3	3,84±0,03	18,22±0,24	0,63±0,19	19,48±0,77	0,31±0,0067	63,70±11,49	7,29±6,11	0,10±0,03	52,15±3,43	10,31±0,45
SALTO										
HARVEST 1	3,16±0,16	19,06±1,05	0,36±0,22	19,54±2,56	0,54±0,41	69,08±2,36	3,12±2,37	0,17±0,04	58,95±14,54	7,59±1,89
HARVEST 2	3,69±0,12	18,639±0,58	0,042±0,04	18,82±1,68	0,36±0,06	71,37±5,87	3,72±1,20	0,247±0,04	55,02±3,53	13,93±1,48
HARVEST 3	3,31±0,18	17,73±0,21	0,27±0,22	22,89±1,81	0,422±0,04	68,99±7,78	5,36±3,99	0,26±0,12	66,96±1,20	17,00±5,84
REFERENCE		≤20	≤60	≤50	≤0,8	≥60	≤5	≤0,6	49-83	≥8

Los valores de pH medio obtenido para mieles cítricas de esta región presentan valores normales aunque son sensiblemente menores a los encontrados por distintos autores para miel de citrus de diferente origen geográfico: mieles monoflorales de *citrus spp.* españolas un valor promedio de pH de 3.91 (Bosch y Mateo et al., 1984); mieles de *citrus spp.* italianas un valor promedio de pH de 3,9 (Accorti et al., 2002).

El contenido de humedad de la miel depende de las condiciones de cosecha, de maduración y condiciones climáticas y puede variar año a año (Finola et al., 2007; Gomes et al., 2010). Los valores promedio obtenidos en todos los casos se encuadran en lo establecido por las normas internacionales para garantizar su adecuada conservación sin riesgo de fermentación.

Índice de Diastasa y contenido de HMF son parámetros usados para evaluar la frescura de la miel (Sancho et al., 1992; Terrab et al., 2002). Los valores promedio obtenidos para ambos parámetros se encuentran dentro de los rangos de referencia de las normativas internacionales, evidenciando que se trata de miel fresca y que no ha sido sobrecalentada.

Las mieles de citrus se caracterizan por su color claro, correspondiendo generalmente a una denominación comercial que va del blanco al ámbar claro. Los resultados obtenidos permiten clasificar las mieles estudiadas como ámbar claro en la Escala Pfund (de 49 a 83 mm Pfund).

El contenido de cenizas de la miel está relacionado con su origen (floral o no floral) (White, 1978) y con la conductividad eléctrica (Crane, 1975), y es un indicador de contenido mineral. Se considera

un marcador de calidad que apunta a los orígenes botánicos y geográficos de la miel (Saxena et al., 2010). Los valores obtenidos son manifiestamente mayores a los informados para mieles cítricas de Extremadura (España) con 0,075% de cenizas (Riolobos Rendón, S. y col., 1.999) y de Arabia Saudita un contenido promedio de cenizas totales de 0,06% (Hanza M. Abu-Tarboush y col., 1992).

Asimismo la conductividad eléctrica depende de la concentración de sales minerales, de ácidos orgánicos, proteínas y otros materiales complejos como azúcares y polioles.

Varía según el origen floral entre amplios límites (de 0,1 a 0,5 mS/cm), pudiendo decirse que las mieles muy coloreadas y los mielatos conducen mejor la corriente que las mieles florales de colores claros (Saénz Lain, C. y col., 2000), siendo el máximo aceptado internacionalmente (0,80 mS/cm) para Mielles florales. Las medidas de Conductividad eléctrica obtenidas para ambas regiones son similares, aunque para las muestras de Salto son levemente superiores. Sin embargo, todas superan los valores encontrados para mieles cítricas de otros orígenes geográficos: 1,84  $\mu$ S/cm mieles monoflorales de Citrus spp. españolas (Bosch y Mateo et al., 1984) y 1,8  $\mu$ S/cm para mieles de Citrus spp. italianas (Accorti et al., 2002). Constatamos una correlación positiva y significativa entre color, cenizas y conductividad.

Además de conformar el sabor de la miel, los ácidos contribuyen a la estabilidad del producto frente a los microorganismos, que se hallan presentes de una manera natural. La acidez total de la miel se expresa en miliequivalentes por kilogramo (meq/Kg), variando entre 10 y 60 meq/Kg. (Saénz Lain, C., y col., 2000). Los valores de acidez obtenidos, evidencian que las muestras se encuentran muy por debajo de los valores límite máximo establecido por la normativa internacional. Para mieles de monoflorales de Citrus spp. italianas se hallan valores promedio similares, siendo la acidez total es de 17,4 Meq/kg. (Accorti et al. 2002). Por otra parte Chandler, (Chandler, et al., 1974) halló un valor ligeramente inferior para mieles de citrus australianas, obteniendo resultados de acidez total de 12.4 Meq/kg, situando entonces nuestras muestras por encima de dicho nivel. En cambio, los valores de acidez total obtenidos son sustancialmente menores que los encontrados tanto para algunas las mieles comerciales de Galicia: 35,65 Meq/kg (García, et al., 1997) como para otras mieles de citrus estadounidenses 37.4 Meq/kg (Chandler, et al., 1974).

Los azúcares reductores que se encuentran en las mieles son principalmente glucosa y fructosa. Ambos son los que van a determinar las propiedades nutritivas y calóricas de este producto y, además, también son las responsables de otras características importantes en las mismas, como son la cristalización, higroscopicidad y viscosidad (Fellows, 1994; Philippe, 1990).

Las mieles estudiadas presentan valores de azúcares reductores superiores al mínimo establecido, indicando que estas mieles son de origen floral. En cuanto al contenido de sacarosa aparente, los resultados refrendan esta observación, ya que están por debajo del máximo establecido. Asimismo, los resultados obtenidos resultan similares a los de mieles cítricas de otros orígenes geográficos: en mieles de Citrus de Extremadura (España) un valor promedio de azúcares reductores de 71,45% (Riolobos Rendón, S. y col., 1.999) y 78,40 % para mieles de citrus de Valencia de (España). (Serra Bonheví, J y col., 1991).

## 2: Determinación del contenido de metales

La Tabla 2 muestra los promedios obtenidos para los diferentes minerales analizados en las muestras estudiadas de las tres cosechas consecutivas. Las diferencias entre los contenidos de minerales en las mieles de ambas regiones aparecen también en la Tabla 2.

El porcentaje de minerales en la miel es muy bajo en comparación con otros componentes, sin embargo, existe una gran variabilidad, siendo el potasio el elemento más abundante (una tercera parte de las cenizas totales) seguido de calcio, magnesio y sodio.

La cuantificación de la fracción mineral en la miel ha sido abordada por diversos autores con diferentes fines: composición natural, caracterización, estudios de cesión en el procesado y almacenaje y como biomarcador de contaminación.



En la miel se han encontrado más de veinte elementos minerales, algunos en muy pequeña cantidad, provenientes del néctar de la planta, de la mielada y del polen. El contenido de minerales en la miel está condicionado por el origen botánico, las condiciones del suelo, el clima y las distintas técnicas de extracción y conservación, que podrían incorporarlos como contaminantes.

**TABLA 2.** Contenido de minerales de muestras de miel (promedio)

SAMPLES	SODIO (MG/KG)	POTASIO (MG/KG)	CALCIO (MG/KG)	MAGNESIO (MG/KG)	HIERRO (MG/KG)	COBRE (MG/KG)	ZINC (MG/KG)	CROMO (MG/KG)	PLOMO (MG/KG)
CONCORDIA									
HARVEST 1	44,74	519,48	47,21	9,71	0,65	NO DETECT	0,58	NO DETECT	NO DETECT
HARVEST 2	25,84	672,13	66,9	6,42	1,48	NO DETECT	0,98	NO DETECT	NO DETECT
HARVEST 3	18,08	611,45	67,21	5,64	1,97	NO DETECT	0,51	NO DETECT	NO DETECT
SALTO									
HARVEST 1	73,24	605,34	69,78	17,87	0,22	0,13	0,55	NO DETECT	NO DETECT
HARVEST 2	35,82	656,44	61,78	11,29	0,91	0,08	1,29	NO DETECT	NO DETECT
HARVEST 3	31,56	900,68	63,82	7,89	0,66	0,78	1,19	NO DETECT	NO DETECT

Conviene recordar que la composición mineral de una planta sujeta a dos factores:

Primero a su naturaleza, que determinará su mayor o menor tendencia a retener o almacenar, en algunas partes u órganos, cantidades determinadas de los elementos minerales que absorbe del suelo, y en menor medida del aire.

Segundo a la composición mineral del propio suelo, o agua y su riqueza en determinados elementos, o en general los llamados factores edafoclimáticos.

Así pues, de una parte, el exceso o insuficiencia de ciertos elementos químicos en suelos, rocas o aguas (Varju, 1970; Ghizelan, et al, 1971; Petrovic et al, 1993) y, de otra, la propia fisiología vegetal dependiente de la especie o variedad (Pratt et al, 1982; Free et al., 1984; Crane, 1984; Varju, 1970), quedan reflejados en la composición mineral de las plantas y, por tanto, presumiblemente en el néctar, polen o mielada. Por ello es previsible que una característica geográfica como es el suelo y vegetación, afecte de forma diferencial al contenido mineral de las mieles producidas en ella y sea, por tanto, un patrón de caracterización o diferenciación tanto de origen botánico como geográfico, aunque no exclusivo.

Los resultados obtenidos muestran que existe una variación en el contenido de los minerales Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu y Zn para las diferentes cosechas, así como también que los valores para cada una de las regiones presentan diferencias. Lo cual es coincidente con el criterio de identificación geográfica. Respecto a los minerales considerados contaminantes (Cr y Pb) no fueron detectados en las mieles estudiadas.

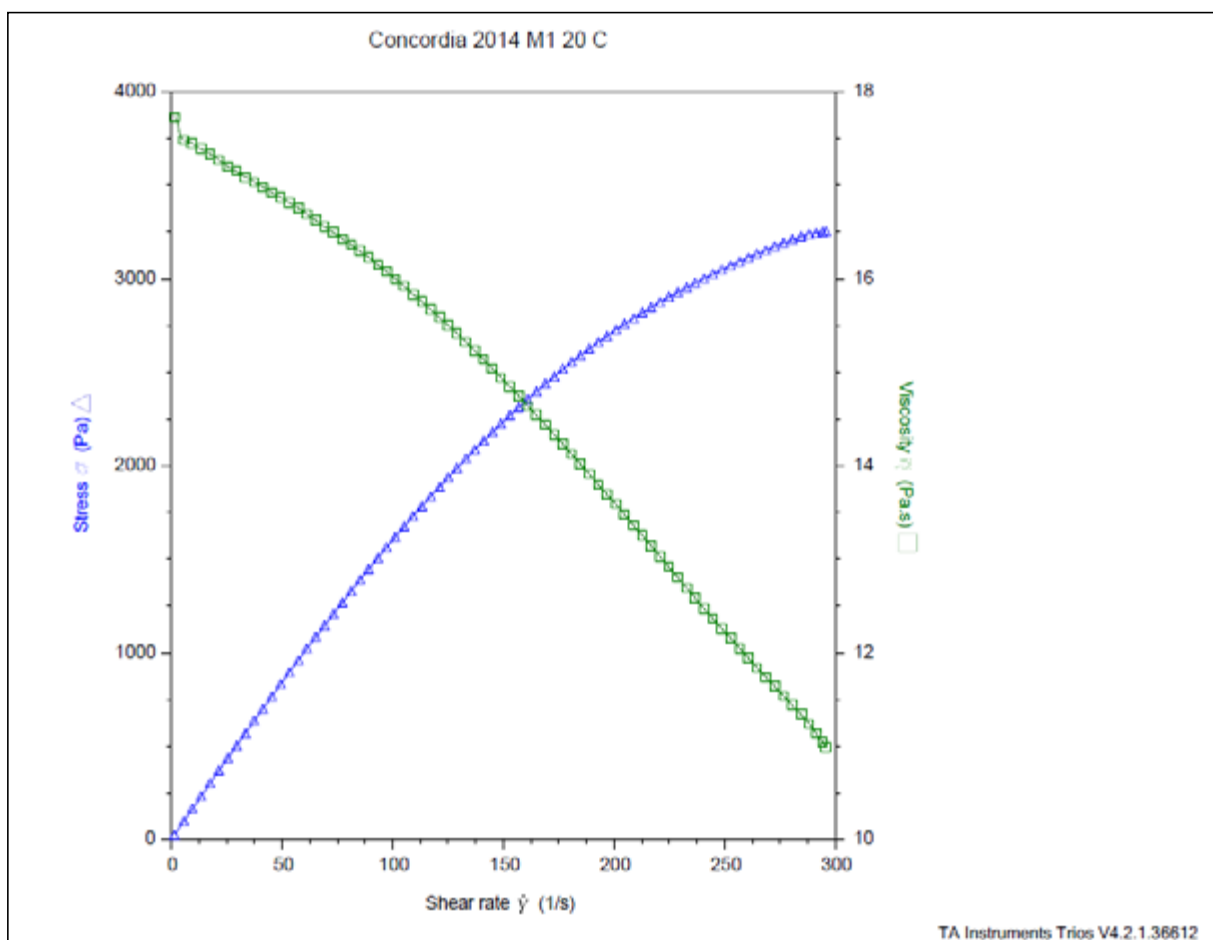
Desde el punto de vista nutricional, las mieles estudiadas no poseen un contenido de oligoelementos esenciales suficiente para considerar su contribución a la Ingesta Recomendada (IR), cuando se considere la cantidad de miel que integra la dieta habitual. Ninguno alcanza la condición de satisfacer al menos 10% de la IR en las mieles estudiadas para que se autorice en su etiquetado la expresión "rico en..."

### 3: Determinaciones de viscosidad

Se desarrollo y puso a punto una técnica para determinación de viscosidad en miel utilizando Reómetro DISCOVERY HR-1, con tecnología de avanzada.

Se obtuvieron resultados exploratorios que nos permiten observar las variaciones de comportamiento reológico de la miel al variar la temperatura.

Se realizaron ensayos en tres temperaturas diferentes para las distintas muestras: 20°, 30°C y 40°C. La Figura 1 muestra la grafica obtenida para una muestra ensayada a la 20°C y La Figura 2 la misma muestra ensayada 40°C. Las diferencias en las gráficas nos permiten observar las variaciones de comportamiento al variar la temperatura. Los ensayos realizados son la base para el desarrollo de estudios específicos para profundizar en la interpretación y el desarrollo de conocimientos en relación de esta propiedad física.



**FIGURA 1.** Grafica de variación de viscosidad aparente, cizalla y esfuerzo cortante para muestra a Temperatura 20°C

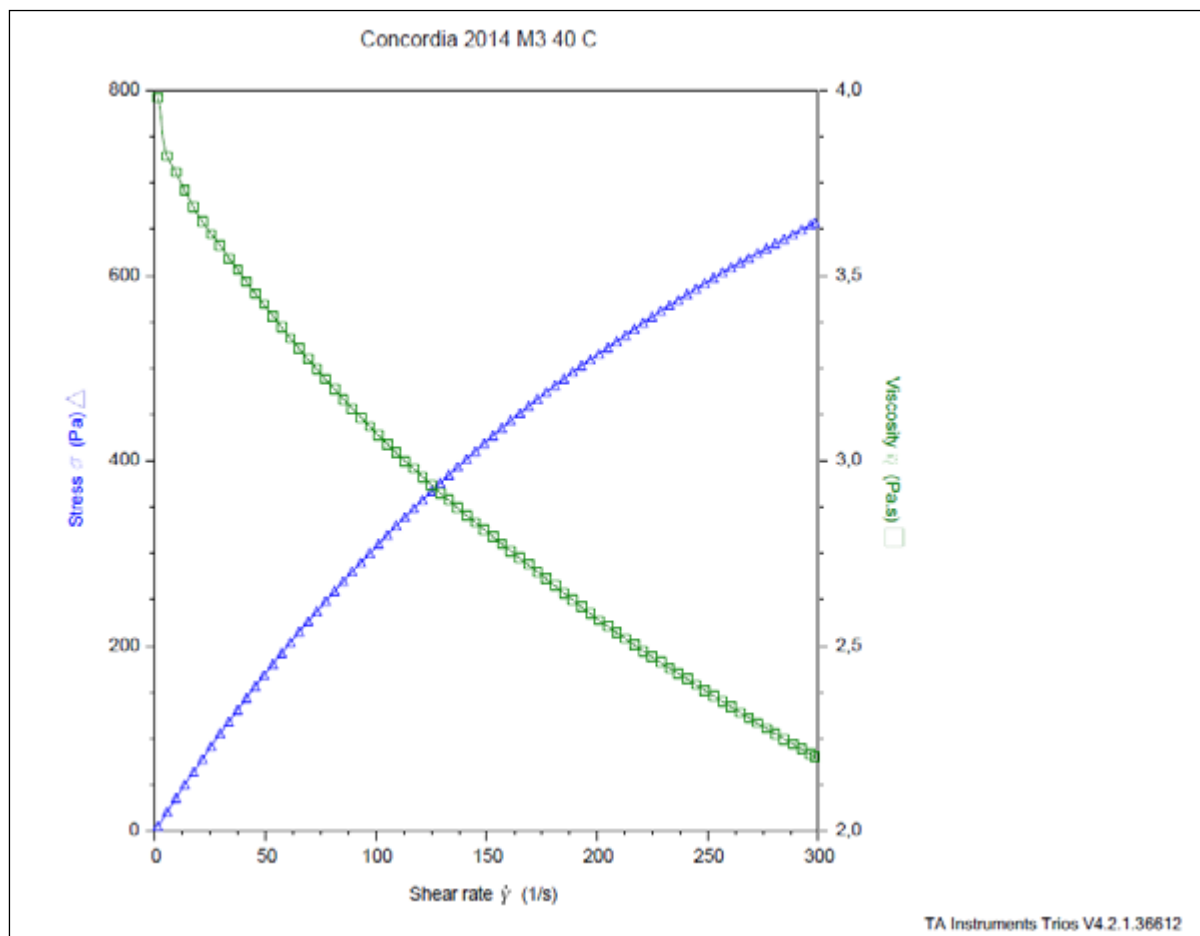


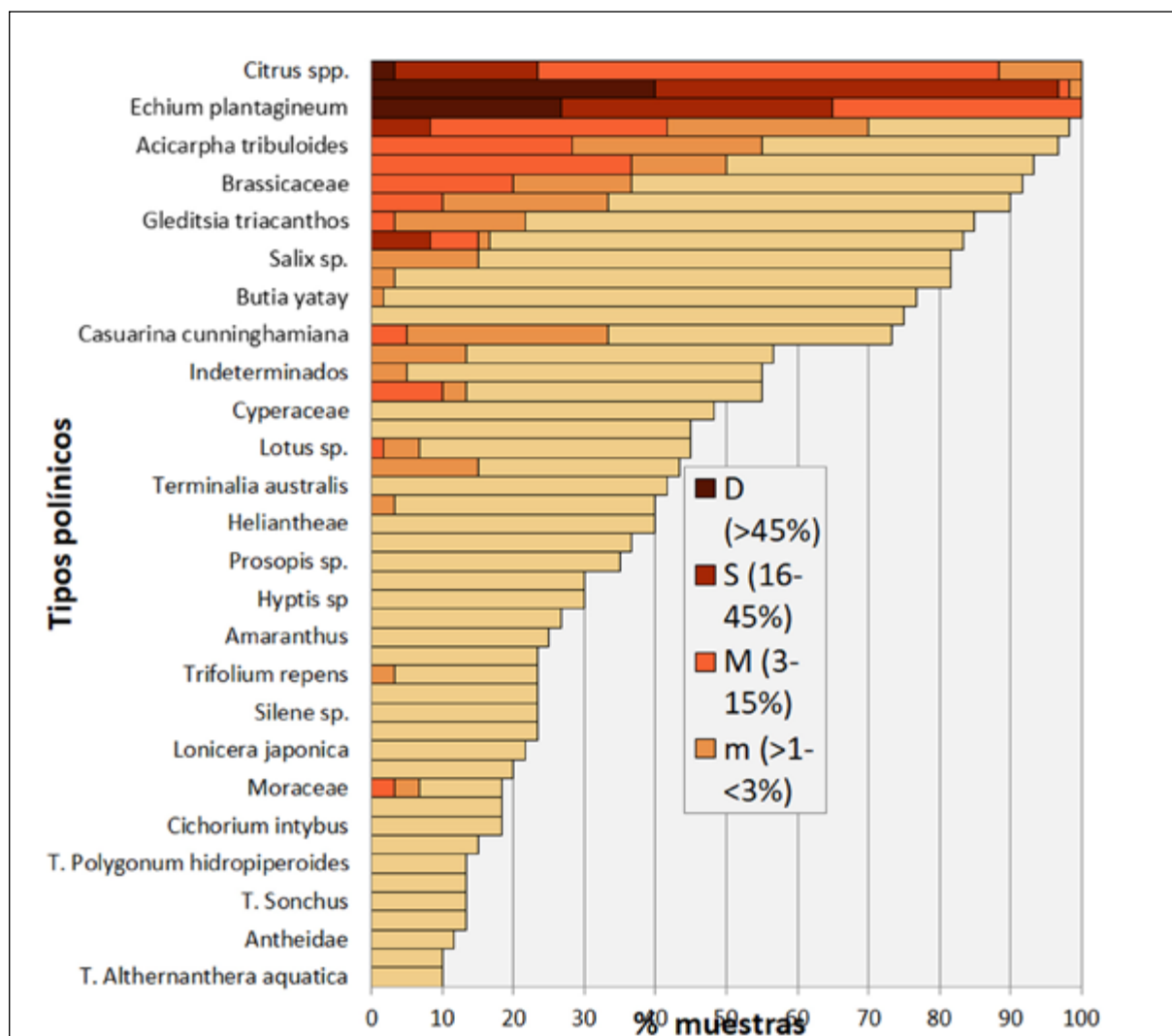
FIGURA 2. Grafica de variación de viscosidad aparente, cizalla y esfuerzo cortante para muestra a Temperatura 40°C

#### 4: Estudio del contenido polínico

Se analizó el espectro polínico de 60 muestras comerciales de miel de Citrus spp., provenientes de la región fronteriza Argentina (Dpto. Concordia) - Uruguay (Dpto. Salto), correspondientes a tres cosechas consecutivas. Las muestras fueron procesadas por técnicas melisopalinológicas convencionales.

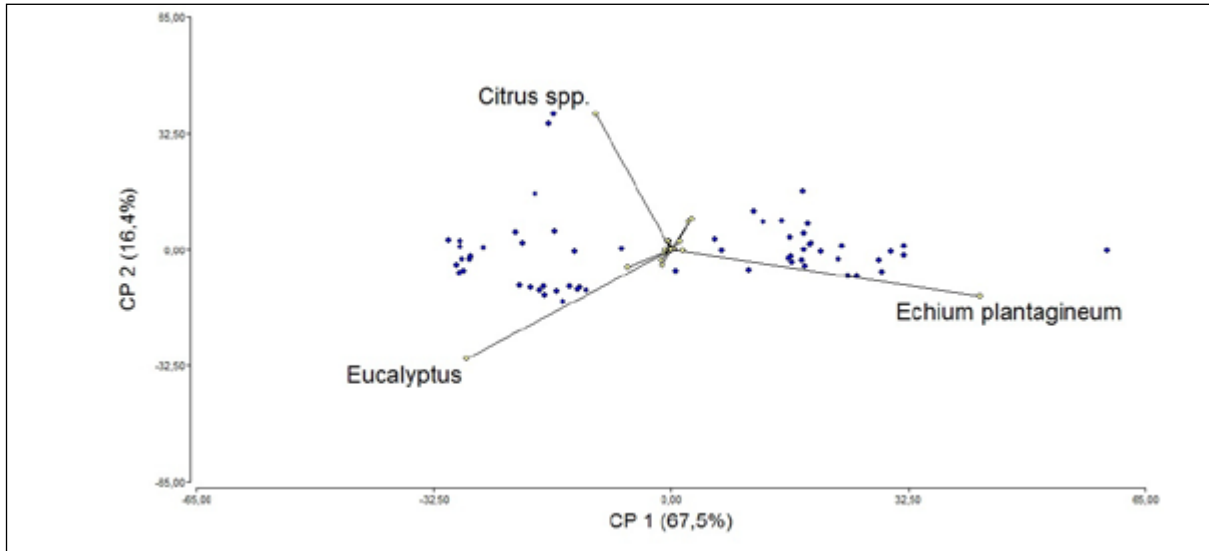
El porcentaje de Citrus spp. varió entre 1.5-46.7%. Se identificaron 89 tipos polínicos, correspondientes a 40 familias botánicas. La diversidad polínica por muestra fue media a alta, con valores comprendidos entre 11-31. (Figura 3)

Los tipos polínicos acompañantes más frecuentes fueron: Schinus spp., Eryngium spp., Butia yatay, T. Baccharis, Brassicaceae, Echium plantagineum, Acicarpha tribuloides, Celtis sp., Gleditsia triacanthos, Eucalyptus spp., y Fraxinus sp. presentes en el 100% de las muestras. Como pólenes secundarios se presentaron: Echium plantagineum, Eucalyptus spp. y Schinus spp. (este último sólo en Salto).



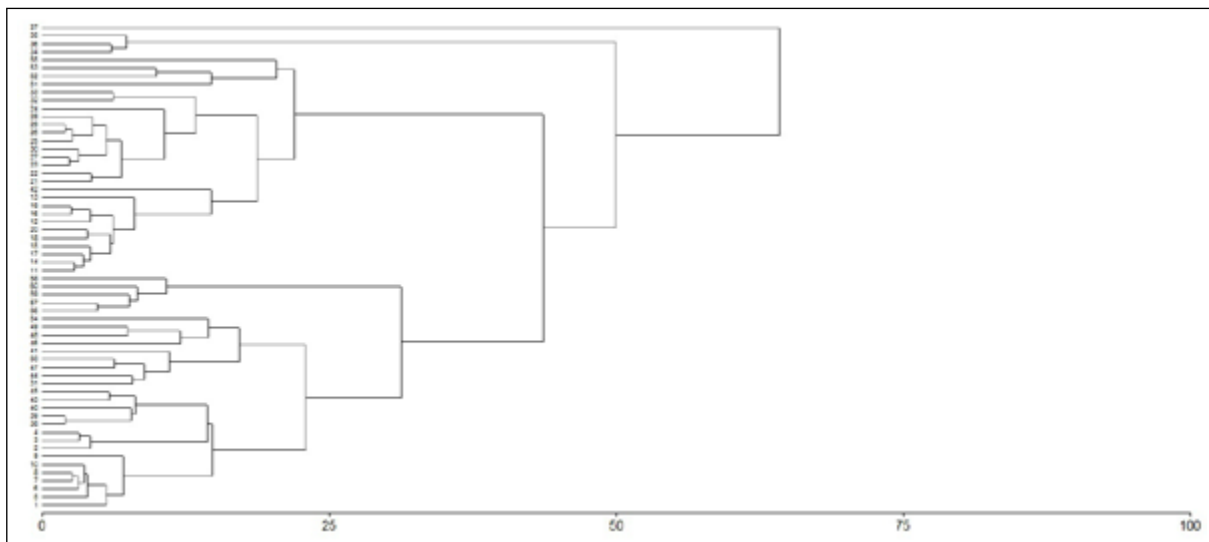
**FIGURA 3.** Frecuencia de aparición y clases de frecuencia de los tipos polínicos más frecuentes (> 10%).  
 D: polen dominante, S: polen secundario, M: polen de menor importancia, m: polen menor y +: polen presente.

La asociación polínica que caracteriza geográficamente a estas mieles se conforma por *Citrus spp.*, *Eucalyptus spp.*, *Echium plantagineum*, *Schinus spp.*, *Casuarina cunninghamiana*, *T. Baccharis*, *Acicarpa tribuloides* y *Butia yatay*. En la Figura 4 se presenta el análisis de componentes principales que separo a las muestras por tipos polínicos



**FIGURA 4.** Análisis PCA separación de muestras por tipos polínicos: Citrus, Eucalyptus y Echium.

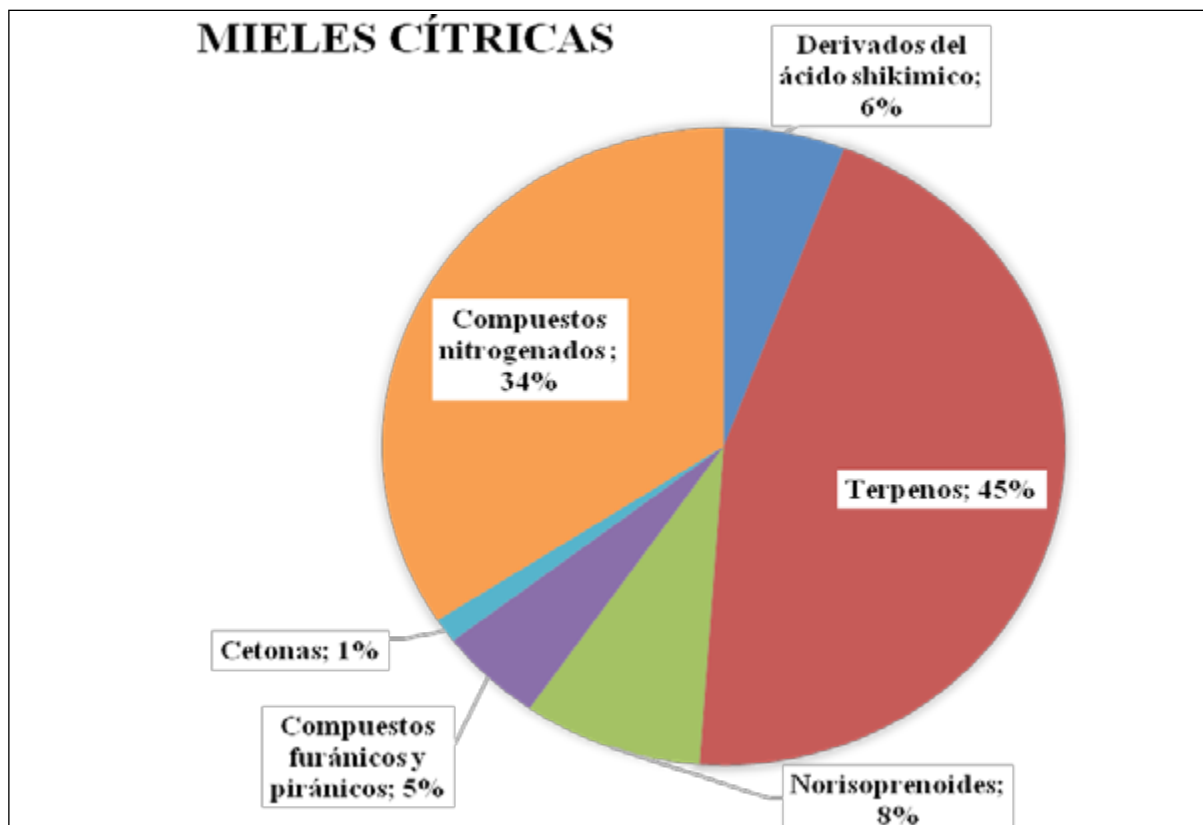
El análisis de Cluster (Figura 5) permitió observar espectros polínicos muy similares entre ambas subregiones, con mayor semejanza entre las muestras de cada país. Las mieles de Citrus de la región bajo estudio se caracterizaron por una riqueza polínica alta (clases III: 70%, II: 20%, I y IV 5% c/u), debido a la presencia de especies acompañantes altamente melitófilas y poliníferas (Eucalyptus spp., Echium plantagineum y Schinus spp.) cuyos pólenes se encuentran sobre-representados en las mieles.



**FIGURA 5.** Análisis de conglomerados: Espectros polínicos similares entre subregiones.

### 5: Compuestos aromáticos

En la Figura 6 se presentan los resultados para las mieles estudiadas, expresados como la distribución porcentual de cada grupo de compuestos aromáticos.

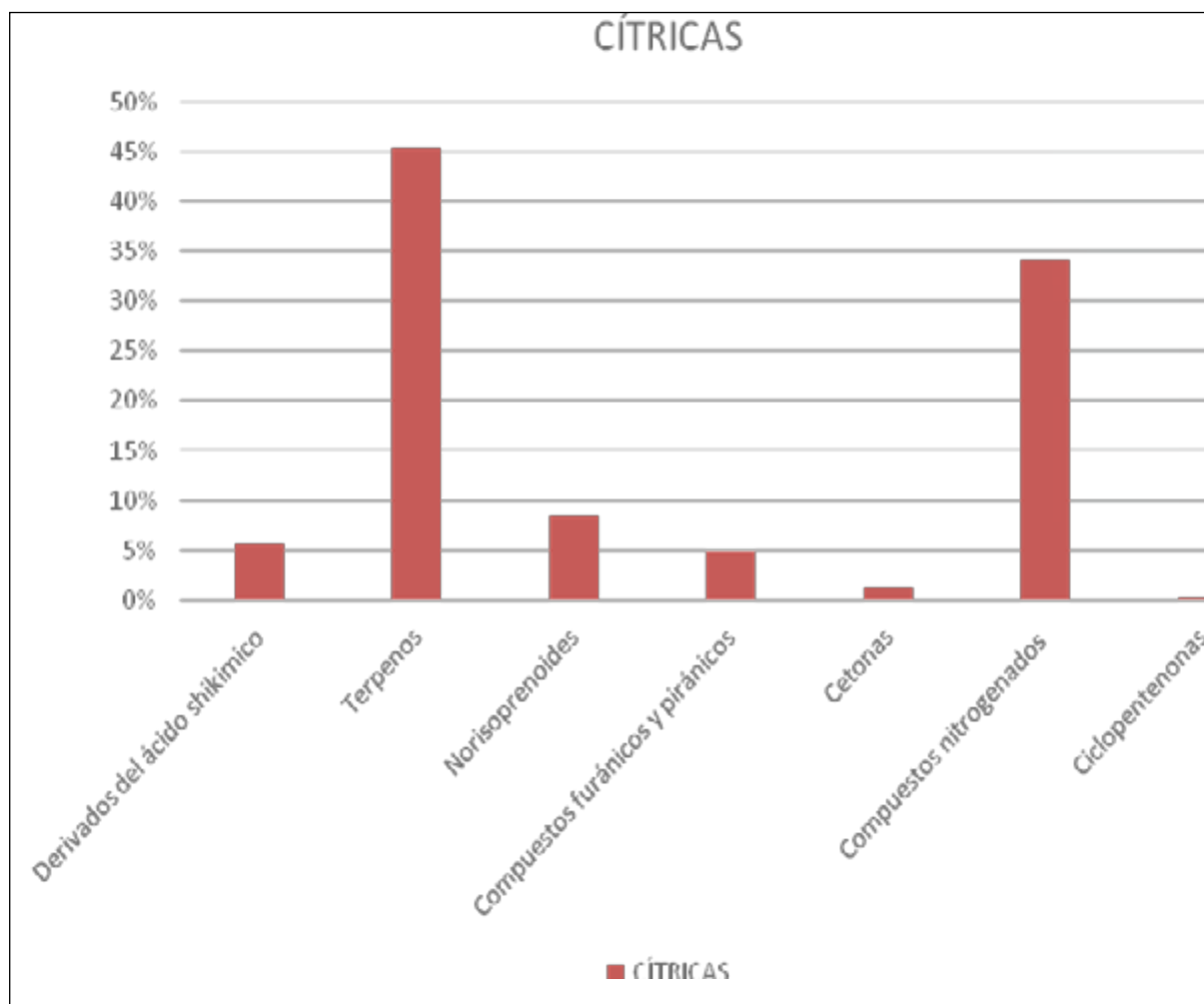


**FIGURA 6.** Distribución porcentual de cada familia de Compuestos Aromáticos en las mieles estudiadas

De las familias estudiadas se encontró que los terpenos y los compuestos nitrogenados están en porcentaje mayor en mieles cítricas (Figura 7).

Dentro de los compuestos terpénicos encontrados se observó que el trans-8-hidroxilinalol se presenta en mayor porcentaje en las mieles cítricas. El trans-8-hidroxilinalol está presente en los aceites esenciales cítricos, tanto en las flores como en los frutos (Reineccius, 2007), lo que podría explicar este comportamiento.

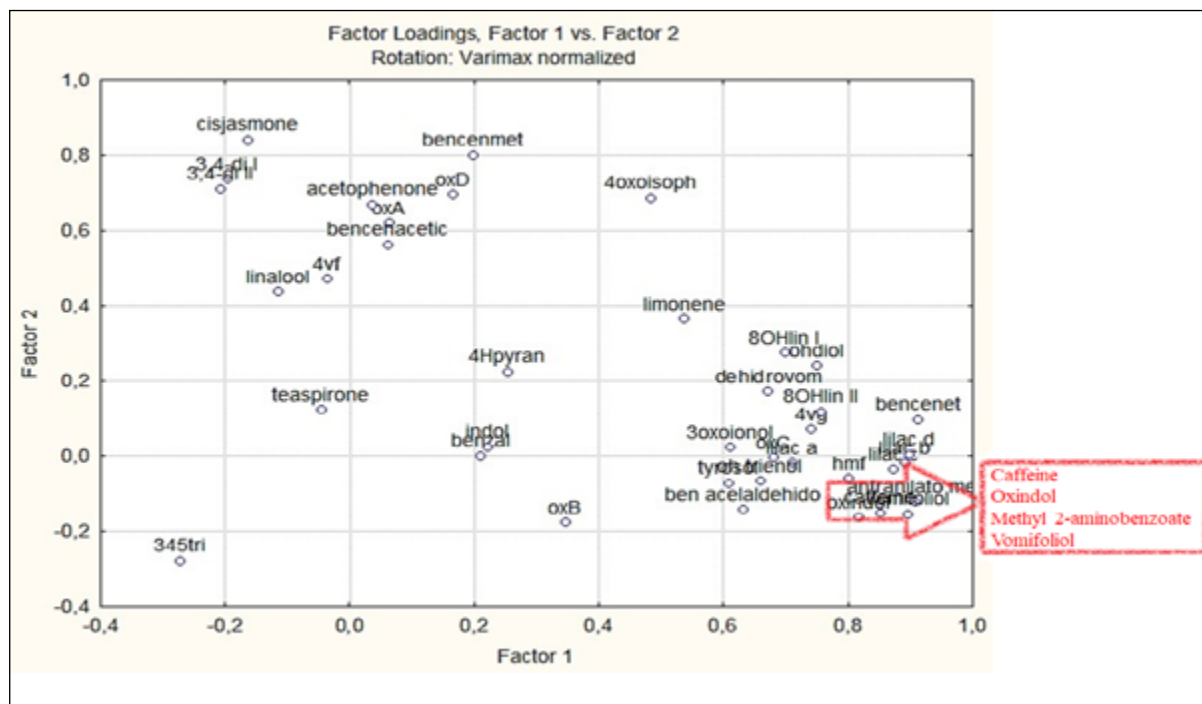
La mayor proporción de los compuestos nitrogenados en las mieles cítricas se debe al mayor porcentaje de cafeína. Este compuesto se encuentra en las flores de citrus (Kretschmar, J. 1999). También esta reportada la preferencia de las abejas por la cafeína (Couvillon, M., 2015)



**FIGURA 7.** Grafico de barras de distribución porcentual de cada familia de Compuestos Aromáticos en las mieles estudiadas

El análisis de componentes principales presentado en informes de avance anteriores con las primeras mieles dio como resultado que los componentes que diferenciaban a las mieles cítricas antranilato de metilo, cafeína y oxindol. Realizando un análisis similar aplicado a las muestras de las tres cosechas, se refrendan estos resultados.

En la Figura 8 se marcaron en rojo los componentes antranilato de metilo, cafeína, oxindol y vomifoliol, los cuales serían los marcadores de mieles cítricas (Alissandrakis et al., 2005; Piasenzotto et al., 2003; Melliou and Chinou, 2011)



**FIGURA 8.** Proyección de los componentes volátiles seleccionados para el análisis por componentes principales (PCA)

También se realizaron medidas NIR, según los objetivos planteados. Las medidas se realizaron considerando el espectro de reflectancia al infrarrojo cercano (1000-2500 nm) obtenido en un equipo Perkin Elmer Perkin Elmer FT-NIR Spectrometer FRONTIER. (Corbella et al, 2005; Karoui et al., 2007; Ruoff et al., 2006; Davies et al., 2002; Downey et al., 2003).

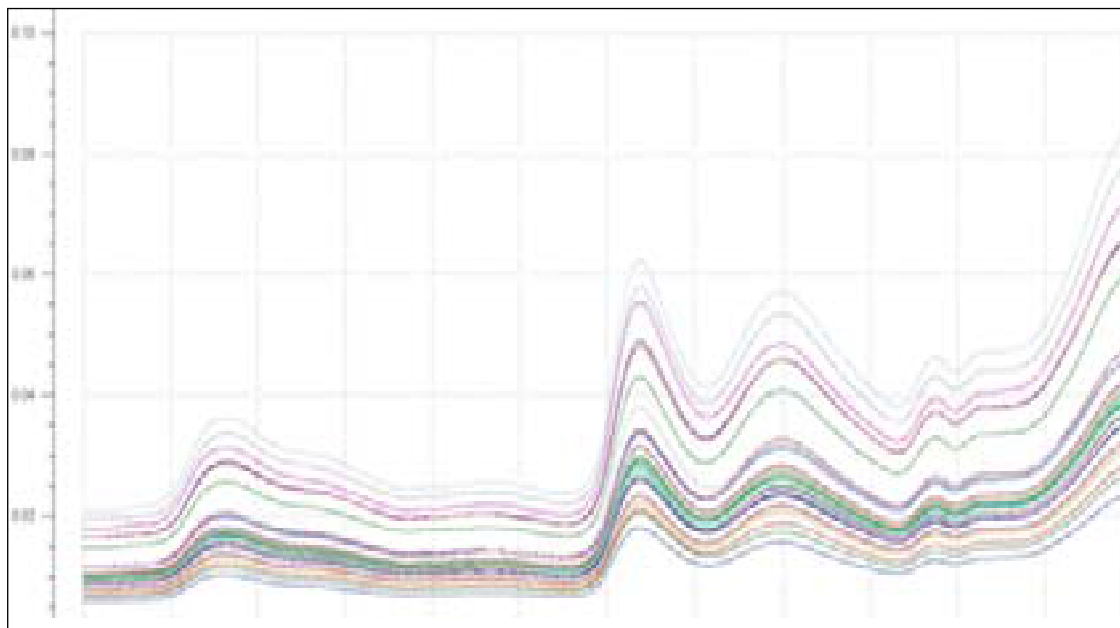
Luego se realizó la correlación entre las medidas espectroscópicas en NIR y el análisis polínico de las mieles. Los resultados obtenidos se interpretaron estadísticamente, realizándose análisis de la Varianza (ANOVA) con los paquetes estadísticos The Unscrambler software (versión 9.5; CAMO ASA, Norway), Estadística 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, 1984–2005) y el software MetaboAnalyst 2.0.

Se compararon los espectros NIR de mieles de citrus con mieles de diferente composición mediante análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLSDA), de modo de verificar si mediante el análisis por NIR era posible predecir el origen botánico de mieles monoflorales. La verificación del modelo se realizó mediante la aplicación del test de permutaciones basado en la distancia de separación de datos [ $p < 5e-04(0/2000)$ ].

Los datos obtenidos de los análisis polínicos se redujeron a doce especies de polen, ya que las variedades de polen presentes eran más de treinta. En la Figura 9 se presentan los espectros de NIR de las muestras.

Para poder utilizar el software Metabo Analyst fue necesario reducir el número de variables, posteriormente al tratamiento de normalización y promediado que se les hace a los espectros. Se sacaron regiones del espectro que no aportaban información y se trabajó con 4500  $\lambda$  de las 6000  $\lambda$  que se registraron en un principio. Se fueron reduciendo los grupos de mieles primero se trabajó con siete orígenes polínicos y se redujeron hasta dos orígenes polínicos, citrus y no citrus que es cuando se obtuvo un buen resultado en el PLS-DA.

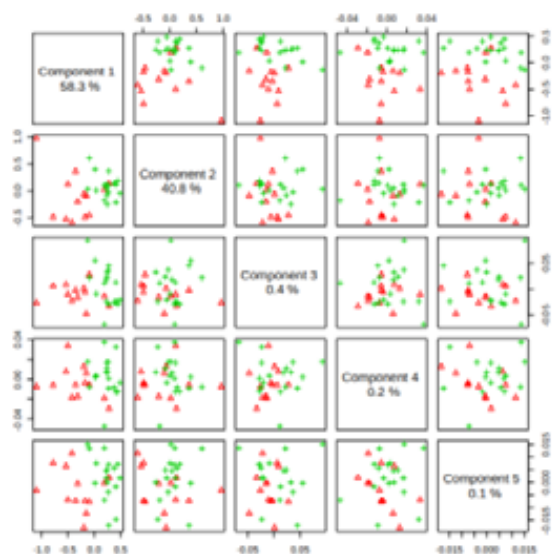




**FIGURA 9.** Espectros NIR de las muestras analizadas

La miel de citrus tiene la particularidad de tener un alto valor comercial y su caracterización se realiza por análisis polínico, cuando una miel contiene más de un 10 % de polen de citrus se considera miel de citrus. En este caso se logró una buena separación a través del análisis del espectro de NIR de las mieles de citrus.

En la Figura 10 se observa que con dos componentes ya se puede explicar más del 99% de la varianza del sistema, pero el programa recomienda utilizar los tres primeros componentes principales. En la Figura 9 se observa la representación gráfica de los tres primeros componentes principales. En la Figura 10 se muestra el test en el cual recomienda trabajar con tres en vez de con dos componentes principales.



**FIGURA 10.** Pares de los valores alcanzados de varianza de los distintos componentes principales (PC).

La varianza explicada de cada componente se muestra en la celda diagonal correspondiente

## **Conclusiones**

Del estudio realizado surge que los parámetros: Color, Conductividad Eléctrica, Contenido de Cenizas y Minerales pueden ser utilizados para caracterizar la miel de citrus de la región fronteriza de Concordia (Argentina) y Salto (Uruguay), contribuyendo a la diferenciación por su origen botánico y geográfico.

Los parámetros fisicoquímicos ensayados permiten además confirmar la calidad bromatológica de las mieles estudiadas y el uso de buenas prácticas de manipulación en los procesos productivos y de extracción.

Las mieles de Citrus de la región bajo estudio se caracterizaron por una riqueza polínica alta (clases III: 70%, II: 20%, I y IV 5% c/u), debido a la presencia de especies acompañantes altamente melitófilas y poliníferas (*Eucalyptus* spp., *Echium plantagineum* y *Schinus* spp.) cuyos pólenes se encuentran sobre-representados en las mieles. Los espectros polínicos de las muestras estudiadas permiten asociarlas a la región de producción.

Al completar el estudio de la composición volátil para las mieles de la región Concordia-Salto, se pudieron identificar y caracterizar compuestos volátiles que pueden ser utilizados como marcadores de las mieles cítricas.

En el perfil de compuestos volátiles de las mieles cítricas se destacaron concentraciones elevadas de terpenos (*cis*- y *trans*-8-hidroxicinoleol), furanoides y derivados del ácido shikímico (antranilato de metilo). Este hecho resulta particularmente importante ya que, si bien las mieles cítricas no necesariamente presentan aromas y sabores vinculados a los cítricos, la presencia de estos compuestos como una constante, permite pensar en su utilización como marcadores para estas mieles, en esta región productiva.

Este hecho podrá ser complementado a partir de los resultados a ser obtenidos por la Lic. Bonini donde los datos de masa isotópica para isótopos estables (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O, D/H) pueden dar indicios estadísticamente validables acerca de elementos objetivos para caracterizar este tipo de miel.

Asimismo, con los resultados obtenidos, es posible afirmar la validez de un modelo de predicción de origen de las mieles cítricas utilizando espectroscopia NIR.

## **Indicadores de producción**

En el transcurso del desarrollo del proyecto se participó en diez eventos científicos internacionales, exponiendo distintos aspectos del trabajo de investigación realizado.

Asimismo se realizaron actividades de extensión y difusión en eventos destinados al sector productivo, tanto en Argentina como en Uruguay. En la Jornada SOFRAMA (Sociedad de Fomento Rural Apícola de Maldonado) Jornada destinada a productores apícolas en la que el equipo del Proyecto expuso los objetivos y resultados alcanzados. Se realizó la conferencia Calidad de miel desde el punto de vista comercial y nutricional en la I JORNADA REGIONAL APÍCOLA de la Municipalidad de La Paz, Entre Ríos, 22 de septiembre de 2016. Se participó en las JORNADAS DE DIVULGACION INNIA "NUEVOS RETOS DE LA APICULTURA EN UN AMBIENTE EN TRANSFORMACION" realizadas el 24 de mayo de 2018. Se realizó el Seminario "La miel: un alimento particular" en la Facultad de Ciencias de la Alimentación en 2015. También se dictó el Crédito "Miel y Productos Apícolas" destinado a los alumnos del 4º año de la carrera de Ingeniería de Alimentos de la Fac. de Cs. de la Alimentación (UNER). Duración: 30 horas, como materia optativa de la curricula.

En cuanto a formación de recursos humanos se realizó el informe y defensa oral intermedia de Tesis de Doctorado – Lic. Ana Bonini – Desarrollo de métodos rápidos para la evolución de la calidad y clasificación de mieles uruguayas (Trabajo que incluye parte de las actividades de este trabajo de investigación).

Se obtuvo un premio en la convocatoria “Programa de Incentivo de las Vocaciones para el Estudio de la Física” (INVOFI) de la Asociación Física Argentina con nuestro Proyecto “El físico y los alimentos”, que incluye actividades de aplicación de la física al estudio de la miel.

## Bibliografía

- ANKLAME. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.*, 63 (4), 549-562.
- ASSOCIATION OFF OFFICIAL ANALITICAL CHEMIST (1990). *Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 15 th. Vol.2.* Ed. Arlington. Virginia.
- BALDI CORONEL, B. M.; DALL’OGLIO, A. M.; LEZCANO, S.; GÓMEZ, B. (1994). Caracterización físico-química de las mieles de la provincia de Entre Ríos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, N°8.
- BARBIER, E.C. (1951/1952). La sécrétion de nectar chez les Eucaliptus sp. *Rev. Franc d’Apic.*, 2, 553-559 ; 1, 139-145.
- BEDASCARRASBURE, E (1998). La apicultura como herramienta para el desarrollo. Módulo NEA, 1-7.
- BOGDANOV S. (2009). *Honey Composition Book of Honey*, Chapter 5, *Bee Product Science*, August, www.bee-hexagon.net. Consultado 12 de setiembre de 2012.
- BOIDO E., FARIÑA L., CARRAU F., DELLACASSA E., COZZOLINO D. (2012). Characterization of glycosylated aroma compounds in tannat grapes and feasibility of the Near Infrared Spectroscopy application for their prediction. *Food Analytical Methods*, DOI 10.1007/s12161-012-9423-5.
- BONINI A. , MARTÍN V., FARIÑA L., BOIDO E., DELLACASSA E. (2011). Evaluation of sensory active compounds in the honeys volatile fraction by GC/MS and GC-O analysis. Paper N° 473.00 (*Beekeeping Technology & Quality: Bee Products*). Apimondia. Buenos Aires, Argentina
- BOUSETA A., COLLIN S. (1995). Optimized Likens–Nickerson methodology for quantifying honey flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1890-1897.
- CAMPO E., FERREIRA V., ESCUDERO A., CACHO J.(2005). Prediction of sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *J. Agr. Food Chem.*, 53, 5682-5690.
- CONTI, MARCELO ENRIQUE. (2000). Lazio region (central Italy) Honey: a survey of mineral content and typical quality paramaters. *Food Control* 11 459-463.
- CORBELLA E., COZZOLINO D. (2005). The use of visible and near infrared spectroscopy to classify the floral origin of honey samples produced in Uruguay. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13, 63-68.
- COZZOLINO D. (1998). Aplicación de la tecnología del NIRS para el análisis de calidad de los productos agrícolas. *Serie Técnica INIA* 97.
- COZZOLINO D. (2002) Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Revista Agrociencia*, 6, 25-32.
- COZZOLINO, D., FASSIO, A., GIMÉNEZ, A. (2000). The use od near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *J. Sci. Food and Agric.*, 81, 142-146.
- CUEVAS-GLORY L.F., PINO J.A., SANTIAGO L.S., DUCH. E.S. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.*, 103, 1032-1043.
- CUEVAS-GLORY L.F., PINO, J.A. SANTIAGO L.S., DUCH E.S. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.*, 103, 1032-1043.
- D’ARCY B.R., RINTOUL G.B., ROWLAND C.Y., BLACKMAN A.J. (1997). Composition of Australian honeys extractives. 1 Noroisoprenoids, monoterpenes, and others natural volatiles from. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1834-1843.
- DELAHUNTY C.M., EYRES G., DUFOUR. J.P. (2006). Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci.*, 29, 2107-2125.

- DELAHUNTY C.M., EYRES G., DUFOUR. J.P. (2006). Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci*, 29, 2107-2125.
- ERDTMAN, G. (1960). The acetolysis method. *Svensk Botanisk Tidskrift Utgifuen af Svenska Botaniska föreningen* 54 (4): 561-564.
- ERDTMAN, G. (1986). Pollen morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. E. J. Brill Publishing. Lieden. The Netherlands. 553 pp.
- ESCUADERO A., CAMPO E., FARIÑA L., CACHO J., FERREIRA. V.J. (2007). *J. Agr. Food Chem.*, 55, 4501-4510
- ESPADA HERRERO, T. (1982). El hidroximetilfurfural y el envejecimiento de la miel. *Vida apícola*, vol. 3: 15-16.
- ESPADA HERRERO, T. Y GÓMEZ, A. (1983). Actividad bacteriostática, hidroximetilfurfural, color, contenido en cenizas y elementos minerales de las mieles de naranjo, romero y encina producidas en Cataluña, País Vasco y Extremadura. XXIV Congreso internacional de Apicultura en Bucarest. Bucarest.
- ESTEBAN, L. (1993). La espectrometría de masas en imágenes. *ACK Comunicación*, Madrid, pp. 145-160.
- FELLOWS, P. (1994). Tecnología del procesadote los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- GARCIA ROLLAN, M. (1990). Alimentación humana. Errores y consecuencias. Ed. Mundi-Prensa.
- GIVENS D.I., DEAVILLE E.R. (1999). The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.*50, 1131-1145.
- GIVENS D.I., DEAVILLE E.R. (1999). The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.*, 50, 1131-1145.
- GODEND Y MUR (1982). Adulteración de los alimentos: miel. *Alimentaria*, nº132, pp: 19-29.
- GÓMEZ PAJUELO, A. (1996). Conductividad electrica, acidez y tixotropía. *Vida Apícola* 77: 49-51.
- GRADDON A.D., MORRISON J.D., SMITH J. (1979). Volatile constituents of some unifloral Australian honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 832-837.
- GROSCH W. (2001). Evaluation of the key odorants of food by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses*, 26, 533-545.
- GROSCH W. (2007). Gas Chromatography-Olfactometry of aroma compounds. In: *Flavours and fragrances chemistry, bioprocessing and sustainability*. R. G. Berger (Ed.).Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 362-378.
- GUYOT-DECLERCK C., CHEVANCE F., LERMUSIEAU G., COLLIN S. (2000). Optimized extraction procedure for quantifying norisoprenoids in honey and honey food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5850-5855.
- HEUSSER, C. J. (1971). Pollen and Spores of Chile. Modern Types of the Pteridophyta, Gymnospermae, and Angiospermae. The University of Arizona Press, Arizona, U.S.A. 167 pp.
- IGLESIAS M.T., DE LORENZO C., POLO M., MARTIIN-ALVAREZ P.J., PUEYO E. (2004). Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 84-89.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise (1991). *Studio analitico dei mieli abruzzesi* (82 pp.), Teramo.
- LOUVEAUX J., MAURIZIO A., VORWOHL G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59 (4), 139-157.
- LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, ANNA AND VORWOHL, G. (1970) Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 51(3): 125-138.
- MALDONADO L., BEDASCARRABURE E., ALVAREZ A., CRAIG A., SOLORZANO E., SAMPINI C., VERA N., ORDOÑEZ R., ISLA M.L., (2009). Estudio de marcadores químicos de mieles de limón (*Citrus limon*) de la Provincia de Tucumán, 2º Congreso Argentino de Apicultura, p. 35, 5.13.
- MARKGRAF, V. & D'ANTONI, H. (1978). Pollen Flora of Argentina. The University of Arizona Press, Tucson. Arizona. 208 pp.

- MARTINEZ-GOMEZ, M. E.; GUERRA HERNANDEZ, E.; MONTILLA GOMEZ, J. Y.; MOLINS MARIN, J. L. (1993). Physicochemical análisis of Spanish comercial Eucalyptus honeys. *Journal of Apicultural Research* 32 (3/4): 121-126.
- MATEU ANDRÉS, I., BURGAS MORENO, Ma. E., ROSELLÓ CASELLES, J., 1996. La apicultura valenciana. Tradición y aprovechamiento. Ed. Generalitat Valenciana.
- MAURIZIO A.(1958).Beitrage zur quantitativen pollenanalyse des honigs. 3. Absoluter Gehalt Pflanzlicher Bestandteile in Esparsette, Luzerne, Orangen und Rasphonigen. *Ann. Abeille* 11, 93-106.
- MAYOL R., ACREE T.E. (2001). Advances in Gas Chromatography-Olfactometry. In *Gas Chromatography-Olfactometry. The state of the art.* J.V. Leland, P. Schieberle, A. Buettner, T.E. Acree (Eds.). American Chemical Society, Washington D.C., pp. 1-10.
- NICOLETTI, G. M. (1988). Contributo alla conoscenza del miele di Puglia. *Industrie Alimentari*, 27, 345-349/352.
- PÉREZ, C. Y JIMENO, M. F. (1990). Manejo y alteraciones de la miel. Diez temas sobre apicultura. Ed. M.A.P.A. VIII: 137-150.
- PERSANO ODDO, L.; PIANA, M. L. & RICCIARDELLI D'ALBORE; G. (2007). *I miele regionali italiani. Caratterizzazione melissopalinoologica.* Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. C.R.A. –Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma. 139 pp.
- PHILIPPE, J.M. (1990). *Guia del apicultor.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- PIRE, S. M.; ANZÓTEGUI, L. M. & CUADRADO; G. A. (1998). Flora Polínica del Nordeste Argentino I. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 143 pp.
- PIRE, S. M.; ANZÓTEGUI, L. M. & CUADRADO; G. A. (2002). Flora Polínica del Nordeste Argentino II. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 172 pp.
- Revista Española de Ciencia y tecnología de Alimentos.* 34 (5).
- RIOLOBOS RENDÓN, S., SÁNCHEZ-ESCOBERO CARRERO, MA D., (1999). Miel y Polen en Extremadura. Dirección General de Comercio e Industrias Agrarias. Servicio de Control de la Calidad y Apoyo Tecnológico.
- RODGERS, P.E.W. (1979). Honey quality control. In E. Crane (Ed.), *Honey: A comprehensive survey* (pp. 314-325). London: Heinemann.
- ROUBIK, D. W. & MORENO PATIÑO, J. E. (1991). Pollen and Spores of Barro Colorado Island. *Missouri Botanical Garden, St. Louis, EE.UU.* 268 pp.
- SANZ, S.; PEREZ, C.; HERRERA, A. (1994). La Rioja Money composition.
- SANZ, S.; PEREZ, C.; HERRERA, A.; SANZ, M.; JUAN, T. (1995). Composición de las mieles de La Rioja. *Rev. Esp. DE Ciencia y Tecnología de Alimentos* 34(5): 540-552.
- SERRA BONVEHI, J. (1991). Dosage de L'hydroxyméthylfurfural dans les miels par chromathographie liquide et apectrophotométrie U.V. *Sciences des aliments*, n° 11 : 547-557.
- SORIA A. C., MARTINEZ-CASTRO I., SANZ. J. (2003). Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 26, 793-801.
- TELLERÍA, M. C. (1987). Morfología del polen de las especies de *Trifolium* (Leguminosae) de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 25: 149-161.
- TELLERÍA, M. C. (1991). Análisis palinológico comparado de las especies de *Medicago*, *Melilotus* y *Trifolium* (Leguminosae) de la Provincia Fitogeográfica Pampeana (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 27 (1-2): 97-103.
- TELLERÍA, M. C. (1995). El polen de las mieles del noroeste de la Provincia de Buenos Aires. *Darwiniana* 33: 347-364.
- TELLERÍA, M. C. (2000). Contribución a la identificación del polen de mieles pampeanas (República Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 35: 125-136.

- TERANISHI R., WICK E.L., HORNSTEIN I. Flavor Chemistry: 30 Years of Progress. (Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, 1999.
- TERRAB, A.; RECAMALES, A.F.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F.J. (2004). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. Food Chemistry.
- VON DER OHE W., PERSANO ODDO L., PIANA M.L., MORLOT M., MARTIN P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. Apidologie 35, S18–S25, INRA/DIB-AGIB/ EDP Sciences.
- WHITE J.W. (1992), Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C-4 plants sugars in honey: collaborative study; evaluation of improved protein preparation procedure. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (3), 543-548.
- WINGENROTH, M. & HEUSSER, C. J. (1984). Polen en la alta cordillera (Quebrada Benjamin Matienzo) Mendoza; IANIGLA (CONICET), Mendoza. 195 pp.
- XICCATTO G., TROCINO A., CARAZZOLO A., MEURENS M., MAERTENS L., CARABAÑO R. (1999). Nutritive value and ingredient prediction of compounds feeds for rabbits by near infrared reflectance apectroscopy (NIRS). Anim Feed Tech. 77, 201-212.

**PID 8074**

**Denominación del Proyecto**

Determinación de marcadores de origen botánico para mieles de citrus (citrus spp) de la región fronteriza: Concordia (República Argentina) – Salto (República Oriental del Uruguay)

**Directora del proyecto**

TAMAÑO, María Gabriela

**Co-directora**

LOCASO, Delia Elisa

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Ciencias de la Alimentación

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Área:**

Tecnología de los alimentos, apicultura, melisopalinología

**Contacto**

[tamanog@fca.luner.edu.ar](mailto:tamanog@fca.luner.edu.ar)

**Integrantes del Proyecto**

Bonini Arambillete, Ana C; (integrante externo); Dellacassa Beltrame, Eduardo S. (integrante externo); Fariña Iriarte, Laura C. (integrante externo); Fagundez, Guillermina A. (integrante externo); Giudici, Vanesa A.; Maffioly, Rodolfo H.; Pisonero, Mario O.

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/04/2015 y 30/09/2018

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 361/18 (13/12/2018)

[<<< VOLVER AL INICIO](#)