



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO
SOBRE LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA MIEL**

Amanda Consuelo Díaz Moreno

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS**

Programa de Doctorado
Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO
SOBRE LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE LA MIEL**

Memoria presentada por ***Amanda Consuelo Díaz Moreno*** a la Universidad de Zaragoza para optar al grado de Doctor.

Zaragoza, Enero de 2009.

Dirigida por las Doctoras: **Doña Consuelo Pérez Arquillué**
Doña Teresa Juan Esteban



La **Dra. Consuelo Pérez Arquillué**, profesora titular del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos y la **Dra. Teresa Juan Esteban**, jefa de la Unidad de Calidad y Seguridad Alimentaria del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.

Certifican que la presente memoria de tesis doctoral titulada: ***“Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel”***, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Que su contenido se corresponde con el proyecto de tesis aprobado en su día, y que reúne las condiciones requeridas para que **D^a Amanda Consuelo Díaz Moreno**, pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Zaragoza, a veinte y uno de enero de dos mil nueve.

Fdo.: Consuelo Pérez Arquillué

Fdo.: Teresa Juan Esteban

Agradecimientos

La gratitud es más que un sentimiento, es actitud, consciencia, reconocimiento y aprecio. Es una virtud.

El filósofo Martin Heidegger decía pensar es agradecer.

La gratitud es una palabra esencialmente humana, porque nace de lo más recóndito del alma y se alimenta en lo más íntimo del corazón. Es una palabra capaz de mover las profundidades más sensibles del espíritu, es reconocer en la existencia un hecho significativo y vital que potencia el futuro, por lo tanto emerge un reconocimiento a quienes me acompañaron de alguna manera en este recorrido.

Al terminar esta etapa de mi vida, se fortalecen mis sentimientos de gratitud; agradezco a Dios, por cumplir mi sueño, por permitirme asumir el compromiso; el reto fue pensar y pensar es vivir y crear.

Agradezco a la Universidad de Zaragoza que como centro académico me permitió crecer como ser humano y al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón por su apoyo para el desarrollo de este estudio.

Mi sincero reconocimiento a la Dra. Consuelo Pérez Arquillué y a la Dra. Teresa Juan Esteban puesto que sin su confianza, orientación y colaboración la tarea no habría sido posible.

Al Dr. Antonio Herrera Marteache, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación.

A la Diputación General de Aragón por el soporte económico a través del grupo consolidado A01 y a las Ayudas Apícolas.

A los Profesores Ignacio Negueruela y Regina Lázaro por su valiosa colaboración durante las actividades experimentales y en el análisis de los datos.

A los Profesores y amigos del área de Nutrición y Bromatología: Agustín, Javier, Susana, Carmina, Pilar, Juan José, Luis, María Eugenia, Nieves, Presen, Inmaculada, Susana, Marisela, Marta, Mariola, Teresa y Francisco por su apoyo y colaboración.

Con especial afecto al Dr. Domingo Blanco por brindarme siempre su apoyo y una sonrisa amable.

A Carmencita por compartir conmigo lo más importante, su amistad y la sencillez de la cotidianidad de la cual nos quedan muchas experiencias inolvidables, a Casi y su familia por su amistad, calidez y generosidad, que facilitaron mi vida, permitiéndome valorar cada paso en este camino.

Esta experiencia me permitió estar lejos de los seres que amo, pero paradójicamente estuve más cerca de ellos, valoré como nunca su apoyo y comprensión. Con especial cariño, a mis padres y hermanas.

Agradezco toda la alegría que surge en mi conciencia y la oportunidad de saber un poco más para poder ser cada día mejor.

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos	5
3. Revisión Bibliográfica	7
3.1. La miel como alimento	7
3.2. Obtención de la miel	8
3.3. Principales componentes de la miel	14
3.3.1. Azúcares	15
3.3.2. Agua	18
3.3.3. Ácidos	19
3.3.4. Proteínas y aminoácidos	20
3.3.5. Minerales	20
3.3.6. Enzimas	21
3.3.7. Pigmentos.....	22
3.3.8. Compuestos carbonílicos, alcoholes y ésteres.....	23
3.3.9. Vitaminas.....	23
3.3.10. Lípidos	23
3.3.11. Hidroximetilfurfural (HMF)	24
3.3.12. Sustancias bioactivas con actividad biológica	25
3.4. Propiedades físicas de la miel	26
3.4.1. Conductividad eléctrica.....	26
3.4.2. Índice de refracción.....	26
3.4.3. Densidad.....	27
3.4.4. Viscosidad.....	27
3.4.5. Higroscopicidad	28
3.4.6. Cristalización	29
3.4.7. Presión osmótica	30
3.4.8. Rotación óptica específica.....	31
3.5. Calidad de la miel	32
3.5.1. Calidad higiénica	33
3.5.2. Calidad nutricional	34
3.5.3. Calidad comercial	35
3.5.4. Calidad sensorial u organoléptica	36
3.5.5. Calidad de uso o servicio	37
3.5.6. Calidad determinada por componentes psicosociales	37
3.5.7. Calidad de coste	37
3.5.8. Calidad ambiental	37
3.6. Aspectos legislativos y disposiciones de calidad para las denominaciones de origen e indicaciones geográficas protegidas de miel en España.....	39
3.6.1. Norma de calidad relativa a la miel.....	40
3.6.2. Denominaciones de Origen Protegidas de Miel.....	42
3.6.2.1. Miel de La Alcarria.....	42
3.6.2.2. Miel de Granada.....	44

3.6.3.	Indicación Geográfica Protegida de Miel	46
3.6.3.1.	<i>Miel de Galicia</i>	46
3.7.	Sector apícola y producción de miel en España	48
3.7.1.	Estructura del sector	52
3.7.2.	Comercialización	55
3.8.	Envasado de los alimentos	57
3.8.1.	Aspectos generales.....	57
3.8.2.	Materiales de envase	60
3.8.2.1.	<i>Vidrio</i>	61
3.8.2.2.	<i>Cerámica</i>	61
3.8.2.3.	<i>Materiales plásticos</i>	62
3.8.3.	Factores externos que influyen sobre la calidad de un alimento envasado	64
3.8.3.1.	<i>Luz</i>	65
3.8.3.2.	<i>Calor</i>	65
3.8.3.3.	<i>Humedad y gases</i>	66
3.8.3.4.	<i>Microorganismos, insectos, animales y suciedad</i>	66
3.8.3.5.	<i>Resistencia mecánica</i>	67
3.9.	Parámetros físico-químicos y biológicos indicadores de la calidad de la miel almacenada.....	67
3.9.1.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	67
3.9.2.	Color	71
3.9.3.	pH	72
3.9.4.	Acidez libre, láctica y total	73
3.9.5.	Actividad enzimática	75
3.9.5.1.	<i>Actividad diastasa</i>	75
3.9.5.2.	<i>Actividad invertasa</i>	76
3.9.6.	Fenoles totales	77
3.9.7.	Flavonoides totales.....	80
3.9.8.	Actividad antioxidante.....	82
4.	Material, condiciones experimentales y metodología	85
4.1.	Material.....	85
4.1.1.	Miel cruda.....	85
4.1.2.	Materiales de envase	85
4.1.3.	Muestras de miel.....	85
4.2.	Condiciones experimentales	86
4.2.1.	Condiciones de almacenamiento de las muestras	86
4.3.	Repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de análisis	87
4.4.	Metodología – Parámetros físico-químicos	88
4.4.1.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	88
4.4.1.1.	<i>Principio</i>	88
4.4.1.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	88
4.4.1.3.	<i>Descripción del método</i>	89
4.4.2.	Color	90
4.4.2.1.	<i>Principio</i>	90
4.4.2.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	91

4.4.2.3.	<i>Descripción del método</i>	91
4.4.3.	pH.....	93
4.4.3.1.	<i>Principio</i>	93
4.4.3.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	93
4.4.3.3.	<i>Descripción del método</i>	93
4.4.4.	Acidez libre, lactónica y total.....	94
4.4.4.1.	<i>Principio</i>	94
4.4.4.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	94
4.4.4.3.	<i>Descripción del método</i>	95
4.5.	Metodología - Actividad enzimática	96
4.5.1.	Actividad diastasa.....	96
4.5.1.1.	<i>Principio</i>	96
4.5.1.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	96
4.5.1.3.	<i>Descripción del método</i>	98
4.5.2.	Actividad invertasa.....	101
4.5.2.1.	<i>Principio</i>	101
4.5.2.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	102
4.5.2.3.	<i>Descripción del método</i>	103
4.6.	Metodología - Sustancias bioactivas y actividad antioxidante	105
4.6.1.	Fenoles totales.....	105
4.6.1.1.	<i>Principio</i>	105
4.6.1.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	105
4.6.1.3.	<i>Descripción del método</i>	106
4.6.2.	Flavonoides totales.....	109
4.6.2.1.	<i>Principio</i>	109
4.6.2.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	110
4.6.2.3.	<i>Descripción del método</i>	110
4.6.3.	Actividad antioxidante.....	113
4.6.3.1.	<i>Principio</i>	113
4.6.3.2.	<i>Material, reactivos y equipos</i>	113
4.6.3.3.	<i>Descripción del método</i>	114
4.7.	Tratamiento estadístico de los resultados	117
5.	Resultados y discusión	121
5.1.	Influencia de los materiales de envase	122
5.1.1.	Contenido de HMF.....	122
5.1.2.	Color.....	124
5.1.3.	pH.....	128
5.1.4.	Acidez.....	129
5.1.5.	Actividad diastasa.....	131
5.1.6.	Actividad invertasa.....	134
5.1.7.	Compuestos fenólicos totales.....	138
5.1.8.	Contenido de flavonoides totales.....	142
5.1.9.	Actividad antioxidante.....	146
5.2.	Influencia de la temperatura	151
5.2.1.	Contenido de HMF.....	151
5.2.2.	Color.....	153

5.2.3.	pH	155
5.2.4.	Acidez	156
5.2.5.	Actividad diastasa.....	159
5.2.6.	Actividad invertasa	161
5.2.7.	Contenido de fenoles totales	165
5.2.8.	Contenido de flavonoides totales	166
5.2.9.	Actividad antioxidante.....	167
5.3.	Influencia de la iluminación	168
5.3.1.	Contenido del HMF.....	168
5.3.2.	Color	170
5.3.3.	pH	171
5.3.4.	Acidez	172
5.3.5.	Actividad diastasa.....	175
5.3.6.	Actividad invertasa	177
5.3.7.	Contenido de fenoles totales	179
5.3.8.	Contenido de flavonoides totales	181
5.3.9.	Actividad antioxidante.....	183
6.	Conclusiones.....	187
7.	Resumen.....	189
8.	Bibliografía.....	191
9.	Anexo - Resultados del Análisis Estadístico	211
9.1.	Almacenamiento de muestras a 45 ± 1 °C	211
9.2.	Almacenamiento con iluminación	218
9.3.	Almacenamiento sin iluminación	226

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS
TABLAS

Tabla 1. Composición química promedio de la miel.....	15
Tabla 2. Características físico-químicas de la miel – Real Decreto 1049/2003	40
Tabla 3. Condiciones y características de la DO Miel de La Alcarria	43
Tabla 4. Tipos y características melisopalinológicas de la DO Miel de La Alcarria.....	44
Tabla 5. Características físico-químicas de la DO “Miel de Granada”	45
Tabla 6. Características melisopalinológicas de la DO “Miel de Granada”	46
Tabla 7. Características organolépticas de la IGP “Miel de Galicia”	47
Tabla 8. Características melisopalinológicas de la IGP “Miel de Galicia”	48
Tabla 9. Elementos del experimento	86
Tabla 10. Influencia de los materiales de envase y el tiempo de almacenamiento en el contenido de HMF	122
Tabla 11. Influencia de los materiales de envase y el tiempo del almacenamiento en las coordenadas de color	125
Tabla 12. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el contenido de pH .	128
Tabla 13. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la acidez libre.....	130
Tabla 14. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la acidez láctica...	130
Tabla 15. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el la acidez total.....	130
Tabla 16. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la actividad diastasa	131
Tabla 17. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la actividad invertasa	134
Tabla 18. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el contenido de fenoles totales	138
Tabla 19. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el contenido de flavonoides totales.....	142
Tabla 20. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la actividad antioxidante	146
Tabla 21. Influencia de los materiales de envase en todas las condiciones de almacenamiento	150
Tabla 22. Contenido de HMF a 45 ± 1 °C	151
Tabla 23. Diferencias de color para muestras almacenadas a 45 ± 1 °C	154
Tabla 24. pH a 45 ± 1 °C	155
Tabla 25. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en vidrio.....	157
Tabla 26. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en cerámica	157
Tabla 27. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en PET	157
Tabla 28. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en PP	157
Tabla 29. Actividad diastasa a 45 ± 1 °C.....	159
Tabla 30. Actividad invertasa a 45 ± 1 °C.....	162
Tabla 31. Contenido de fenoles totales a 45 ± 1 °C.....	165
Tabla 32. Contenido de flavonoides totales a 45 ± 1 °C.....	166
Tabla 33. Actividad antioxidante a 45 ± 1 °C	167
Tabla 34. Contenido de HMF con iluminación.....	169
Tabla 35. Contenido del HMF sin iluminación	169
Tabla 36. Diferencias de color para muestras almacenadas con iluminación.....	170
Tabla 37. Diferencias de color para muestras almacenadas sin iluminación.....	170

Tabla 38. pH con iluminación	171
Tabla 39. pH sin iluminación	171
Tabla 40. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en vidrio	172
Tabla 41. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en cerámica	172
Tabla 42. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en PET	173
Tabla 43. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en PP	173
Tabla 44. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en vidrio	173
Tabla 45. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en cerámica.....	173
Tabla 46. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en PET	173
Tabla 47. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en PP	174
Tabla 48. Actividad diastasa con iluminación	175
Tabla 49. Actividad diastasa sin iluminación.....	175
Tabla 50. Actividad invertasa con iluminación.....	177
Tabla 51. Actividad invertasa sin iluminación	178
Tabla 52. Contenido de fenoles totales con iluminación	179
Tabla 53. Contenido de fenoles totales sin iluminación	180
Tabla 54. Contenido de flavonoides totales con iluminación	181
Tabla 55. Contenido de flavonoides totales sin iluminación	181
Tabla 56. Actividad antioxidante con iluminación	183
Tabla 57. Actividad antioxidante sin iluminación	183

FIGURAS

Figura 1. Efectos principales para el contenido de HMF con iluminación	123
Figura 2. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de HMF con iluminación	124
Figura 3. Claridad (L^*) en función de la cromaticidad (C^*) a 45 ± 1 °C	126
Figura 4. Claridad (L^*) en función del tono (h_{ab}^*) a 45 ± 1 °C.....	126
Figura 5. Efectos principales para la claridad (L^*) a 45 ± 1 °C.....	127
Figura 6. Interacción Envases*Tiempo para la claridad (L^*) a 45 ± 1 °C.....	127
Figura 7. Efectos principales para el pH a 45 ± 1 °C	128
Figura 8. Interacción Envases*Tiempo para el pH a 45 ± 1 °C	129
Figura 9. Efectos principales para la actividad diastasa a 45 ± 1 °C.....	132
Figura 10. Interacción Envases*Tiempo para la actividad diastasa a 45 ± 1 °C.....	132
Figura 11. Efectos principales para la actividad diastasa con iluminación	133
Figura 12. Interacción Envases*Tiempo para la actividad diastasa con iluminación ...	133
Figura 13. Efectos principales para la actividad diastasa sin iluminación.....	134
Figura 14. Efectos principales para la actividad invertasa a 45 ± 1 °C	135
Figura 15. Interacción Envases*Tiempo para la actividad invertasa a 45 ± 1 °C	135
Figura 16. Efectos principales para la actividad invertasa con iluminación.....	136
Figura 17. Interacción Envases*Tiempo para la actividad invertasa con iluminación..	137
Figura 18. Efectos principales para la actividad invertasa sin iluminación	137
Figura 19. Interacción Envases*Tiempo para la actividad invertasa sin iluminación ...	138
Figura 20. Efectos principales para el contenido de fenoles totales a 45 ± 1 °C	139
Figura 21. Interacción Envases*Tiempo para fenoles totales a 45 ± 1 °C.....	139
Figura 22. Efectos principales para el contenido de fenoles totales con iluminación..	140

Figura 23. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de fenoles totales con iluminación.....	141
Figura 24. Efectos principales para el contenido de fenoles totales sin iluminación...	141
Figura 25. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de fenoles totales sin iluminación.....	142
Figura 26. Efectos principales para los flavonoides totales a 45 ± 1 °C.....	143
Figura 27. Interacción Envases*Tiempo para los flavonoides totales a 45 ± 1 °C.....	143
Figura 28. Efectos principales para el contenido de flavonoides totales con iluminación	144
Figura 29. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de flavonoides totales con iluminación.....	145
Figura 30. Efectos principales para el contenido de flavonoides totales sin iluminación	145
Figura 31. Efectos principales para la actividad antioxidante a 45 ± 1 °C	147
Figura 32. Interacción Envases*Tiempo para actividad antioxidante a 45 ± 1 °C.....	147
Figura 33. Efectos principales para la actividad antioxidante con iluminación.....	148
Figura 34. Interacción Envases*Tiempo para actividad antioxidante con iluminación.....	148
Figura 35. Efectos principales para actividad antioxidante sin iluminación.....	149
Figura 36. Interacción Envases*Tiempo para actividad antioxidante sin iluminación.....	150
Figura 37. Evolución del contenido de HMF a 45 ± 1 °C.....	153
Figura 38. Diferencias de color (ΔE)* a 45 ± 1 °C.....	154
Figura 39. Evolución del pH a 45 ± 1 °C	156
Figura 40. Evolución de la acidez a 45 ± 1 °C.....	158
Figura 41. Evolución de la actividad diastasa a 45 ± 1 °C	160
Figura 42. Evolución de la actividad invertasa a 45 ± 1 °C.....	163
Figura 43. Relación entre la actividad invertasa y diastasa a 45 ± 1 °C.....	164
Figura 44. Evolución del contenido de fenoles totales a 45 ± 1 °C.....	166
Figura 45. Evolución del contenido de flavonoides totales a 45 ± 1 °C.....	167
Figura 46. Evolución de la actividad antioxidante a 45 ± 1 °C.....	168
Figura 47. Evolución del contenido de HMF con iluminación	169
Figura 48. Evolución del contenido de HMF sin iluminación.....	169
Figura 49. Evolución del pH con iluminación	172
Figura 50. Evolución del pH sin iluminación	172
Figura 51. Evolución de la acidez con iluminación	174
Figura 52. Evolución de la acidez sin iluminación.....	174
Figura 53. Evolución de la actividad diastasa con iluminación.....	176
Figura 54. Evolución de la actividad diastasa sin iluminación	177
Figura 55. Evolución de la actividad invertasa con iluminación	179
Figura 56. Evolución de la actividad invertasa sin iluminación	179
Figura 57. Evolución del contenido de fenoles totales con iluminación	180
Figura 58. Evolución del contenido de fenoles totales sin iluminación	180
Figura 59. Evolución del contenido de flavonoides totales con iluminación	182
Figura 60. Evolución del contenido de flavonoides totales sin iluminación.....	182
Figura 61. Evolución de la actividad antioxidante con iluminación	184
Figura 62. Evolución de la actividad antioxidante sin iluminación.....	185

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones medioambientales existentes en España unido a la capacidad pecoreadora de sus abejas y a las prácticas apícolas, hacen que la producción de miel sea una constante en la actividad agropecuaria, siendo un alimento representativo en la cultura gastronómica y en la dieta mediterránea.

La producción apícola se configura como uno de los mejores modelos de producción sostenible, en la que confluyen intereses económicos y sociales, al favorecer la fijación de la población en el medio rural en zonas donde el desempeño de otras actividades es complicado y al mejorar el medioambiente, ya que se trata de una producción totalmente respetuosa con su entorno a la vez que facilita la polinización (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

En España se producen una gran variedad de mieles muy apreciadas por sus caracteres organolépticos y propiedades nutricionales. La calidad de este alimento es una propiedad compleja en la que se aúnan criterios higiénicos, nutricionales, comerciales, sensoriales u organolépticos, de uso, psicosociales, de coste y ambientales.

Los apicultores comercializan la miel principalmente a granel, utilizando bidones metálicos que son destinados a empresas envasadoras. El consumidor adquiere este alimento expuesto en el comercio bajo condiciones de temperatura ambiente, en envases de diferentes materiales y formas de presentación, señalándose en su etiquetado la indicación de la fecha de duración mínima y las condiciones especiales de conservación y utilización.

La calidad de un alimento envasado, y de la miel en particular, puede verse afectada negativamente durante su almacenamiento por los siguientes factores: contaminación por riesgos biológicos, químicos o físicos; fuerzas mecánicas (daños por impacto, vibración, compresión o abrasión); adulteración de forma fraudulenta y manipulación inadecuada.

El material de envase, la luz y la temperatura son factores que inciden directamente sobre la calidad de un alimento envasado durante su almacenamiento.

El material de un envase alimentario proporciona una barrera entre el mismo y el exterior preservando con ello su calidad. Permite un control en la velocidad de transmisión de la luz y del calor, preserva al alimento de la humedad y de los gases y finalmente actúa como barrera frente a microorganismos e insectos. El envase no debe reaccionar con el alimento y debe permitir un manejo sencillo durante los procesos de llenado, sellado, transporte, almacenamiento, venta, y finalmente utilización por parte del consumidor.

La cantidad de luz absorbida o transmitida varía de acuerdo con el material de envase y con la longitud de onda de la luz incidente sobre el producto. Algunos materiales transmiten tanto la luz visible como la ultravioleta; aquellos envases donde se muestra el contenido deberán permitir el paso de la luz, pero aquellos alimentos susceptibles de alteración deben impedirla y para ello algunos envases incorporan en sus materiales pigmentos que impiden esta incidencia (Fellows, 2007).

La capacidad aislante de un envase depende de su conductividad térmica. Así, algunos materiales se aíslan del calor transmitido por conducción y los

materiales reflectantes del transmitido por radiación, siendo notorio que el control de la temperatura de almacenamiento es más importante que la capacidad del envase para proteger el alimento del calor (Fellows, 2007).

Los parámetros físico-químicos y biológicos que permiten evaluar la calidad de la miel envasada durante su almacenamiento son: hidroximetilfurfural, color, pH, acidez, actividad enzimática, fenoles, flavonoides y actividad antioxidante.

El hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que se forma a temperatura ambiente en las mieles a partir de la deshidratación de la fructosa en medio ácido (valor medio de pH 3,9). Este proceso se acelera por calentamiento o almacenamiento a elevadas temperaturas (White & Siciliano, 1980). Su presencia afecta a la calidad del producto ya que produce oscurecimiento por interrelaciones con compuestos aminados y azúcares, sufriendo polimerización tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

El oscurecimiento de la miel es un fenómeno que se halla relacionado con su composición y con la temperatura de almacenamiento. Los componentes que posiblemente influyen en los cambios de color son la relación glucosa fructosa, el contenido de nitrógeno, de aminoácidos libres y de humedad (Pereyra, Burin & Buera, 1999).

El pH es un parámetro importante a tener en cuenta durante el almacenamiento por su influencia sobre el desarrollo de microorganismos, la actividad enzimática, las propiedades físicas del producto como la textura y la estabilidad (Estupiñan, Sanjuan, Millan & González-Cortes, 1998a). Su origen radica en las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la maduración y

almacenamiento del producto, influyendo en las propiedades antibacterianas y antioxidantes del alimento.

Los principales enzimas presentes en la miel son: diastasa (α – amilasa), invertasa (α -glucosidasa) y la glucosa-oxidasa de naturaleza termolábil, observándose que un manejo inadecuado durante el almacenamiento puede degradarlas completamente (Crane, 1975). La evaluación de la actividad enzimática permite conocer el grado de frescura de una miel.

Otras sustancias bioactivas presentes son los compuestos fenólicos, flavonoides en particular, que participan en el flavor, color y textura. Actualmente despiertan interés por sus potenciales beneficios para la salud por ser destacada su actividad antioxidante (Blasa, Candiracci, Accorsi, Maria Piera Piacentini, Albertini & Piatti, 2006) y acción antimicrobiana (Fenema, 2000).

En la presente tesis doctoral nos hemos planteado realizar un estudio de evaluación de la calidad de la miel mediante la determinación de parámetros físico-químicos y biológicos, sometiendo muestras de miel a diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura, con y sin iluminación), envasadas en distintos materiales de envase: vidrio, cerámica, tereftalato de polietileno (PET) y polipropileno (PP) a diferentes intervalos de tiempo. El análisis estadístico realizado sobre los resultados obtenidos en el laboratorio, nos ha permitido obtener las conclusiones que se muestran en el presente estudio.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Con la presente tesis se persiguen los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar la influencia de las condiciones de almacenamiento y materiales de envase sobre la calidad físico-química y biológica de la miel utilizando un diseño experimental y estadístico.

Objetivos Específicos

Determinar los parámetros físico-químicos y biológicos que están relacionados con la calidad de una miel almacenada.

Diseñar un experimento que permita evaluar simultáneamente la influencia de los materiales de envase y las condiciones de almacenamiento (temperatura, con y sin iluminación) sobre los parámetros de calidad en la miel.

Analizar las muestras de miel en las diferentes etapas y condiciones de almacenamiento.

Realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos en el laboratorio.

Identificar los factores experimentales que influyen en las variaciones de los parámetros físico – químicos y biológicos estudiados durante el almacenamiento de la miel.

Revisión Bibliográfica

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. La miel como alimento

El Real Decreto 1049 de 2003 por el que se aprueba la norma relativa a la calidad de la miel, la define como *“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 es un alimento con importantes cualidades nutricionales, posee acción bactericida y puede utilizarse como agente terapéutico frente a infecciones y algunos desequilibrios nutricionales del organismo. Bajo el punto de vista de la seguridad alimentaria, es considerado un alimento seguro dada su baja actividad de agua, bajo pH y presencia de sustancias antimicrobianas (Fattori, 2004).

Se trata de un producto biológico que se modifica con el tiempo, cuya composición química varía, dentro de ciertos límites, en función de su origen floral, de factores edáficos y climáticos, del material libado, así como del procedimiento utilizado en su extracción y comercialización (Sáinz & Gómez, 2000). Sus propiedades biológicas le confieren atributos adicionales desde el punto de vista nutritivo, más allá de su uso como edulcorante natural dentro de la alimentación; bromatológicamente es una solución sobresaturada de azúcares con predominio de fructosa y glucosa y, en menor proporción, una mezcla de otros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos

orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, compuestos fenólicos, pigmentos, cera y granos de polen (Estupiñan, Sanjuan, Millan & González-Cortes, 1998b). Bajo el punto de vista normativo, existen unos parámetros físico-químicos de calidad relacionados con la madurez, la limpieza en el proceso y el deterioro.

3.2. Obtención de la miel

En el proceso de extracción de la miel es necesario tener un control detallado



de las medidas higiénicas de manejo para obtener un producto exento de impurezas así como de olores y de sabores extraños. Además hay que tener en cuenta que este alimento tiende a absorber la humedad, olores, polvo y otros materiales del ambiente con el que está en contacto, es por ello que los apicultores deben mantener buenas prácticas de manejo (Piana, Ricciardelli-D'albore & Isola,

1989).

El cumplimiento de Buenas Prácticas de Fabricación en todas y cada una de las etapas del proceso permite la obtención de un producto natural sano y de calidad. La obtención de la miel comprende las siguientes etapas: selección de los cuadros con miel adecuadamente operculada, desoperculado, extracción, filtración o depuración, maduración, envasado y almacenamiento. Algunas mieles pueden sufrir un proceso de pasteurización.

- **Selección de cuadros**

Al seleccionar los cuadros de las colmenas es importante evitar recoger miel no madura porque puede causar problemas de fermentación o separación de

fases. La elección de los panales para la cosecha se hará de acuerdo a la madurez de la miel, que deberá tener un porcentaje de humedad suficientemente bajo (inferior a 18,5 %) como para garantizar su conservación sin riesgo de fermentación (Gómez, 2004). Para ello se deben seleccionar aquellos cuadros que tengan más de 2/3 partes de su superficie perfectamente operculada.

- **Desoperculado**

Consiste en eliminar la capa de cera con la que las abejas han cubierto las celdas del panal una vez que la miel está madura. Puede hacerse manualmente o mediante el empleo de máquinas específicas.

- **Desoperculado manual:** las herramientas que se utilizan para esta operación son diferentes tipos de cuchillos, cardas o peines. El equipo se completa con un banco desoperculador de fondo inclinado, que sirve de apoyo al cuadro y recoge la cera junto con la miel que resultan del corte. Una vez posicionado el panal, se procede a cortar cuidadosamente la superficie del mismo con un cuchillo caliente, por ambas caras, tratando de obtener hojuelas de cera lo más finas posible. A continuación los cuadros desoperculados pueden pasar directamente al extractor (Salvachúa, Marchamalo & Robles, 2005).
- **Desoperculado mecánico:** en el mercado existen muchos modelos de maquinaria para realizar este trabajo clasificados en tres grupos: de corte, de percusión y de espirales. En las máquinas de corte los cuadros pasan frente a una cuchilla sometida a vibración y temperatura (hay problema de adaptación a la superficie del cuadro dada la heterogeneidad de los panales). Aunque pueden actuar por una sola cara o por ambas a la vez,

los diferentes diseños pueden actuar de manera horizontal o vertical, tratando siempre de eludir el obstáculo. Las máquinas de percusión están constituidas por uno o varios ejes verticales u horizontales donde se disponen series de cadenas, láminas o fibras elásticas que tienen la misión de remover los opérculos. Finalmente, las máquinas de espirales móviles están diseñadas para desopercular los cuadros sin tener que sacarlos de las alzas y disponen de molinetes de nylon con aspecto de cepillo para introducirse directamente en los cuadros.

Actualmente la mecanización aporta eficacia en la operación de desoperculado, sin embargo todavía los cuadros de las colmenas son de un material y estructura con alta probabilidad de presentar diferencias notables en sus medidas, peso y textura, por lo que la tecnología de desoperculado con máquinas no siempre responde satisfactoriamente a las expectativas que de ella se espera (Salvachúa et al., 2005).

- **Extracción**



Es la operación mediante la cual se desaloja la miel de los panales. En la actualidad esta tarea se realiza con la ayuda de equipos que se sirven de la fuerza centrífuga para la extracción. El extractor es un equipo de cuerpo cilíndrico en cuyo interior se aloja un bastidor, adaptado o no, al tipo de cuadros con que trabaja. Cuenta con uno o más grifos en la parte inferior para dar salida a la miel.

Al girar, la fuerza centrífuga expulsa la miel de las celdillas proporcionalmente a la velocidad de giro y al radio del aparato. Según la posición en la que se acomodan los cuadros existen extractores radiales o tangenciales. Los

extractores radiales disponen los cuadros a modo de radios con el cabecero en la posición más alejada del centro para aprovechar la inclinación natural de las celdillas. La fuerza centrífuga no es uniforme en toda la superficie, siendo mayor en la medida en que se aleja del eje del extractor, haciendo que la miel fluya por ambas caras a la vez. Este tipo de equipos tienen mayor capacidad a igual diámetro que otras máquinas semejantes de diseño tangencial. La posición radial de los panales disminuye la eficacia de la máquina, ya que la fuerza centrífuga que se genera al girar presenta una dirección perpendicular a las paredes de las celdillas.

En los extractores tangenciales, las caras de los cuadros presentan una posición perpendicular con respecto al eje de la jaula. La fuerza centrífuga afecta al lado exterior de los cuadros, por esta razón se somete a velocidad moderada y durante poco tiempo con el objeto que la miel del lado opuesto no reviente el panal (Salvachúa et al., 2005).

- **Filtración o depuración**

Según el método de desoperculado que se utilice, del extractor sale un producto que contiene en suspensión una cantidad muy variable de cera e impurezas: fragmentos de abejas, polen, burbujas de aire, restos de cera, madera y otros cuerpos extraños (Piana et al., 1989; Salvachúa et al., 2005).

La filtración o depuración es el proceso mediante el cual se libera la miel de todas las partículas extrañas que la acompañan. Mediante esta operación se hace pasar la miel a través de una lámina perforada, malla o material poroso quedando retenidas las partículas sólidas que contenía. El filtrado puede hacerse a presión y/o por gravedad.

Para que el proceso de filtración sea eficiente es necesario que la miel esté fluida. Si la viscosidad es muy alta deberá reducirse un poco por acción del calor, teniendo presente que cuanto mayor sea la superficie del filtro más rápido será el proceso. En los filtros con forma de embudo, la miel filtrada resbala por el plano inclinado de los bordes en vez de caer perpendicular, evitando de este modo la incorporación de burbujas al producto (Jean-Prost, 1981).

Cuando es necesario filtrar volúmenes importantes de miel se utiliza el filtrado a presión, donde la miel se hace pasar por un circuito, empujada por una bomba hasta que llega a un cartucho filtrante donde quedan retenidas las impurezas. Para trabajar en continuo se instalan dos o más tubos en paralelo, de manera que siempre haya uno activo mientras se procede a la limpieza del que se va obstruyendo.

- **Maduración**

Es el proceso físico llevado a cabo por un proceso simple de decantación, por el que dos o más sustancias no miscibles, al menos una de ellas líquida, se separan por diferencia de densidades. Las partículas de cera y las burbujas de aire tienen la tendencia a llegar rápidamente a la superficie. La rapidez del proceso de ascensión depende de las características físicas de estas cargas: peso, tamaño y forma, principalmente, así como viscosidad de la miel, temperatura de la sala de extracción y de la forma y altura de los recipientes en los que se almacena (Piana et al., 1989).

En los clásicos bidones en los que se almacena la miel puede producirse este proceso de forma espontánea, pero al ser contenedores muy estrechos o altos, la decantación puede interrumpirse por una pérdida de fluidez o por la

cristalización que puede iniciarse en el producto. En salas de extracción mecanizadas se utilizan bancos de decantación que tienen paredes atemperadas mediante resistencias eléctricas o sistemas análogos, que permiten que el proceso se haga en continuo solventando los problemas reseñados anteriormente (Salvachúa et al., 2005).

Los maduradores suelen ser recipientes de acero inoxidable o bien suelen estar estañados o cubiertos interiormente por una pintura alimentaria.



Durante su estancia en el madurador, la miel que es muy higroscópica no debe absorber la humedad del aire. El madurador estará tapado y la miel no permanecerá más del tiempo necesario para permitir su decantación (2 a 8 días en general) y en el caso de mieles muy viscosas (espliego) resulta indicado un calentamiento a 40 °C antes de una decantación de 48 horas en un madurador con calentador (Jean-

Prost, 1981). Hay que señalar que en la fase de maduración la miel pierde humedad y tienen lugar cambios físico-químicos y biológicos que afectan a su composición.

- **Almacenamiento y envasado**

La miel limpia y decantada se suele guardar en bidones de diferente capacidad, normalmente entre 35 y 300 kg, hasta el momento del envasado o venta a un envasador. Lo habitual son depósitos industriales de acero inoxidable o bidones recubiertos con pinturas alimentarias de resinas epoxi. También es importante disponer de un entorno apropiado, fresco, seco y con buenas condiciones higiénicas tanto del local como de las instalaciones (Gómez, 2004). Es importante tener especial cuidado con los materiales de

envasado, ya que deben tener calidad alimentaria. Posteriormente se hablara de los materiales de envase habitualmente utilizados para miel.

- **Pasteurización**

La pasteurización es un tratamiento térmico leve que permite controlar la cristalización, además destruye las levaduras presentes en el producto. Es importante mantener un control en las buenas prácticas de fabricación y evitar la contaminación posterior para evitar la fermentación en la miel. La temperatura de pasteurización recomendada (White, 1980) es de 62,8 °C durante 30 minutos. El calentamiento debe realizarse lo más rápidamente posible y una vez alcanzado el tiempo de proceso debe enfriarse inmediatamente. Disminuir la temperatura de la miel no es tarea fácil, el tiempo requerido para alcanzar la temperatura ambiente por sí sola sería demasiado largo y como consecuencia el daño irreparable en sus propiedades biológicas y nutricionales, por ello es necesario utilizar tecnología especialmente diseñada para realizar la pasteurización de miel, sin ocasionar mayores al producto (Crane, 1975).

3.3. Principales componentes de la miel

La composición química de la miel depende del origen floral, de factores edáficos y climáticos, de la raza de la abeja, del estado de la colonia y de los métodos de recolección (Sáinz et al., 2000). En la Tabla 1 se indican los valores promedio de composición química de una miel multifloral, según el Laboratorio de Nutrición del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, revisión 21 de 2008 (USDA, 2008).

Tabla 1. Composición química promedio de la miel

Nutriente	Unidad	Valor en 100 gramos
Agua	g	17,10
Energía	Kcal	304
Energía	Kj	1272
Proteína	g	0,30
Cenizas	g	0,20
Carbohidratos	g	82,40
Fibra	g	0.2
Azúcares	g	82,12
Sacarosa	g	0,89
Glucosa	g	35,75
Fructosa	g	40,94
Maltosa	g	1,44
Galactosa	g	3,10
Minerales		
Calcio	mg	6
Hierro	mg	0,42
Magnesio	mg	2
Fósforo	mg	4
Potasio	mg	52
Sodio	mg	4
Zinc	mg	0,22
Cobre	mg	0,036
Manganeso	mg	0,080
Flúor	µg	7,0
Selenio	µg	0,8
Vitaminas		
Vitamina C	mg	0,5
Riboflavina	mg	0,038
Niacina	mg	0,121
Vitamina B-6	mg	0,024
Aminoácidos		
Leucina	g	0,010
Fenilalanina	g	0,011
Acido Aspártico	g	0,027
Acido Glutámico	g	0.018
Prolina	g	0,090

3.3.1. Azúcares

La miel es un alimento complejo y rico en azúcares ya que constituyen más del 95% de la materia seca, y son los responsables de muchas de sus

propiedades y características como poder edulcorante, higroscopicidad, granulación y valor energético. Algunos azúcares proceden del néctar o del mielato y otros derivan de la acción de los enzimas segregados por las abejas. Con el envejecimiento el perfil de azúcares sufre modificaciones, en general los polisacáridos se incrementan y los monosacáridos disminuyen. Se cree que esta condensación de monosacáridos ocurre tanto por una acción enzimática como por la acción de ácidos debido al pH de la miel y el proceso podría conducir a azúcares que no se encuentran normalmente en la naturaleza (Crane, 1975; Juan, 1991; Ortiz, Fernández & Muñoz, 1996).

Monosacáridos: los azúcares reductores mayoritarios en la miel son fructosa y glucosa y representan aproximadamente el 90% de todos los presentes en la miel. La proporción entre ambos varía según el origen floral, pero la fructosa predomina prácticamente en todos los tipos de miel excepto en la miel de *Brassica napus* (nabo), *Taraxacum officinale* (diente de león) y *Trichostema lanceolatum* (vinagre de malezas). El contenido medio de fructosa en distintos tipos de miel está alrededor de 33,69% para mieles de sauce y de 36,85% para mieles de frutales (Cavia, 2002; Juan, Conchello, Tello, Pérez & Herrera, 1992).

La glucosa que sigue en importancia a la fructosa, está en mayor proporción en mieles de romero (30,48%), siendo las mieles de frutales las que tienen un menor contenido (29,08%) (Juan et al., 1992). A partir de estos azúcares simples, y principalmente la glucosa, se pueden formar azúcares superiores por complejos fenómenos de transglucosidación, bajo la acción de la secreción enzimática de las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Ortiz et al., 1996).

Actualmente, la legislación establece un contenido de fructosa y glucosa para mieles de flores no menos de 60 g / 100 g de miel y para las mieles de mielada y mezclas de miel no menos de 45 g / 100 g de miel (Real Decreto 1049/2003).

Disacáridos: la maltosa es el disacárido más abundante seguido por la sacarosa, azúcar cuyo valor está contemplado en la legislación como indicador de una buena maduración de la miel. También están presentes isomaltosa, maltulosa, turanosa, α y β trehalosa (principal carbohidrato de la linfa de algunos insectos), laminaribiosa, gentiobiosa y nigerosa (Fattori, 2004).

La sacarosa es un disacárido que cuando aparece en cantidades elevadas, evidencia la inmadurez de la miel o bien la adulteración de la misma con melazas. Las mieles de espliego, acacia y mielada presentan mayor contenido de este azúcar que otros tipos de miel (Juan et al., 1992). En la norma relativa a la calidad de la miel, en general el contenido de sacarosa no debe ser más de 5 g / 100 g de miel (Real Decreto 1049/2003).

La maltosa es el disacárido más importante con valores medios comprendidos entre 6,92% para mieles de milflores y 7,86% para las de frutales. La melibiosa, otro disacárido de interés, se presenta en un bajo porcentaje oscilando entre 0,45% para mieles de zadorija y 0,61% para las mieles de milflores (Juan et al., 1992).

Trisacáridos y polisacáridos: son grupos complejos de azúcares que se encuentran en proporciones muy pequeñas. En la miel se han identificado: erlosa y melezitosa (formadas por un mecanismo de transglucosidación entre

glucosa y sacarosa), rafinosa, 1-kestosa, 3-a-isomaltosiglucosa, maltotriosa, isomaltotriosa, panosa, isopanosa, 1-kestoda, teanderosa y ventosa. Un tetrasacárido: isomal-totetraosa, un pentasacárido: isomaltopentaosa y polisacáridos como dextrinas y pentosanos (Fattori, 2004).

La rafinosa se considera excelente caracterizador de las mieles de bosque, se destaca su presencia en mieles de pino. El contenido medio más bajo de este azúcar se detectó en mieles de frutales (0,07%), mientras que el más elevado corresponde a miel de romero (0,21%) (Juan et al., 1992).

La importancia del azúcar erlosa en mieles de romero es destacada en su caracterización. La medida más elevada se ha encontrado en mieles de zadorija (0,66%) y el más bajo porcentaje se ha encontrado en mieles de frutales (0,23%).

La melezitosa ha sido identificada en mieles de mielada en las que aparece en porcentajes importantes (Juan et al., 1992).

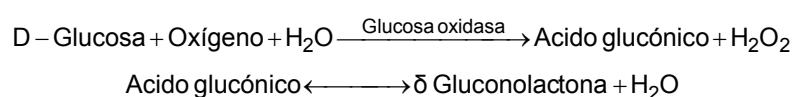
3.3.2. Agua

El contenido de agua de una miel está relacionado con factores como el clima, la humedad ambiental y edáfica, la flora, la zona geográfica y abundancia de la fuente de néctar, así como las prácticas apícolas utilizadas para su obtención y comercialización (Sáinz et al., 2000). Es un factor destacable ya que influye en el peso específico, en la viscosidad, en el sabor, y condiciona por ello su conservación, palatabilidad, solubilidad y valor comercial (Piana et al., 1989).

La legislación en España permite que el contenido hídrico de una miel madura sea hasta el 20%, con excepción de la miel de brezo "*Calluna*" y miel para uso industrial en general que puede alcanzar el 23% (Real Decreto 1049/2003). Si se superan estos valores, la miel es susceptible de fermentación y puede influir negativamente en la estabilidad provocando un proceso de separación de fases y afectando igualmente a su granulación.

3.3.3. Ácidos

Los ácidos contribuyen a la protección del producto frente a la acción microbiana e influyen en el sabor de la miel. El ácido predominante es el ácido glucónico que se forma por oxidación enzimática de la glucosa, hallándose en equilibrio dinámico con la δ -gluconolactona en base a la pérdida o ganancia de una molécula de agua. La cantidad relativa del ácido glucónico y de la δ -gluconolactona depende del pH de la miel que se halla regulado por cationes inorgánicos de acción buffer (Cavia, Fernández-Muiño, Alonso-Torre, Huidobro & Sancho, 2007; Tosi, Ortega & Martinet, 2000).



También se encuentran otros ácidos como: fórmico, acético, málico, cítrico, oxálico, tartárico, pirúvico y succínico. Se hallan como ácidos libres y también como lactonas constituyendo estas últimas una reserva de acidez para la miel, ya que pueden liberarse en caso de alcalinización (Sáinz et al., 2000). Se han hallado valores entre 17 y 290 mg/kg de ácido fórmico y de 11 a 119 mg/kg de ácido oxálico (Bogdanov, Charrière, Imdorf, Kilchenmann & Fluir, 2002). Se ha demostrado que el contenido de estos ácidos varía de acuerdo con el origen de la miel, los valores promedio observados en mieles de

mielada fueron de 22,7 a 46,8 mg/kg (Wehling, Vonder Ohe & Von der Ohe, 2003).

Además del ácido fórmico se han encontrado ácidos volátiles (butírico, valérico, cáprico, málico, láctico y fosfórico). La miel también contiene ácidos fenólicos entre los que se encuentran el caféico, cinámico y ferúlico, que le confieren propiedades antioxidantes (Fattori, 2004). Todos estos ácidos tienen en común la capacidad de disociarse en solución acuosa cediendo al medio iones de hidrógeno, cuya concentración se determina mediante la medida del pH y nos da información sobre la acidez de la miel. Los valores de pH oscilan entre 3,4 y 6,4 aproximadamente (Cavia, 2002).

3.3.4. Proteínas y aminoácidos

El contenido proteico de la miel (inferior al 1%) procede del néctar o del mielato, del polen y de las propias abejas. Incluye albúminas, globulinas, proteasas y también nucleoproteídos. Las proteínas influyen en la tensión superficial y son responsables de la capacidad de formación de espuma de ciertas mieles, como la miel de *Fagopyrum esculenta* (alforfón) (Cavia, 2002). En cuanto a los aminoácidos se han detectado: prolina, lisina, metionina, histidina, arginina, ácido aspártico, triptófano, serina, ácido glutámico, fenilalanina, valina, metionina, isoleucina, tirosina, tripsina, treonina, variando las cantidades en función del origen floral (Crane, 1975; Fattori, 2004). La prolina es el aminoácido libre más importante, procede del néctar o del mielato libado por la abeja. (Sáinz et al., 2000).

3.3.5. Minerales

Su contenido es bajo, del 0,1 al 0,2%, variando notablemente según el origen botánico, las condiciones edáfico-climáticas y las técnicas de extracción. El

elemento dominante es el potasio seguido por el cloro, azufre, sodio, calcio, fósforo, magnesio, manganeso, silicio, hierro y cobre (Crane, 1975; Fattori, 2004; USDA, 2008). El tipo de suelo sobre el que se asienta la planta así como su origen botánico, influyen sobre las proporciones minerales. Las mieles de mielato tienen mayor contenido de cenizas que las de origen floral (Piana et al., 1989; Sáinz et al., 2000).

3.3.6. Enzimas

Las abejas desarrollaron la capacidad de elaborar miel a partir del néctar y mielada de las plantas, mediante la acción de las enzimas que secretan las abejas (Crane, 1990). La presencia de enzimas es una característica que diferencia la miel de otros edulcorantes. Las enzimas son moléculas proteicas que hacen parte de la composición de la miel, son segregados por las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras y por los nectarios de las plantas, son de carácter termolábil y su actividad decrece con el paso del tiempo, por lo que su presencia es indicadora de calidad de la miel. Entre las principales cabe destacar la diastasa (α - amilasa), que es la encargada de hidrolizar el almidón y procede tanto de la abeja como del néctar. La invertasa (α - glucosidasa), que es la responsable de la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, y la glucosa-oxidasa, que actúa sobre la glucosa produciendo ácido glucónico, principal responsable de la acidez de la miel, son los principales. Catalasa, fosfatasa ácida y β -glucosidasa también están presentes y son las menos estudiadas (Huidobro, Santana, Sánchez, Sancho & Simal-Lozano, 1995; Sánchez, 1999; Sancho, Muniategui, Huidobro & Lozano, 1992; White & White, 1979 a).

Las concentraciones iniciales de enzimas son muy variadas, dependen principalmente del espectro polínico y disminuyen por pérdida de frescura,

ya sea de forma natural (envejecimiento) o por tratamientos térmicos provocados (calentamiento, pasteurización) que destruyen cualidades biológicas y nutricionales de la miel (White & White, 1975).

3.3.7. Pigmentos

Son los responsables del color de las mieles. Han podido separarse dos fracciones: hidrosoluble y liposoluble. En las mieles claras domina la fracción liposoluble y en las oscuras la hidrosoluble (Sáinz et al., 2000). En la fracción liposoluble se han aislado carotenoides, mientras que en la hidrosoluble aparecen compuestos polifenólicos cuya oxidación da lugar a compuestos responsables de los tonos oscuros (Sáinz et al., 2000).

El oscurecimiento de una miel almacenada durante cierto tiempo podría deberse a varios factores: a la presencia de tanatos, a compuestos procedentes de los materiales empleados en la conservación, a la reacción de azúcares reductores con sustancias que contienen nitrógeno (aminoácidos, polipéptidos y proteínas), y finalmente también intervendría la inestabilidad de la fructosa en solución ácida y posterior proceso de caramelización (reacción de Maillard en ambos casos) (Antony, Han, Rieck & Dawson, 2000). Por otro lado existen diferencias entre mieles claras y oscuras observándose en las primeras ausencia de tirosina y triptófano, que por el contrario aparecen en las segundas (Sáinz et al., 2000). También se han detectado flavonoides como rutina y quercetina en las oscuras (Juan, 2001; Tomás-Barberán, Ferreres, Ortiz & Fernández, 1994).

3.3.8. Compuestos carbonílicos, alcoholes y ésteres

Estos compuestos volátiles contribuyen al aroma y sabor de la miel (Crane, 1975; De la Fuente, Sanz, Martínez-Castro, Sanz & Ruiz-Matute, 2007; Sáinz et al., 2000; Sepúlveda, 1986), junto con los azúcares y ácidos, así como con los alcaloides procedentes de la planta originaria. Pueden ser herramienta de tipificación, así las mieles de azahar y lavanda contienen de forma destacada antranilato de metilo y las de brezo poseen pequeñas cantidades de diacetil alcanol. Dentro de los compuestos carbonílicos están: formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, isobutirialdehído, isovaleraldehído, metacroleína y acetona. Los alcoholes más importantes son: isopropanol, etanol, 2-butanol, n-propanol, 3-pentanol, isobutanol, alcohol bencílico y 2 – metil 1 – butanol. Y de los ésteres destacamos el metilformiato y el etilformiato (Sáinz et al., 2000).

3.3.9. Vitaminas

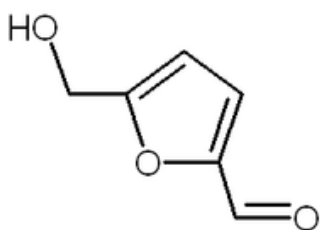
Las vitaminas de la miel proceden del néctar y del polen de la planta de origen pero a unos niveles tan bajos que infieren poco valor nutricional. En general las mieles contienen una cantidad apreciable de ácido ascórbico (vitamina C) y bajos porcentajes de vitamina del grupo B: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), ácido nicotínico, piridoxina (B₆), cianocobalamina (B₁₂) y ácido pantoténico (Crane, 1975; Horn, 1996; Piana et al., 1989).

3.3.10. Lípidos

Los lípidos presentes en la miel provienen principalmente de las plantas y de restos de cera, siendo su contenido muy bajo (aproximadamente 0,04%). El residuo graso de las mieles contiene glicéridos, esteroides y posiblemente fosfolípidos. Entre los ácidos grasos analizados por cromatografía gaseosa se

destacan: ácidos con menos de 12 carbonos, ácido laúrico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido pentadecanoico (15:0), ácido pentadecenoico (15:1), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linolénico (18:3), ácido n-decanodioico, ácido decanodioico monoetilénico en C₁₀). La determinación del perfil de ácidos grasos puede realizarse como un índice de genuinidad del producto, en especial la detección de los ácidos n-decanodioico y decanodioico monoetilénico en C₁₀, también se encontró éste último en jalea real (Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, 1978).

3.3.11. Hidroximetilfurfural (HMF)



El hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que se forma a temperatura ambiente en las mieles a partir de la deshidratación de la fructosa en medio ácido (valor medio de pH 3,9). Este proceso se acelera por calentamiento o almacenamiento a elevadas temperaturas (White et al., 1980). Su presencia produce oscurecimiento en la miel por interrelaciones con compuestos aminados y azúcares, sufriendo polimerización, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Cavia, Alvarez, Huidobro, Fernandez-Muino & Sancho, 2008; Fallico, Zappalà, Arena & Verzera, 2004; Horn & Hammes, 2002; Kahoun, Rezkova, Veskrnova, Kralovsky & Holcapek, 2008; Kalabova, Vorlova, Borkovcova, Smutna & Vecerek, 2003; Kaur Bath & Singh, 2001; Luz-Sanz, Dolores del Castillo, Corzo & Orlando, 2003; Sahinler, 2007; Thrasylvoulou, 1986; White, 1992).

3.3.12. Sustancias bioactivas con actividad biológica

Las propiedades bactericidas de la miel se conocían desde principios del siglo XX, la naturaleza química del compuesto responsable de esta propiedad se ignoraba e inicialmente se denominó “inhibina”. Con el tiempo se demostró que el efecto inhibitorio se debía a la presencia de agua oxigenada que queda libre durante la reacción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa (Tosi et al., 2000; White & Subers, 1963). Esta acción bactericida de las mieles no calentadas es tanto para bacterias gram positivas como para gram negativas y según algunos autores es independiente de la acidez natural, alto contenido de azúcares, enzimas u otros compuestos nitrogenados (Fattori, 2004). La miel no contiene sustancias antifúngicas específicas, pero previene el desarrollo de hongos por su alta concentración de azúcar (Sáinz et al., 2000).

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias de origen vegetal que también están presentes en la miel (Bogdanov, 1989), con un amplio espectro de actividades biológicas y funcionales. Tradicionalmente, los flavonoides son compuestos destacados dentro de los compuestos fenólicos que influyen en las cualidades organolépticas de la miel y han sido considerados como marcadores de su origen floral y geográfico (Fenema, 2000; Ferreres, Juan, Pérez-Arquillué, Herrera, García-Vigera & Tomás-Barberán, 1998; Juan, 2001) pero actualmente despiertan interés por sus potenciales beneficios para la salud en el caso de algunas patologías, por su actividad antioxidante (Blasa et al., 2006) y acción antimicrobiana (Ortiz et al., 1996; Tomás-Barberán et al., 1994).

En términos químicos, los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático hidroxilado (fenol, p-cresol y 3 etilfenol) y se clasifican en cuatro grupos: los ácidos fenólicos, los flavonoides, los taninos y las ligninas, que son

compuestos altamente polimerizados. Son productos resultantes del metabolismo secundario de las plantas y entre sus funciones en el mundo vegetal destacan: favorecer el transporte de electrones, tener un papel activo en los procesos de polinización y dispersión de semillas (influyen en el color de las flores y frutos), reproducción y crecimiento (cofactores de hormonas del crecimiento o como hormonas mismas) y participar en los mecanismos de defensa frente a fitopatógenos.

3.4. Propiedades físicas de la miel

3.4.1. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica es la propiedad de un cuerpo de permitir el paso de corriente eléctrica. Depende de la concentración de sales minerales, de ácidos orgánicos e iones inorgánicos, macromoléculas de proteínas, granos de polen, esporas y en algunos casos mohos, mostrando un valor con rango amplio según su origen floral. La conductividad es un dato útil para diferenciar mieles, observándose que las mieles florales tienen valores entre 0,1 y 0,7 mS/cm y las mieles de mielada muestran valores superiores a 1 mS/cm (Sáinz et al., 2000). En la legislación la conductividad eléctrica es considerada como un parámetro de calidad, siendo el valor exigido no más de 0,8 mS/cm para mieles en general y para la miel de mielada, miel de castaño y mezcla de estas mieles, la conductividad eléctrica debe ser no menos de 0,8 mS/cm. Sin embargo existen unas excepciones como lo son la miel de madroño, de eucalipto, tilo, brezo y árbol de té (Real Decreto 1049/2003).

3.4.2. Índice de refracción

El índice de refracción n se define como el cociente entre el seno del ángulo de incidencia ($\text{sen } i_1$) y el seno del ángulo de refracción ($\text{sen } i_2$) de la luz

monocromática al pasar del aire a un medio ópticamente más denso ($n = \frac{\sin i_1}{\sin i_2}$). La refractometría resulta adecuada para identificar y diferenciar alimentos como por ejemplo grasas y aceites, para comprobar la pureza de distintos alimentos, para la determinación cuantitativa del contenido de agua en el caso de la miel, o para determinar la concentración de azúcar (sacarosa) en alimentos (Matissek, Schnepel & Steiner, 1998). Se ha observado que el índice de refracción de la miel aumenta al incrementarse su contenido en sólidos (Sáinz et al., 2000). Cuando se hace la medida del contenido de humedad mediante métodos oficiales de análisis para miel, se utiliza el índice de refracción como un parámetro de cálculo. Éste varía entre 1,504 y 1,4815 (Orden de 12 de Junio de 1986, ; White, 1969).

3.4.3. Densidad

La densidad de una sustancia es la relación entre su masa y su unidad de volumen. En la miel puede medirse pesando un volumen conocido de muestra contenido en un picnómetro o utilizando un hidrómetro calibrado. Debe tenerse en cuenta que el valor de la densidad depende del contenido de agua de la muestra y de la temperatura a la cual se lleva a cabo la medición. La densidad de la miel a 20 °C varía entre 1,39 y 1,44 dependiendo del tipo de miel (Crane, 1975; Dadant, 1975; Sáinz et al., 2000; Sepúlveda, 1986).

3.4.4. Viscosidad

Es la propiedad de un fluido por la que tiende a oponerse a su flujo cuando se le aplica una fuerza. La viscosidad es una característica de todas las mieles, variable según el origen floral. En esta propiedad influye el porcentaje de agua y la relación fructosa / glucosa, teniendo en cuenta que a mayor

cantidad de fructosa las mieles son menos viscosas y a mayor cantidad de azúcares superiores mayor es la viscosidad. La viscosidad, único atributo de textura de los alimentos líquidos, es altamente dependiente de la temperatura y su valor disminuye al aumentar ésta (Fattori, 2004).

Algunas mieles se comportan como alimentos líquidos con flujos newtonianos, presentando valores de viscosidad hasta 110 poise, medidos a 20 °C. Existen otras mieles con alto contenido de dextranos, como por ejemplo la de eucaliptus, que se comporta como un alimento líquido con flujo no newtoniano y cuya viscosidad aumenta notablemente al ser agitada, hasta tal punto que puede llegar a presentar el fenómeno de filatancia. Esta miel también presenta el efecto Weissenberg, propio de los alimentos viscoelásticos, cuando son agitados se genera una fuerza hacia arriba que hace que el producto ascienda. Otras mieles presentan flujos pseudoplásticos y tixotrópicos, al ser agitadas su viscosidad disminuye para luego alcanzar su valor inicial. Este fenómeno se debe a ciertas proteínas cuya presencia depende del origen floral de la misma. La miel de brezo (*Calluna*) presenta este fenómeno (Fattori, 2004).

3.4.5. Higroscopicidad

Es un concepto que hace referencia a la capacidad de ciertas sustancias para retener y liberar agua en función de la humedad relativa del ambiente. La miel al ser una solución concentrada de azúcares posee la capacidad de absorber agua del ambiente. Por este motivo es importante que sea almacenada correctamente ya que, de acuerdo con su contenido inicial de agua, podrá absorber o perder ésta dependiendo de la humedad relativa ambiental de su almacenamiento (Fattori, 2004).

3.4.6. Cristalización

La cristalización de las mieles es un fenómeno físico complejo. La glucosa, que es un azúcar menos soluble que la fructosa, forma cristales primarios conformando una trama cristalina constituida por cristales enlazados entre sí. Si la cristalización sucede rápidamente, se formarán estructuras compactas formadas por cristales muy finos, mientras que si es lenta, se formarán estructuras no compactas, formadas por cristales gruesos (Fattori, 2004).

Según Cavia (2002), la velocidad de cristalización de una miel, depende de los siguientes factores:

- Cuando la relación glucosa/agua es de 1,7 o inferior, la miel cristaliza muy lentamente y si esta relación es de 2,1 o superior, la cristalización es rápida.
- Porcentaje de glucosa y relación fructosa/glucosa: si la concentración de glucosa es superior a 32-35%, la cristalización será rápida (miel de diente de león); si la relación fructosa/glucosa es superior a 2, la miel no cristaliza (miel de acacia, miel de nisa, miel de algodoncillo).
- La presencia de proteínas u otros coloides pueden actuar como núcleos de cristalización. Si éstos se eliminan por filtración es posible retardar el proceso (Fattori, 2004).
- Temperatura de almacenamiento: la temperatura óptima de cristalización es de 14 °C (intervalo óptimo: 12 - 16 °C), produciéndose la cristalización rápidamente. Por el contrario, a temperaturas por encima de 25 °C los cristales se redisuelven y si se halla por debajo de 10 °C la cristalización se retrasa aunque no se evita.
- Existen efectos catalíticos: la presencia de granos de polen, partículas en suspensión, cristales primarios de glucosa, burbujas de aire, etc., hacen que la cristalización se acelere. La técnica de depuración de la miel

mediante decantación, filtrado o centrifugado, es eficaz para eliminar las impurezas de la miel y con ello se frena la cristalización. También la pasteurización, al eliminar las levaduras y los núcleos de glucosa, inhibe la cristalización.

- Finalmente hay que considerar la combinación de varios factores: viscosidad - contenido de agua - temperatura. Una miel con alta viscosidad, bajo contenido de agua y baja temperatura de almacenamiento, presenta unas condiciones no idóneas para la proliferación de los cristales de glucosa, y con ello, la granulación.

3.4.7. Presión osmótica

Presión osmótica es la mínima presión necesaria para impedir el paso de las moléculas del disolvente puro hacia una disolución a través de una membrana semipermeable. Si una disolución se pone en contacto con su disolvente, o con una disolución más diluida, a través de una membrana semipermeable que sólo deje pasar las moléculas del disolvente, la homogeneización del sistema no se puede realizar y tiene lugar un flujo neto de disolvente hacia la disolución más concentrada. Este fenómeno se conoce como ósmosis directa y la presión mínima necesaria para detener el flujo de disolvente puro a través de la membrana semipermeable es la presión osmótica, Ω . La presión osmótica es una magnitud que depende fundamentalmente de la concentración molar de la disolución y, en menor extensión, de la temperatura, siendo independiente de la naturaleza del disolvente y del soluto, es decir, es una propiedad coligativa. Para un disolución de n moles en un volumen V a temperatura absoluta T , la presión osmótica Ω viene dada por la expresión:

$$\Omega = nRT/V$$

Donde, R es la constante de los gases. Las medidas de presión osmótica se emplean para hallar las masas moleculares relativas de los compuestos, especialmente macromoléculas.

La composición química y principalmente los hidratos de carbono, convierten a la miel en un alimento con alta presión osmótica. Esta propiedad conjuntamente con el pH ácido contribuye al poder antimicrobiano de la miel. La elevada osmolaridad del producto unido a la presencia de ácidos orgánicos e inhibina (factor antibiótico), hacen de la miel un medio desfavorable para el desarrollo microbiano y, como consecuencia, lo convierten en un alimento de alta conservabilidad (Fattori, 2004).

3.4.8. Rotación óptica específica

Es la propiedad óptica de desviar el plano de polarización de la luz. La presencia de hidratos de carbono en la miel le confiere a ésta la propiedad de desviar el plano de polarización de la luz. Dentro de los glúcidos, la fructosa es la que está en mayor proporción en la mayoría de las mieles, lo que convierte a este alimento en una solución de azúcares levógira (desvío del plano de polarización hacia la izquierda). Existen mieles que poseen naturalmente un contenido mayor de glucosa o bien que están adulteradas con cantidades elevadas de jarabe de glucosa, y como consecuencia desvían el plano de polarización de la luz hacia la derecha (dextrógiras). La medición de la rotación específica se realiza mediante un polarímetro y permite conocer el origen botánico de la miel, ya que las que son monoflorales presentan valores característicos de esta propiedad (Fattori, 2004).

La mayoría de las mieles son levóginas con excepción de la miel de mielada, presentando valores máximos de rotación, las mieles que presentan una

mayor relación fructosa / glucosa, como en el caso de la miel de falsa acacia o castaño. En un estudio sobre mieles españolas, la rotación específica de los azúcares más comunes a 20 °C fue la siguiente: sacarosa (+66,5), azúcar invertido (-20,0), glucosa (+52,7), fructosa (-92,7), maltosa (+138,4). La rotación específica para mieles españolas es: miel de romero (-2,25), miel de sauce (-1,26), miel milflores (-3,72), miel de zadorija (-1,11), miel de frutales (-5,74) (Juan et al., 1992).

3.5. Calidad de la miel

En un mercado cada vez más globalizado ante la competencia de productos apícolas con bajos costes procedentes de países emergentes, el arma más poderosa es la calidad. La propia Comisión Europea a través del LIBRO VERDE (COM, 2008) abrió a finales de 2008 un proceso de reflexión sobre cómo elaborar el marco político y regulador más adecuado para preservar y promover la calidad de los productos agrícolas sin crear costes adicionales.

Se trata de un concepto abstracto, con múltiples implicaciones y que ha sufrido un proceso de evolución en su contenido con el paso del tiempo. En el campo de la ciencia alimentaria, su significado es contemplado con ópticas heterogéneas según se trate de productores, industriales, consumidores o legisladores y viene determinada por la conjunción de distintos factores relacionados con la satisfacción de las expectativas de los consumidores. De este modo, en un alimento se destaca la calidad desde los siguientes puntos de vista: higiénico, nutricional, comercial, sensorial, de uso, psicosocial, de coste y ambiental (Pérez, 2002). A continuación pasamos a describir cada uno de estos aspectos referidos a la miel.

3.5.1. Calidad higiénica

La miel es un alimento seguro en términos de calidad higiénica, pero puede sufrir manipulaciones y tratamientos sanitarios inadecuados así como presencia de contaminantes ambientales que pueden influir negativamente sobre su calidad. El principal peligro biológico de la miel es la presencia de esporas de *C. botulinum*. La principal contaminación química está relacionada con la presencia de residuos de pesticidas, antibióticos, metales pesados, dioxinas, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y radionúclidos.

En relación a la contaminación biótica, la miel es un producto de origen animal que presenta una flora bacteriana propia representada por bacterias y hongos (mohos y levaduras) provenientes de las propias abejas y de su entorno, existiendo una posible contaminación proveniente del proceso de extracción y manipulación. Los microorganismos que se hallan mayoritariamente en la miel pertenecen al género *Bacillus*, generalmente en forma esporulada, si bien en mieles frescas se pueden encontrar formas vegetativas inertes, no alterantes y no toxigénicas. La presencia de levaduras puede tener un significado alterante ya que pueden producir fermentación cuando se hallan en la miel a niveles superiores a 100 levaduras / g unido a un contenido en humedad superior al 20% y temperatura de almacenamiento del producto en torno a 25 °C.

Para lograr un producto de buena calidad, que satisfaga las expectativas de los consumidores y que no genere ningún riesgo sanitario para los mismos, se estudian los puntos críticos del proceso de extracción, tratamiento y envasado de la miel y se toman las medidas necesarias para prevenir y asegurar la calidad del producto final.

El análisis de los puntos críticos en las diferentes etapas del proceso tecnológico, permite identificar sus principales riesgos asociados. Las fuentes de la contaminación más frecuentes en la miel provienen de una manipulación incorrecta, el uso de material no desinfectado, locales no apropiados y sucios, factores climáticos (viento, insolación, temperaturas elevadas) y ambientales (contaminación agrícola y/o industrial, agua y suelos contaminados, presencia de insectos y otras plagas, etc.).

Durante la extracción, almacenamiento y venta se deben evitar procesos no deseados como el de fermentación que conlleva la pérdida de la calidad del producto y lo hace no apto para el consumo humano. Además es importante tener control sobre las condiciones de almacenamiento y los tratamientos térmicos utilizados en estos procesos, ya que la temperatura (pasterización y almacenamiento) es un factor que afecta negativamente al producto al incrementar el contenido de HMF y modificar las propiedades físicas, organolépticas, actividad enzimática y propiedades antibióticas del alimento (Pérez, 2002).

3.5.2. Calidad nutricional

La calidad nutricional está determinada por la composición en macro y micronutrientes y la podemos definir como la mayor o menor capacidad que tiene un alimento de satisfacer las necesidades nutricionales del consumidor.

Debido a sus componentes, la miel está clasificada en el grupo de los alimentos hidrocarbonados por ser los azúcares sus componentes mayoritarios, tal como se ha señalado en la composición y es considerada un alimento energético por excelencia.

Además de los azúcares, contiene minerales como el potasio (especialmente las oscuras, provenientes de bosques) y el fósforo, este último elemento importante para la metabolización de los hidratos de carbono; oligoelementos, como aluminio, cadmio, silicio, boro, titanio, plomo, níquel, zinc, litio, estaño, cromo y radio; pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B, vitamina C y ácido pantoténico; enzimas, tanto vegetales como animales (provenientes del polen de las flores y de las mismas abejas), que son las encargadas de transformar los azúcares y facilitar que el organismo los asimile fácilmente sin causar problemas digestivos; inhibinas que aportan su acción antibiótica y la acetilcolina que favorece la irrigación sanguínea (Anónimo, 2007).

También es de interés el poder antioxidante de la miel ya que contiene una gran variedad de flavonoides y compuestos fenólicos que actúan frente a radicales libres. Generalmente, las mieles oscuras tienen mayor actividad antioxidante que las mieles claras (The National Honey Board, 2002).

3.5.3. Calidad comercial

La calidad comercial se basa en que la información aportada por el etiquetado (sellos, precintos, marcas, etiquetado del envasado y embalaje) sea correcta y se cumpla así mismo la normativa legal existente (Requisitos comunitarios de producción, Normas de Comercialización, Denominaciones de Calidad Específicas Comunitarias) evitando la existencia de falsificaciones y fraudes, es decir, se alcance la autenticidad del producto (Pérez, 2002). Los productores deben ajustarse a una serie de condiciones de producción y obtener los alimentos con arreglo a esas normas cuyo objetivo es asegurar que los alimentos puestos a la venta cumplen los requisitos de higiene y

seguridad y que los procesos de fabricación correspondientes satisfacen las exigencias medioambientales, éticas, sociales, etc., de la sociedad.

3.5.4. Calidad sensorial u organoléptica

Es la calidad más subjetiva de las referenciadas hasta el momento. Alude fundamentalmente a las sensaciones que experimenta el consumidor al observar (sensaciones visuales: color, brillo, forma, defectos, alteraciones, tamaño), tocar (sensaciones táctiles: dureza, textura, granulosidad, etc.), oler (sensaciones olfativas: aroma, presencia de olores anómalas) y consumir (sensaciones gustativas: dulzor, acidez, amargor, textura, sabor) cualquier alimento.

La calidad sensorial determina la decisión de consumo de un alimento, define la decisión de volver a comprarlo y establece una diferenciación entre marcas, por lo que tiene que ser muy tenida en cuenta por los productores y envasadores.

El alimento debe responder a unos caracteres sensoriales mínimos sui géneris que lo define y diferencia según lo establecido en las Normas de Calidad, en las Denominaciones de Origen, en las Indicaciones Geográficas Protegidas en las Marcas de Calidad y en otros documentos normativos. Sin embargo a partir de esos niveles mínimos se establece una graduación sensorial que distingue unas marcas de otras y cuyo éxito radicará en satisfacer al mayor número posible de clientes o consumidores.

3.5.5. Calidad de uso o servicio

Depende de la comodidad de empleo o preparación y de la vida útil del producto o de la aptitud para la conservación. En el caso de la miel, un ejemplo de calidad de uso lo aportaría el envase antigoteo que permite una mejor dosificación, o la miel cremosa que en un estado semilíquido es más untuosa y aporta una facilidad de uso.

3.5.6. Calidad determinada por componentes psicosociales

Se refiere a la valoración del alimento por parte de las personas, a partir de la interiorización individual del conjunto de características, hábitos y costumbres que forman su cultura alimentaria y determina su propia apreciación. Es decir, existe una interacción entre cada individuo y las determinantes sociales, que finalmente, se manifiestan en la valoración de cada alimento en el contexto general del modelo de consumo. De esa manera se establecen categorías y prioridades.

3.5.7. Calidad de coste

Un elevado coste del producto determina en muchas ocasiones su rechazo. Por otra parte se tiene muy en cuenta una buena relación precio/calidad, que determina la decisión de compra y aceptación por parte del consumidor.

3.5.8. Calidad ambiental

En los países desarrollados y a partir de la segunda mitad del siglo XIX, el uso en gran escala de nuevas tecnologías ha determinado un gran impacto ambiental. Ello se ha debido en gran medida a las altas tasas de extracción y procesamiento de recursos naturales, acompañados de un elevado nivel de

residuos sin reciclar y el desarrollo de materiales sintéticos de difícil asimilación por el ambiente.

El sistema de producción de alimentos es uno de los pilares en los que se apoya la estructura evolutiva de la humanidad, pero hay que tener presente que el desarrollo vertiginoso sufrido en el último siglo ha hecho cambiar radicalmente toda la estructura productiva en detrimento de las generaciones futuras. Hay que recurrir a mejores métodos para aprovechar al máximo los recursos naturales buscando la forma de evitar su depredación y degradación, siendo necesario implementar la optimización de los procesos productivos por parte de la industria. Corresponde al sector consumidor una eficiente utilización de los productos y servicios haciendo posible una minimización de los residuos y aprovechar al máximo su reciclado.

En el ámbito apícola cuando instalamos colmenas se deberá estudiar el lugar, preferentemente distante de industrias con emisiones que puedan contaminar tanto la vegetación como a las mismas abejas. Es importante evaluar el impacto del sistema agrícola para el trabajo del colmenar, tanto los sistemas convencionales, de producción integrada o agricultura ecológica. Estos factores tendrán que ser considerados por el apicultor en su implementación y así evaluar los efectos en la producción de miel. Por otra parte, la propia actividad apícola deberá ser respetuosa con el medio ambiente evitando malas actuaciones como tirar al medio ambiente productos sanitarios ya utilizados, realizar procesos de combustión con material inadecuado, eliminar de forma no conveniente colmenas enfermas, entre otras actuaciones no adecuadas.

3.6. Aspectos legislativos y disposiciones de calidad para las denominaciones de origen e indicaciones geográficas protegidas de miel en España

Hoy en día existe una tendencia creciente a comercializar productos agroalimentarios amparados por sistemas de protección de calidad. La potenciación de los productos autóctonos cobra un elevado interés, puesto que una zona geográfica determinada puede llegar a satisfacer el mercado y ser competitiva en circunstancias tales como diferenciación, calidad y territorio. Cada día, los requisitos que deben cumplir los alimentos son más estrictos, aunque ciertos principios de calidad dependan de los gustos y exigencias del consumidor. Para la apicultura, estos sistemas conforman un reconocimiento de calidad que manifiesta las características propias y diferenciales de sus productos, estando determinadas por el medio geográfico, las materias primas y los sistemas de producción utilizados.

El sector apícola, y en particular las explotaciones apícolas que buscan una diferenciación de calidad deben acogerse a los requisitos exigidos por el Reglamento (CE) nº 510/2006 sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios (Reglamento (CE) nº 510/2006 de 20 de marzo de 2006). En este sector, las denominaciones de origen y las indicaciones geográficas van dirigidas a los productores que están instalados en una localidad fija o a apicultores que practican una trashumancia restringida en una región determinada (López, 2005).

3.6.1. Norma de calidad relativa a la miel

La Unión Europea publicó en el año 2001 la Directiva 2001/100/CE, que fue transpuesta al ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto 1049/2003, por el cual se aprueba la norma relativa a la calidad de la miel. Esta norma supone el nuevo marco normativo comunitario en esta materia, dentro del proceso de simplificación y adaptación de las disposiciones comunitarias de carácter general aplicables a los productos alimenticios, especialmente las relativas al etiquetado, la higiene, los contaminantes y los métodos de análisis. Tiene por objeto definir lo que se entiende por miel y fijar condiciones y características que debe cumplir dicho producto para su presentación, comercialización y consumo en el mercado interior. La Tabla 2 muestra los requisitos físico-químicos de la miel presentes en la legislación actual.

Tabla 2. Características físico-químicas de la miel – Real Decreto 1049/2003

Contenido de fructosa y glucosa (Suma de ambas)	
Miel de flores	No menos de 60 g/100g
Miel de mielada, mezclas de miel de mielada con miel de flores	No menos de 45 g/100g
Contenido de sacarosa	
En general	No más de 5 g/100g
Falsa acacia " <i>Robinia pseudoacacia</i> ", Alfalfa " <i>Medicago sativa</i> ", Banksia de Menzies " <i>Banksia menziesii</i> ", Sullá " <i>Hedysarum</i> ", Eucalipto rojo " <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ", <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , <i>Citrus</i> spp	No más de 10 g/100g
Espliego " <i>Lavandula spp</i> ", borraja " <i>Borago officinalis</i> "	No más de 15 g/100g
Contenido de agua	
En general	No más del 20 %
Miel de brezo " <i>Calluna</i> " y miel para uso industrial en general	No más del 23 %
Miel de brezo " <i>Calluna vulgaris</i> " para uso industrial	No más del 25 %
Contenido de sólidos insolubles en agua	
En general	No más del 0,1 g / 100g
Miel prensada	No más de 0,5 g / 100g
Conductividad eléctrica	
Miel no incluida en la enumeración de los dos párrafos más abajo indicados, y mezclas de estas mieles.	No más de 0,8 mS/cm

Miel de mielada y miel de castaño, y mezclas de éstas, excepto con las mieles que se enumeran a continuación Excepciones: Madroño " <i>Arbutus unedo</i> ", Argaña " <i>Erica</i> ", Eucalipto, Tilo " <i>Tilia spp</i> ", brezo " <i>Calluna vulgaris</i> ", Manuka o Jelly bush " <i>Leptospermum</i> ", Árbol de té " <i>Melaleuca spp</i> "	No menos de 0,8 mS/cm
Ácidos libres	
En general	No más de 50 miliequivalentes de ácidos por 1000 g
Miel para uso industrial	No más de 80 miliequivalentes de ácidos por 1000 g
Índice Diastásico (Unidades Schade)	
En general, excepto miel para uso industrial	No menos de 8
Mieles con bajo contenido natural de enzimas (por ejemplo mieles de cítricos) y contenido de HMF no superior a 15 mg/kg	No menos de 3
HMF	
En general, excepto miel para uso industrial	No más de 40 mg/kg
Miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles.	No más de 80 mg/kg

Esta normativa define la miel de uso industrial como la miel apropiada para usos industriales o uso como ingrediente de otros productos alimenticios que se elaboran ulteriormente, que puede presentar un sabor o un olor extraños, haber comenzado a fermentar o haber fermentado y haberse sobrecalentado.

Este Real Decreto ha modificado el valor de algunos parámetros de calidad, entre ellos, el hidroximetilfurfural (HMF) que indica grado de frescura y/o de sobrecalentamiento de la miel, ahora contemplando valores de hasta 80 mg/kg para mieles procedentes de regiones de clima tropical y mezcla de mieles.

Otro aspecto de interés incluido en este Real Decreto son las normas para el etiquetado de la miel que hacen énfasis en el origen floral o vegetal del producto, el origen territorial y los criterios de calidad específicos,

parámetros obligatorios que informan al consumidor y le permiten tener claridad en el momento de la decisión de compra.

España cuenta con tres denominaciones sobre calidad de miel: dos Denominaciones de Origen Protegidas y una Indicación Geográfica Protegida. Por otra parte existen las marcas de calidad otorgadas por las Comunidades Autónomas, entre las que se encuentran Aragón, Asturias, Cantabria, Cataluña, Extremadura, Madrid, Murcia, País Vasco y Valencia.

La Comisión Europea tiene registradas 16 mieles comunitarias con el distintivo de **Denominaciones de Origen Protegidas**. 2 Españolas (Miel de Granada, Miel de La Alcarria, 2 Francesas (Miel de Corse, Miel de sapin des Vosges), 1 Griega (Meli Elatis Menalou Vanilia), 1 Italiana (Miele della Lunigiana), 1 de Luxemburgo (Miel - Marque nationale du Grand-Duché) y 9 de Portugal (Mel da Serra da Lousã, Mel do Parque de Montezinho, Mel do Ribatejo Norte, Mel das Terras Altas do Minho, Mel da Terra Quente, Mel da Serra de Monchique, Mel do Alentejo, Mel dos Açores, Mel de Barroso). Con el distintivo de **Indicación Geográfica Protegida** se encuentran registradas 1 Española (Miel de Galicia) y 2 Francesas (Miel d'Alsace, Miel de Provence) (Portal de Europa, 2008).

3.6.2. Denominaciones de Origen Protegidas de Miel

3.6.2.1. Miel de La Alcarria



La miel de La Alcarria está protegida con Denominación de Origen desde el 11 de noviembre de 1992 (Orden de 11 de Noviembre de 1992 y Orden de 21 de septiembre de 1993) y registrada de conformidad con el Reglamento

de la Comunidad Europea desde el 12 de junio de 1996 (Reglamento (CE) n° 1107/96 de la Comisión de 12 de junio de 1996).

La Alcarria tiene una extensión de 4245 Km² que se extiende entre los macizos secundarios de la Meseta de Sigüenza y la serranía conquense al norte; Sierra de Altomira al este; los ríos Tajo y Guadiela al sur y la campiña del Henares al oeste. Atendiendo a su origen floral la Miel de La Alcarria se clasifica en tres tipos: miel monofloral de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Miel monofloral de espliego (*Lavandula latifolia medicus*) y miel multifloral.

- **Características**

- **Organolépticas:** el aroma y color varían, pero derivan de su origen botánico. La consistencia puede ser fluida, viscosa o hallarse parcial a enteramente cristalizada.
- **Físico-químicas:** las características fisicoquímicas de la miel de La Alcarria se observan en la Tabla 3. Los valores de la colorimetría en esta normativa es según método CIELAB.

Tabla 3. Condiciones y características de la DO Miel de La Alcarria

Característica	Observaciones
Humedad	Menos del 17.5%
Hidroximetilfurfural	Menos de 10 mg/kg
Acidez	Menos de 35 meq/kg
Conductividad eléctrica	Menos de $4,5 \times 10^5 \text{ S cm}^{-1} \times 10^4$
Colorimetría	L ₁₀ más de 65, a ₁₀ más de -2 y menos de 15 h _{ab} * más de 80

- **Melisopalinológicas:** las plantas originarias de la miel de La Alcarria son las pertenecientes a la familia de las labiadas, especialmente el romero, el espliego y el tomillo (Tabla 4). Como puede observarse, para todas las mieles hay restricciones en cuanto a la presencia en el

espectro de taxones pertenecientes a la familia *Ericaceae*, *Cistaceae*, *Lavandula stoechas* L. y plantas de cultivo.

Tabla 4. Tipos y características melisopolinológicas de la DO Miel de La Alcarria

Tipo de Miel	Características
Mieles monoflorales	El porcentaje mínimo de polen de la miel de romero o espliego será del 15%
Mieles multiflorales	El porcentaje mínimo de al menos una de las formas de polen de tomillo (<i>Tymus</i> sp), romero, espliego, será del 5%
Todas las mieles	<ul style="list-style-type: none"> • El porcentaje de formas de polen de la familia ericáceas (<i>Ericaceae</i>) exceptuando gayuba (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>, L. Sprengel) será 0% • El porcentaje de polen de las plantas de cultivo presentes en la zona de producción, será menor del 10%. • El porcentaje de polen de jara (<i>Cistus ladanifer</i> L.) y cantueso (<i>Lavandula stoechas</i> L.) será menos del 3%.

3.6.2.2. Miel de Granada



Esta provincia española cuenta con Denominación de Origen Protegida desde 2003 y el Reglamento de la Denominación de Origen de Miel de Granada fue aprobado en la Orden 5 de Octubre de 2002, BOJA 129 (Orden de 5 de octubre de 2002) y BOE 301 de 17 de Diciembre de 2002 (Orden APA 3209/2002). En el Reglamento (CE) nº 886/2005 se encuentra el registro de la Denominación de Origen Protegida en la Unión Europea (Reglamento (CE) nº 886/2005 de la Comisión de 10 de junio de 2005).

La zona de producción protegida abarca todos los municipios de la provincia de Granada, aunque la mayoría de los apicultores y de colmenas se concentra en Huéscar, Granada, Motril, Lanjarón y Otívar.

Los tipos de miel de la Denominación de Origen Protegida de Miel de Granada son: miel monofloral de castaño (*Castanea sativa* Miller), miel monofloral de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), miel monofloral de tomillo (*Thymus* sp.), miel monofloral de aguacate (*Persea americana* Mill.), miel monofloral de naranjo o azahar (*Citrus* sp.), miel monofloral de cantueso (*Lavandula stoechas* L.), miel de la sierra y miel multifloral.

- **Características**

Todas las mieles deberán tener como máximo un 17,5% de humedad, un contenido de HMF no superior a 10 mg/kg y *Erica* spp deberá tener un valor inferior al 1% en el espectro polínico.

- **Organolépticas:** Las mieles deberán presentar cualidades organolépticas propias del origen floral correspondiente, especialmente en cuanto a aroma y sabor.
- **Físico-químicas:** las características fisicoquímicas particulares para cada tipo de miel de la Denominación de Origen Protegida se muestran en la Tabla 5, donde puede observarse la inclusión en esta normativa del enzima α – glucosidasa como indicador del grado de frescura de una miel. Además del color medido en escala Pfund, también se contempla la conductividad eléctrica, parámetro físico diferencial entre mieles claras y oscuras.

Tabla 5. Características físico-químicas de la DO “Miel de Granada”

Característica	Castaño	Romero	Tomillo	Aguacate	Azahar	Cantueso	Sierra	Miel MF*
α – glucosidasa (US)	> 100	> 40	> 100	> 100	> 30	> 50	-	-
Conductividad (S/cm ⁻¹)	> 8	< 2,5	> 3	> 8	< 3	< 5	-	-
Color (Pfund)	> 80	< 35	> 55	> 100	< 30	> 50	-	-

MF*: Miel multifloral

- **Melisopalinológicas:** las características melisopalinológicas de las mieles con Denominación de Origen Protegida “Miel de Granada” aparecen en la Tabla 6. La miel de sierra viene tipificada por la presencia de polen de castaño en un porcentaje superior al 75%, mientras que para la miel multifloral es el polen de la familia *Lamiaceae* el que debe estar presente superando el 5% su presencia en el espectro.

Tabla 6. Características melisopalinológicas de la DO “Miel de Granada”

Miel	Características melisopalinológicas
Castaño	El polen de « <i>Castanea sativa</i> » superará el 75 por 100 del espectro polínico y el polen del género « <i>Erica</i> sp.» será del 0 por 100.
Romero	El polen de « <i>Rosmarinus officinalis</i> » superará el 15 por 100 del espectro polínico o bien superará el 10 por 100 siempre y cuando venga acompañado de un 5 por 100 de formas polínicas de la familia « <i>Lamiaceae</i> ».
Tomillo	El polen de « <i>Thymus</i> sp.» superará el 15 por 100 del espectro polínico.
Aguacate	El polen de « <i>Persea americana</i> » superará el 25 por 100 del espectro polínico.
Azahar	El polen de « <i>Citrus</i> sp.» superará el 15 por 100 del espectro polínico.
Cantueso	El polen de « <i>Lavandula stoechas</i> » superará el 15 por 100 del espectro polínico.

3.6.3. Indicación Geográfica Protegida de Miel

3.6.3.1. Miel de Galicia



La Indicación Geográfica Protegida (IGP) de Miel de Galicia fue reconocida en la Orden de 1 de Octubre de 1997 (Orden de 1 de octubre de 1997) y su Reglamento fue aprobado por la Orden de 19 de febrero de 2003 (Orden de 19 de febrero de 2003) y última modificación está en la Orden de 10 de febrero de 2004 (Orden de 10 de febrero de 2004), también publicado

en Orden APA/2186/2004, de 18 de junio, por la que se ratifica el Reglamento de la Indicación Geográfica Protegida «Miel de Galicia» y de su Consejo Regulador.(Orden APA/2186/2004). La publicación de registro de la Indicación Geográfica Protegida se realizó en julio de 2007 (Reglamento (CE) n° 868/2007 de la Comisión de 23 de julio de 2007).

La zona de producción, procesado y envasado de las mieles amparadas por la Indicación Geográfica Protegida Miel de Galicia abarca todo el territorio de la Comunidad Autónoma de Galicia (Pérez, 2005). La gran mayoría de la miel de esta IGP es de milflores, en la que no predomina un taxón concreto, pero también se producen mieles monoflorales de eucalipto, castaño, zarzamora y brezo.

- **Características**

- **Organolépticas:** las mieles deberán presentar, con carácter general, las cualidades sensoriales propias del origen floral correspondiente en cuanto a color, aroma y sabor (Tabla 7).

Tabla 7. Características organolépticas de la IGP “Miel de Galicia”

Tipo de Miel	Características Organolépticas
Miel multifloral	Su color podrá variar entre el ámbar y el ámbar oscuro. El sabor y el aroma serán acordes a la flora predominante en la miel.
Monoflorales de eucalipto	Color ámbar, sabor suave y aromas céreos.
Monoflorales de castaño	Miel oscura, de sabor intenso y fuertes aromas a flor.
Monoflorales de zarzamora	Color ámbar oscuro, sabor fuerte afrutado, marcadamente dulce y aromas frutales.
Monoflorales de brezo	Su color es ámbar oscuro u oscuro con tonos rojizos, sabor ligeramente amargo y persistente, aromas florales persistentes.

- **Físico-químicas:** la Indicación Geográfica Protegida “Miel de Galicia” señala como características fisicoquímicas para sus mieles, un

- contenido en humedad inferior al 18,5%, la actividad diastásica superior a 9 °Gothe y contenido en HMF inferior a 18 mg/kg de miel.
- **Melisopalinológicas:** el espectro polínico considerado en su totalidad deberá corresponder al propio de las mieles de Galicia. En cualquier caso la combinación polínica *Helianthus annuus* - *Olea europaea* - *Cistus ladanifer* no superará el 5% del espectro polínico total. Además, según el origen floral de los distintos tipos de mieles citados, los espectros polínicos deberán cumplir los requisitos que aparecen en la Tabla 8. La miel multifloral queda descrita con los principales taxones de interés.

Tabla 8. Características melisopalinológicas de la IGP “Miel de Galicia”

Tipo de Miel	Características Organolépticas
Miel multifloral	El polen mayoritariamente pertenecerá a: <i>Castanea sativa</i> , <i>Eucalyptus</i> sp., <i>Ericaceae</i> , <i>Rubus</i> sp., <i>Rosaceae</i> , <i>Cytisus</i> sp- <i>Ulex</i> sp., <i>Trifolium</i> sp., <i>Lotus</i> sp., <i>Campanula</i> sp, <i>Centaurea</i> sp, <i>Quercus</i> sp., <i>Echium</i> sp., <i>Taraxacum</i> sp. y <i>Brassica</i> sp.
Monofloral de eucalipto	El porcentaje mínimo de polen de eucalipto (<i>Eucalyptus</i> sp.) será del 70%.
Monofloral de castaño	El porcentaje mínimo de polen de castaño (<i>Castanea</i> sp.) será del 70%.
Monofloral de zarzamora	El porcentaje mínimo de polen de zarzamora (<i>Rubus</i> sp.) será del 45%.
Monofloral de brezo	El porcentaje mínimo de polen de brezo (<i>Erica</i> sp.) será del 45%.

3.7. Sector apícola y producción de miel en España

Las características físicas, climáticas y edafológicas de España y las buenas condiciones pecoreadoras, permiten que la producción y el consumo de miel sean una constante en la actividad agraria y en la importante cultura gastronómica del país.

La evolución de los sistemas de producción durante los últimas décadas ha sido espectacular, pasando de sistemas estantes que suponían un complemento a las actividades agrícolas o ganaderas tradicionales y cuyo consumo iba destinado fundamentalmente al hogar, hasta los últimos años donde la profesionalidad es cada vez más alta en el sector y los sistemas de producción estantes han ido paulatinamente variando hacia los trashumantes. Sin embargo ambos sistemas siguen presentes en el país, destacando la producción clásica, de tipo estante en el Norte mientras que la trashumante se extiende por el resto de la geografía nacional (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

Aunque todavía se conservan prácticas ancestrales de obtención de la miel, el sector ha sufrido una constante evolución y ha incorporado nuevas tecnologías que nos sitúan a la cabeza de la innovación y con un nivel superior al de los principales productores a nivel mundial.

A pesar de este desarrollo, la aportación económica de la apicultura en el total de la producción ganadera es inferior a la contribución de otros sectores. Indicadores como los precios, el número de colmenas y producciones, permiten valorar el conjunto de la actividad apícola (sobre todo miel, polen y cera aunque se está experimentando un importante auge de otros productos) en 61,52 millones de euros. Así pues, el valor de facturación del sector apícola, alcanzaría en su conjunto el 0,44% sobre la Producción Final Ganadera y el 0,17% de la Producción Final Agraria (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

Si la importancia económica de la producción apícola es destacada, no se puede olvidar el papel ejercido por las abejas en el medio ambiente, sobre

todo por su función polinizadora, más efectiva que cualquier otro, así como su repercusión en el contexto del desarrollo rural, y la contribución al equilibrio ecológico, ya que su presencia es fundamental para la preservación de una gran diversidad de plantas además de elevar la productividad de gran parte de los cultivos, aprovechando recursos que no podrían ser utilizados directamente por ninguna otra actividad agraria ni por el hombre.

Por tanto la producción apícola se configura como uno de los mejores modelos de producción sostenible, donde confluyen intereses económicos y sociales al contribuir a la fijación de la población en el medio rural, en zonas donde el desempeño de otras actividades es complicado así como medioambientales ya que se trata de una producción totalmente respetuosa con el medio a la vez que facilita la polinización (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

Un problema importante, especialmente desde la primavera de 2005, ha sido el denominado “síndrome de despoblamiento de las colmenas”, llegando a estimarse la mortalidad en un 25% (con picos del 40%). Ante una etiología compleja considerada como multicausal pero en la que juega un papel decisivo el estado sanitario de las colmenas y el manejo de las mismas, se ha centrado la atención en la convocatoria de subvenciones a proyectos de investigación aplicada en la apicultura, con el objeto de establecer sus posibles causas y la búsqueda de soluciones. A esto hay que añadir las repercusiones de los incendios, o la situación de sequía y cambio climático por la que viene atravesando España durante las últimas campañas.

El censo de colmenas basado en el Registro de explotaciones apícolas en España, en el mes de marzo del año 2007 asciende a 2.320.949, lo que supone un descenso de un 6% respecto al comunicado en el año 2004.

El nivel de profesionalización del sector en España sigue aumentando, según lo demuestra el hecho de que de los 23.265 apicultores totales, el 24,66% sean apicultores profesionales (denominación que corresponde a aquellos apicultores con más de 150 colmenas). Más del 80% de las colmenas censadas se encuentra en poder de estos apicultores profesionales. Sigue bajando el número de apicultores totales a favor de los apicultores profesionales, asistiendo así a un proceso de concentración que continúa la tendencia observada en el periodo anterior. Comunidades autónomas como Extremadura y Valencia siguen manteniendo las mayores tasas de profesionalización. Los datos indican una media de 99 colmenas por apicultor. La media de colmenas por apicultor profesional asciende a 325, mientras que en los apicultores no profesionales cuentan con una media de 26 (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

La apicultura es una actividad ganadera ligada a la trashumancia y muy determinada por las condiciones climatológicas, ya que las abejas necesitan de los recursos naturales a través del polen y el néctar para satisfacer sus necesidades nutricionales.

Por tanto su alimentación depende de las floraciones, muy castigadas por una climatología adversa, como son las temperaturas elevadas y la sequía persistente que ha azotado el país en los últimos años, lo cual ha sido determinante para la disminución de la producción de miel, a la vez que

contribuye a un debilitamiento de las colmenas que las hace más vulnerables a condiciones extremas.

Las inclemencias climatológicas que conducen a un debilitamiento de la colmena por falta de alimento dan lugar a una mayor incidencia de problemas sanitarios de consecuencias muy serias en algunas ocasiones. A todo ello se unen los incendios que han arrasado numerosas regiones y que en este caso han tenido repercusiones importantes en Castilla y León, Andalucía, Extremadura y Valencia, comunidades con un censo apícola importante, ya que lleva a la desaparición de asentamientos para los colmenares y en otros casos la búsqueda de nuevos asentamientos y una alimentación extra que debe aportarse. Esta situación puede explicar el descenso de más de 100.000 colmenas desde el año 2004, así como la retirada de más de 1.000 apicultores, sobre todo de aquellos no profesionales donde la apicultura supone una fuente extra de ingresos.

3.7.1. Estructura del sector

La producción total de miel se situó en España en el año 2006 en 28.998 toneladas lo que supone un descenso respecto a los datos del 2004 de un 11,2%. Los descensos registrados en la producción derivan de la disminución del número de colmenas en comunidades autónomas donde la climatología vivida en el último ejercicio con fuertes períodos de sequía junto con los intensos incendios registrados en gran parte de la península en el año 2006 ha jugado un papel fundamental. A esto hay que añadir diversas etiologías como el síndrome del despoblamiento de las colmenas o la influencia de agentes infecciosos o parasitarios.

Esta situación de disminución, se traslada a escala regional, donde es obvio que las pérdidas son más cuantiosas en aquellas comunidades autónomas de mayor producción. Así, Andalucía, Valencia, Extremadura y Castilla y León fueron las comunidades autónomas que mayores daños han sufrido desde el verano pasado. Estas pérdidas se han cifrado en algunas de ellas en más del 40% de la producción. El grado de autoabastecimiento en España se sitúa en torno al 82%, tras la ligera bajada producida en los últimos años de acuerdo a la reducción de la producción observada.

La miel que predomina dentro de las producidas en España es la llamada “milflores”, que ha supuesto en el 2006 el 61,14% de la producción total, lo que supone un incremento respecto al año 2005 donde alcanzaba el 55% de la producción total de miel. Sin embargo son importantes las cantidades de otros tipos de miel como la de azahar en las regiones mediterráneas de la península, o la de mielada y bosque que es la principal producción de Castilla y León, la cuarta comunidad con mayor producción dentro del país. Hay que destacar que precisamente son estas mieles más minoritarias las que alcanzan unos niveles más altos de cotización (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

En cuanto al comercio de miel en el ámbito nacional en relación a las distintas posiciones de compra ó venta, se observa como la venta a la industria o mayoristas ocupa el primer lugar entre las posiciones de venta con el 51,1%. Le sigue en importancia la comercialización por cooperativas, consolidando de esta manera el comercio organizado, la venta directa al consumidor con el 17,1% y finalmente la venta envasada al minorista que supone el 9,6% del volumen de producto comercializado.

En lo que se refiere al comercio exterior, a lo largo del año 2006 las importaciones totales ascendieron a 17.566 toneladas, un 16% más que a lo largo del año 2005, mientras que las exportaciones experimentaron un aumento del 12% respecto al año anterior y se situaron en 11.157 toneladas. Estos datos confirman el incremento continuado de las importaciones (en casi 3000 toneladas respecto al año 2004 y en unas 5000 respecto al 2003) y una recuperación de las exportaciones tras el descenso experimentado durante el año 2005 respecto a campañas anteriores.

La mayor parte de las importaciones españolas (79,2%) tienen origen extracomunitario, alcanzando las 13.917 toneladas frente a las 3.649 toneladas con origen en la Unión Europea. En lo que se refiere a las exportaciones, el principal mercado para las mieles españolas continúa siendo el mercado intracomunitario al que se enviaron 9.614 toneladas siendo destinadas a terceros países 1.543 toneladas lo que supone un incremento frente a las 1.116 toneladas del año 2005.

En cuanto al comercio intracomunitario, las exportaciones van dirigidas fundamentalmente a Francia, seguida de Alemania, Portugal y Grecia, mientras que las importaciones provienen de Alemania, Francia y Portugal fundamentalmente. El comercio extracomunitario registra las principales importaciones de Argentina, que arrebató de esta manera la primera posición a China, seguidas de Uruguay y Cuba.

Las exportaciones españolas a terceros países van dirigidas a Marruecos, Argelia, Túnez e Israel fundamentalmente, países que ya ocuparon las primeras posiciones en el año 2005. Las importaciones procedentes de Brasil, que habían superado las 1000 toneladas a lo largo del año 2004, han

quedado prohibidas desde el 17 de marzo de 2006 en todo el territorio comunitario, tras la entrada en vigor de la Decisión de la Comisión 2006/208/CE, lo que ha obligado a buscar mercados alternativos para la compra de este producto, favoreciéndose de esta manera las importaciones desde Argentina, China u otros países al alza como Uruguay, Cuba o Rumanía.

El consumo per cápita de miel en España durante el año 2007 fue de 440 gramos/habitantes año (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

3.7.2. Comercialización

En España desde el año 2000 está la llamada “Mesa para la Miel”, a partir de la creación de una comisión paritaria de constatación de precios como reflejo de las necesidades de un comercio organizado y para dar respuesta a la solicitud del sector. Se han definido los siguientes factores: productos tipo (miel y polen), la fase de comercialización, las condiciones de comercialización, los mercados representativos, la frecuencia de constatación y el tratamiento estadístico de los datos.

Las Comunidades Autónomas con mayor importancia en la producción de miel han definido sus comarcas geográficas, mercados más representativos y unidades elementales de cada una de ellas. Las posiciones comerciales establecidas son las siguientes: venta directa al consumidor, comercialización cooperativa, venta envasada al minorista, venta a la industria o mayoristas.

De esta manera, España cuenta con una mesa de precios para la miel al igual que las existentes en otras producciones ganaderas. En 2002 y 2003 los precios medios percibidos por los productores nacionales para la miel

multifloral (la principal en producción), se situaron entre los 2,30 y 2,60€/kg, mientras que en 2004 la cotización descendió a niveles de 1,60 €/kg, y en 2005 los precios se mantuvieron en torno a 1,69 €/kg. Las cotizaciones se encuentran por tanto en niveles muy bajos, sobre todo tras el levantamiento de la prohibición de la importación de miel china, así como por la entrada de miel de terceros países a precios sensiblemente menores a los comunitarios (inferiores a 1 €/kg).

El precio de la miel multifloral a granel ha caído un 33,08%, la variación de la miel de mielada a granel se sitúa en el -28,84%, la de la miel multifloral envasada en el -13,91% y la de la miel de mielada envasada en el -3,84%. Por tanto son precisamente las mieles envasadas las que mejor han podido soportar la tendencia a la baja, lo que supone una clara ventaja comparativa con el resto y por tanto un punto a tener en cuenta para el futuro.

El descenso de los precios puede tener su explicación en la entrada de mieles procedentes de otros países a precios muy inferiores a los españoles. De aquí que la comercialización de mieles con distintivos de calidad que aportan un valor añadido, sea una de las alternativas para paliar, por lo menos en parte esta situación (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

Aunque la diversidad de formas de producción de las distintas Comunidades Autónomas no permite que podamos hablar de una única “explotación tipo” en España, el rendimiento neto en el caso de las explotaciones con venta de miel al por mayor ha descendido en un 26% respecto a lo calculado en el año 2003 debido a la disminución de los ingresos procedentes de la miel milflores fundamentalmente, ya que ha pasado de considerar un precio medio de 2,4

€/kg a sólo 1,8 €/kg. Los gastos permanecen estables así como los ingresos derivados de la venta de cera.

En el caso de las explotaciones con venta de miel y polen, la bajada de los precios de la miel ha sido compensada con el incremento de los precios percibidos por la venta de polen que ha incrementado ligeramente su valor a pesar del incremento de los costes de producción del polen. El rendimiento neto de este tipo de explotaciones se ha incrementado en un 6% respecto al año 2003.

Las comunidades autónomas han desarrollado una importante normativa en materia de calidad, destacando la existencia de diferentes tipos de miel con denominaciones de calidad u otras formas que permiten diferenciar su valor gastronómico, con el consiguiente valor añadido que eso supone (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2007).

3.8. Envasado de los alimentos

3.8.1. Aspectos generales

El envasado es una parte importante en el proceso de comercialización de un alimento, y en particular de la miel. El envasado puede definirse en términos de su papel protector, como “el medio para conseguir un suministro seguro de los productos en buenas condiciones hasta el consumidor final a un coste mínimo” (Fellows, 2007).

Las principales funciones del envasado señaladas por Fellows (2007) son las siguientes:

- **Contención:** mantiene el contenido de forma segura hasta llegar al consumidor final. Dependiendo del producto los envases tendrán formas y tamaños diferentes.
- **Protección:** protege el producto y evita que sufra agresiones mecánicas y ambientales durante su almacenamiento y distribución.
- **Conservación:** evita los cambios químicos, bioquímicos o microbiológicos del alimento almacenado.
- **Conveniencia y comodidad:** ayuda a mejorar el producto durante el almacenamiento y la distribución, incluyendo una apertura y un dispensado fácil, así como un manejo sencillo para los consumidores después de su uso.
- **Comunicación:** en muchas ocasiones permite la identificación del contenido así como ayuda a la venta del producto y es un medio de interlocución con el consumidor final. Los contenedores en los que se transporta también deben informar al transportista el destino y las instrucciones de manejo y de almacenamiento. Los envases disponen de un etiquetado que deben informar al consumidor acerca del modo de apertura y/o del uso y conservación del contenido.

El **envasado** es una parte esencial del marketing de un alimento. Cuando en el mercado existen varias ofertas, el envase puede ser la diferencia clave para hacer la elección de compra (Coles, Dowell & Kirwan, 2004). Para seleccionar un determinado proceso de envasado, es importante tener presentes algunos aspectos y actividades involucrados en la recepción del producto envasado por el consumidor.

Dentro de los factores que deben considerarse en este proceso están los requisitos técnicos de almacenamiento del alimento y de su envase, de forma

que su presentación sea funcional, que el producto este protegido durante su vida útil y tenga facilidad de uso por el consumidor. En el caso de la miel, se han venido desarrollando envases de Tereftalato de Polietileno (PET) con válvula anti goteo que tienen aceptabilidad por parte del consumidor.

El consumidor valora la apariencia agradable y estética, la conservación del aroma, la facilidad en el manejo, funcionalidad y respeto al medio ambiente.

Envase es todo producto fabricado con materiales de cualquier naturaleza y que se utiliza para contener, proteger, manipular, distribuir y presentar productos, desde materias primas hasta productos terminados, en cualquier fase de la cadena de fabricación, distribución y consumo (Coles et al., 2004).

La aceptabilidad de un envase es mayor cuando es estético, posee un tamaño y una forma funcionales, contiene el alimento de forma adecuada sin pérdidas, con posibilidad de actuar como dispensador, fácil apertura y de fácil eliminación, reutilización o reciclado. Los factores influyentes en la decisión de compra de un *envase*, son las siguientes:

- **Calidad:** sistemas de procesado y envasado que preserven el sabor, aspectos nutritivos, textura, color y frescura.
- **Seguridad:** que el envase proteja al producto de una posible contaminación.
- **Flexible:** en cuanto a cambio de tamaño y de diseño
- **Compatible** con sistemas de manejo y distribución.
- **Disponibilidad:** que el producto pueda encontrarse en cualquier época y lugar.

3.8.2. Materiales de envase

El material utilizado para envasar un alimento determina su calidad. Los factores técnicos que deben tenerse en cuenta cuando se selecciona el material de envase son fundamentalmente:

- Vida útil del producto
- Propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas del alimento
- Efecto barrera del envase

Los materiales de envasado se pueden agrupar en dos grupos principales:

- **Contenedores de transporte:** contienen y protegen el alimento durante el transporte y la distribución, pero no tienen ninguna función en el marketing del producto. El contenedor de transporte más utilizado es el de cajas de cartón corrugado, por cargas de 5 a 20 kg dependiendo del producto envasado. Las cualidades de los contenedores de transporte son:
 - Eficiencia durante el transporte y distribución
 - Protección frente a las condiciones climáticas y al medio externo
 - Compatibilidad con el producto
 - Fácil manejo
 - Cierre seguro durante el transporte y distribución
 - Comodidad de uso para transportistas y distribuidores.
 - Buena eliminación o reutilización
- **Contenedores de venta al por menor o unidades para consumidores:** su función es proteger y presentar el alimento en cantidades adecuadas para la venta, distribución y almacenamiento.

3.8.2.1. Vidrio

El vidrio es un material duro, frágil y transparente que ordinariamente se obtiene por fusión a unos 1.500 °C de arena de sílice (SiO₂), carbonato sódico (Na₂CO₃) y caliza (CaCO₃). Químicamente se hace mediante el enfriamiento de una mezcla caliente y fundida de silicatos, cal y sosa hasta alcanzar el punto de fusión (Coles et al., 2004).

Ventajas del envasado de alimentos en contenedores de vidrio

El envase de vidrio posee una serie de cualidades que le convierten en soporte ideal para envasar todo tipo de alimentos, ya que favorece la presentación y diseño del producto ante el consumidor y es posible observar el cambio de color, es inerte, químicamente resistente a todos los alimentos (líquidos y sólidos) y no transmite ningún olor, a pesar que el vidrio es un material frágil, los envases tienen una gran capacidad para resistir peso, lo que facilita los sistemas de llenado y distribución, aséptico, transparente, versátil, hermético, higiénico, indeformable, impermeable al paso de gases, conserva aroma y sabor sin ceder nada al producto que contiene, añade prestigio e imagen de calidad del producto, es reutilizable y reciclable (Coles et al., 2004).

3.8.2.2. Cerámica

La cerámica es un material utilizado desde la antigüedad para el envase de alimentos, siendo un material atractivo para el consumidor porque relaciona el producto con alimentos autóctonos de tradición artesanal. Es un material poroso, resistente a los ácidos, las sales, los detergentes y los cambios en temperatura.

El Real Decreto 891 de 2006 transpone al ordenamiento jurídico español la Directiva 2005/31/CE por el que se aprueban las normas técnico-sanitarias aplicables a los objetos de cerámica destinados para su uso como menaje o envase de alimentos.

Algunas de las principales novedades incluyen la obligación de que en las fases de comercialización, incluida la venta al por menor, los objetos de cerámica que aún no estén en contacto con productos alimenticios, vayan acompañados de una declaración por escrito que certifique su conformidad con las normas que les sean aplicables.

Además, el fabricante o importador deberá conservar y poner a disposición de las autoridades competentes nacionales, cuando se lo soliciten, la documentación que demuestre que los objetos de cerámica cumplen los límites de emigración de plomo y de cadmio establecidos. Otro punto de renovación es la actualización de los métodos de análisis para la determinación de plomo y cadmio, teniendo en cuenta los últimos avances tecnológicos y los parámetros de calidad que deben cumplir estos métodos.

Los límites máximos admitidos de plomo están entre 0,8 mg/dm² y 4,0 mg/l y los de cadmio están entre 0,07 mg/dm² y 0,3 mg/l (Real Decreto 891/2006).

3.8.2.3. Materiales plásticos

Los plásticos son compuestos orgánicos macromoleculares obtenidos por polimerización, policondensación, poliadición o procesos similares, a partir de moléculas de un menor peso molecular, o por alteración química de compuestos macromoleculares naturales.

Los plásticos son utilizados en la fabricación de envases debido a ventajas como:

- Fluyen y se moldean bien bajo determinadas condiciones, para poder conseguir todo tipo de formas y tamaños.
 - En la mayoría de los casos son químicamente inertes, aunque no necesariamente impermeables.
 - Su coste es competitivo en el mercado.
 - Son ligeros de peso.
 - Ofrecen muchas posibilidades en cuanto a transparencia, color, sellado por calor, efecto barrera y resistencia al calor.
-
- **Tereftalato de polietileno (PET)**

Es un film transparente, brillante y muy resistente. Tiene buenas propiedades como barrera a la humedad y a los gases. Es flexible a temperaturas entre -70 °C y 135 °C y se contrae muy poco con las variaciones de temperatura y humedad.

Los poliésteres o polímeros de condensación son los formados a partir de ésteres monómeros resultantes de la reacción de un ácido carboxílico con un alcohol. Dependiendo de los monómeros utilizados, en la reacción y polimerización del ácido tereftálico con el etilengliol, el producto que resulta es el PET.

El PET se puede hacer en películas por soplado o fundido. Los espesores de las películas deben ser de 12 µm para las más finas y 200 µm para los compuestos laminados. No se suelen agregar aditivos en la fabricación de películas de PET.

- **Polipropileno (PP)**

Es una película parcialmente cristalina con buenas propiedades ópticas y muy resistentes a la tensión y punción. Es bastante impermeable al vapor de agua, los gases y los olores y no le afectan los cambios en la humedad ambiental.

El PP es un polímero lineal con grupos salientes CH₂. Se trata de una resina más dura y densa que el polietileno. El PP se utiliza desde 1950, tiene la densidad más baja y el punto de fusión más alto de todos los termoplásticos de alto volumen. Es un plástico muy versátil que se puede procesar de muchas formas y que tiene muchas aplicaciones en el campo de la alimentación, tanto en su forma flexible como rígida. Su punto de fusión es de 160 °C. Las superficies de las películas de PP son suaves y funden bien, siendo también duras. Al fundir la película es clara como el vidrio y se puede sellar por calor (Coles et al., 2004).

El PP es químicamente inerte y resistente a la mayor parte de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos. Tiene propiedades de barrera con respecto al vapor de agua y presenta resistencia en cuanto a las grasas y aceites.

3.8.3. Factores externos que influyen sobre la calidad de un alimento envasado

La calidad de un alimento envasado durante su almacenamiento puede verse afectada negativamente por los siguientes factores:

- Contaminación por riesgos biológicos, químicos o físicos.
- Fuerzas mecánicas (daños por impacto, vibración, compresión o abrasión).
- Adulteración de forma fraudulenta.

- Manipulación inadecuada.

El envase no debe reaccionar con el alimento y debe permitir un manejo sencillo durante los procesos de llenado, sellado, transporte, almacenamiento y venta. El material de un envase alimentario proporciona una barrera entre el mismo y el medio ambiente circundante preservando con ello su calidad. Permite un control en la transmisión de la luz, en la velocidad de transmisión del calor, así como de la humedad, de gases y actúa como barrera de microorganismos e insectos.

Los factores externos que influyen en la calidad del alimento envasado fueron estudiados por Fellows (2007) y se describen a continuación:

3.8.3.1. Luz

La cantidad de luz absorbida o transmitida varía de acuerdo con el material de envase y con la longitud de onda de la luz incidente sobre el producto. Algunos materiales transmiten tanto la luz visible como la ultravioleta; aquellos envases donde se muestra el contenido deberán permitir el paso de la luz, pero aquellos alimentos susceptibles de alteración deben impedirla y para evitar que la luz transmitida deteriore los productos fotosensibles, los envases incorporan pigmentos que impiden esta incidencia.

3.8.3.2. Calor

La capacidad aislante de un envase depende de su conductividad térmica, algunos materiales se aíslan del calor transmitido por conducción y los materiales reflectantes del transmitido por radiación. Sin embargo, el control de la temperatura de almacenamiento es más importante que la capacidad

del envase para proteger el alimento del calor. En las aplicaciones donde se calienta el envase, el material de envase debe resistir las condiciones de almacenamiento sin que se produzcan daños ni interacción con el producto.

3.8.3.3. Humedad y gases

La pérdida o absorción de agua es uno de los factores que más influyen sobre la vida útil de los alimentos. En el interior de un envase se produce un microclima que viene determinado por la presión de vapor de agua en el alimento a la temperatura de almacenamiento y la permeabilidad del envase. El control del intercambio de agua es imprescindible para evitar el deterioro por microorganismos o enzimas.

La influencia de los cambios del contenido de agua se puede observar mediante la isoterma de sorción de agua del alimento, que depende de la velocidad de transmisión de vapor de agua del envase.

3.8.3.4. Microorganismos, insectos, animales y suciedad

Los envases fabricados con vidrio y polímeros son barreras para microorganismos, pero las tapas o cierres son una fuente potencial de contaminación.

- El aire o agua contaminados se introducen a través de los poros en contenedores herméticamente sellados conforme se va formando el vacío en el espacio de cabeza.
- En el caso de polímeros, la causa de contaminación es el mal sellado.
- Daños como roturas o fisuras en el material de envasado pueden ser causa de contaminación.

Todos los tipos de envase deben proteger los alimentos del polvo y de otros contaminantes sólidos. La proliferación de insectos disminuye con una adecuada manipulación e higiene en el proceso de envasado.

3.8.3.5. Resistencia mecánica

La capacidad de un envase para proteger los alimentos de daños mecánicos depende de su resistencia a la fractura que puede sufrir durante el transporte y/o almacenamiento. La resistencia de los materiales de envasado puede evaluarse mediante la medida de la deformación que resulta al aplicar una fuerza y posterior evaluación de los siguientes factores: fuerza de tensión, el módulo de Young, la elongación por tracción, la tracción límite de fluencia y la fuerza de impacto. Cada uno de estos factores se halla influenciado por la temperatura y el tiempo en el cuál se aplica la fuerza. La estructura molecular de las películas de polímero se ordena de forma distinta dependiendo del tipo de película y método de fabricación.

3.9. Parámetros físico-químicos y biológicos indicadores de la calidad de la miel almacenada

3.9.1. Hidroximetilfurfural (HMF)

Uno de los problemas a los que se enfrentan los envasadores de miel es la demanda por parte del consumidor de un producto fluido, que esté sin cristalizar. Algunas empresas someten la miel a un proceso térmico de pasterización para conseguir la licuefacción, eliminar levaduras para minimizar el riesgo de fermentación y eliminar formas vegetativas bacterianas (Visquert, Escriche, Andres & Fito, 2004).

En la legislación española el contenido de HMF está considerado como un parámetro que marca el grado de frescura de una miel, con el fin de proporcionar a los consumidores un alimento que haya sido sometido a la menor temperatura posible durante su tratamiento y con un periodo de tiempo controlado. En general, excepto la miel de uso industrial no debe tener un contenido de HMF mayor de 40 mg/kg, las mieles procedentes de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles no deben tener un contenido de HMF mayor de 80 mg/kg (Real Decreto 1049/2003).

La concentración de HMF aumenta con el tiempo y/o calentamiento y tiene una relación inversa con la actividad enzimática existente en la miel, de modo que aquellas mieles con un índice de diastasa bajo, posiblemente poseerán alto contenido de HMF, lo que sería indicativo de una conservación inadecuada. De igual modo, el contenido de HMF va aumentando con el transcurso del tiempo y se observa una notable diferencia del incremento según procedan de zonas cálidas o frías (Huidobro & Simal, 1984), razón por la cual se hace imprescindible un control exhaustivo de las condiciones de los tratamientos industriales y del almacenamiento posterior.

Se ha evidenciado que durante el almacenamiento se da un menor incremento en mieles naturales sin calentar que en mieles comerciales pasteurizadas, circunstancia que se atribuye a un pH alto (Huidobro & Simal, 1985). La presencia de altos contenidos del HMF también puede ser indicativo de la adición a la miel de azúcar invertido obtenido por hidrólisis química (Serra & Gómez, 1986).

El HMF es un parámetro significativo, que unido a la actividad de los enzimas diastasa e invertasa, representa un indicador de frescura y calidad de la miel, permitiendo juzgar condiciones de procesado y almacenamiento.

- **Reacción de Maillard**

La reacción de Maillard comprende un complejo sistema de reacciones que dan lugar a polímeros de color pardo denominados melanoidinas (Fayle & Gerrard, 2005). Ha sido estudiada con soluciones modelo y en ella participan azúcares con grupos carbonilos libres, aminoácidos, péptidos y proteínas (Primo, 1997).

Los compuestos resultantes de esta reacción pueden ser responsables del aroma, gusto y apariencia en algunos alimentos. También puede ser la causa de su deterioro durante el almacenamiento y procesado, resultando una disminución de su calidad nutricional por la formación de compuestos antinutricionales y tóxicos, la destrucción de aminoácidos y la reducción de la digestibilidad de las proteínas de los alimentos (Fayle et al., 2005).

El HMF es el producto más importante de la degradación por calor en la miel (Turhan, Tetlk, Karhan, Gurel & Tavukcuoglu, 2008). Este proceso ocurre dentro de un conjunto de reacciones muy complejas que conducen a la formación de pigmentos, modificación de olor y sabor, por la llamada reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático (Cheftel & Cheftel, 1980).

Según Primo (1997), en la reacción de Maillard se pueden distinguir varias etapas:

- Inicialmente, se produce una condensación de los azúcares con los compuestos aminados formando aldosaminas.
- En la etapa intermedia y por vías diferentes, se forman a partir de las cetosaminas, compuestos dicarbonílicos, o reductonas. Las reductonas tienen un grupo enodiol análogo al del ácido ascórbico y fuerte poder reductor; interfieren en la valoración de la vitamina C con 2,4 diclorofenol – indofenol con iodo, dando valores muy altos en alimentos envejecidos. Para evitarlo se han desarrollado métodos analíticos que separan la vitamina C de otros compuestos.
- A partir de los compuestos carbonílicos formados, en los tratamientos térmicos de los productos ácidos, se forma el 5, hidroximetilfurfural, este compuesto en la miel es un indicador de frescura y sobrecalentamiento.
- Con anterioridad a la formación de las reductonas se pueden producir a partir de los productos intermedios, compuestos cíclicos como maltol y 2, acetil furano. Por su parte estos compuestos pueden reaccionar con aminos para formar compuestos cíclicos o amino reductonas, a partir de los cuales se forman polímeros.
- En esta fase comienza a modificarse el color de los productos, pues algunos compuestos formados tienen coloración amarilla. Los productos dicarbonílicos de la reacción de Maillard se condensan también con aminoácidos, dando aldehídos, aminocetonas y oxiconas por la reacción de Strecker con descarboxilación.
- Las aminocetonas se condensan para dar pirazinas sustituidas que tienen aromas acusados. Las reacciones de Maillard y Strecker se producen más intensamente cuando hay cambios de temperatura, durante tiempos largos y en el almacenamiento, siendo favorecidas por pH menos ácidos.

3.9.2. Color

El color de las mieles es una propiedad física que puede variar del blanco (algunas son incoloras) al pardo oscuro casi negro, pasando por tonalidades amarillo, ámbar, rojizo, verdoso y marrón. Algunas mieles tienen la propiedad de emitir fluorescencia al ser iluminadas por la luz ultravioleta. Por otro lado existen diferencias entre mieles claras y oscuras, observándose en las primeras ausencia de tirosina y triptófano, que por el contrario aparecen en las segundas (Juan, 2001; Sáinz et al., 2000; Tomás-Barberán et al., 1994).

El color de las mieles puede ser debido a la presencia de pigmentos como carotenos, xantofilas y a compuestos fenólicos, como flavonoides, que se encuentran en el néctar de las flores (Huidobro et al., 1984), de ahí que el color se relacione con el origen botánico de la miel e incluso con su composición, como es el caso de las mieles de mielada que son más oscuras debido a los compuestos pardos que se forman por reacción entre sus sales minerales y la materia orgánica que contienen.

El oscurecimiento de la miel está relacionado con la composición de la misma y con la temperatura de almacenamiento. Los componentes que posiblemente influyen en los cambios de color son la relación glucosa fructosa, el contenido de nitrógeno, de aminoácidos libres y humedad (Pereyra et al., 1999). También existen otras causas del oscurecimiento de la miel:

- Se observan diferencias estacionales, las mieles de primavera son más claras que las de otoño, observándose además una diferenciación entre ellas a causa de sus distintos orígenes botánicos (Gómez, 2004).
- La presencia de oxígeno y la actividad de la polifenol-oxidasa, un enzima que contiene cobre y cataliza la reacción entre un grupo fenol y el oxígeno

para dar agua y quinona, compuesto responsable de los pigmentos amarillos y marrones (Martínez-Valverde, María Jesús & Ros, 2000; Pereyra et al., 1999).

- Inestabilidad de la fructosa en solución ácida y posterior proceso de caramelización (Antony et al., 2000).
- Combinación de taninos con polifenol-oxidasas y sales de hierro (Pereyra et al., 1999).

3.9.3. pH

La miel presenta una reacción ácida característica condicionada por el contenido de ácidos orgánicos y sales minerales (en especial potasio, sodio y calcio). Sin embargo su apreciación queda en segundo plano, enmascarada por el dulzor de sus componentes mayoritarios, los carbohidratos (Piana et al., 1989). La medida del pH nos permite conocer la acidez actual de la miel, lo que contribuye a dar estabilidad a este alimento frente a ataques microbianos (Sancho, Muniategui, Huidobro & Simal, 1991 a).

La evaluación del pH resulta de máximo interés durante los procesos de extracción y almacenamiento, no solo por su influencia sobre el desarrollo microbiano y el contenido enzimático, sino por su capacidad para alterar las propiedades físicas y reológicas de la miel, su textura, la viscosidad o su resistencia a las agresiones externas (Cavia et al., 2007; Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria, 2002).

El valor del pH de una miel en disolución se sitúa normalmente entre 3,5 y 4,5 con una media de 3,9 (Jéanne, 1993; Louveaux, 1985). Esta variación depende del origen botánico, siendo inferior a 4 para las mieles de néctar y

superiores a esta cifra para los mielatos (Frías & Hardisson, 1992). Una miel de alta reactividad (pH = 3,5) suele ser más frágil que aquellas con pH cercano a 5. En condiciones ideales de almacenamiento, el pH se comporta como un parámetro muy estable, apreciándose una ligera tendencia al descenso con el tiempo (Estupiñan et al., 1998a; Fattori, 2004).

El pH es un parámetro importante a tener en cuenta durante el almacenamiento por su influencia sobre el desarrollo de microorganismos y su incidencia en la actividad enzimática, además porque afecta a las propiedades físicas del producto como la textura, estabilidad y resistencia (Estupiñan et al., 1998a).

3.9.4. Acidez libre, láctónica y total

La acidez se debe principalmente los ácidos orgánicos presentes en la miel que se encuentran en equilibrio con sus lactonas y con algunos iones inorgánicos (fosfatos, sulfatos, cloruros y nitratos). El origen de estos ácidos esta principalmente en las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la maduración y almacenamiento del producto. La acidez es una característica importante de la miel, ya que la protege frente al ataque microbiano y contribuye a darle aroma y sabor así, como le confiere propiedades antibacterianas y antioxidantes.

En la miel pueden distinguirse tres tipos de acidez: libre, láctónica y total, todas ellas influidas por su origen botánico. La acidez libre de la miel proviene de todos los ácidos en estado libre, por lo cual puede variar mucho. Muchos autores describen en sus estudios que la acidez tiene un incremento con el tiempo de almacenamiento. En la fermentación, la acidez aumenta porque

los azúcares de la miel se transforman en alcoholes y ácidos por acción de levaduras (Cavia et al., 2007).

La acidez láctónica puede considerarse como una reserva potencial de acidez ya la reserva en lactonas origina ácidos cuando la miel se alcaliniza. Las lactonas están constituidas básicamente por las glucolactonas, que están en equilibrio con el ácido glucónico formado por acción de la glucosa oxidasa (Estupiñan et al., 1998a). En un estudio realizado con mieles del País Vasco, se observó que aquellas con menor acidez láctónica, presentaban un pH más elevado (Sancho et al., 1991 a). Un estudio sobre mieles libanesas concluye que la acidez libre no está relacionada directamente con el pH (Mostafá, Ahmed & Mahmoud, 1982). Mediante acción microbiana, el alcohol procedente de la fermentación de los azúcares se transforma en ácido (Crane, 1975), de ahí la justificación legal de su determinación. La acidez puede variar en un amplio rango permitiéndose un máximo de 50 meq/kg (Real Decreto 1049/2003).

Ambos tipos de acidez aumentan durante el almacenamiento, siendo mayor el incremento de las lactonas que de los ácidos libres. El contenido de lactonas en miel fresca no está correlacionado con el contenido en las mieles almacenadas, pero sí existe una correlación entre los ácidos libres antes y después del almacenamiento (Estupiñan et al., 1998a; Krauze & Krauze, 1991). Durante el envejecimiento de la miel se da un aumento de la acidez debido a la acción de la glucosa oxidasa, que transforma los azúcares en ácidos, pero no hay correlación entre este aumento de la acidez y el modo de conservación de la miel (Cherchi, Porcu, Spanedda & Tuberoso, 1997; Estupiñan et al., 1998a). La suma de la acidez libre y la acidez láctónica se denomina acidez total.

Tanto la acidez libre como láctica aumentan durante el envejecimiento, aspecto que no está relacionado con el pH, pudiéndose originar por la formación natural de disoluciones tampón que amortiguan el valor de la acidez (Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria, 2002).

3.9.5. Actividad enzimática

La actividad y concentración inicial de enzimas en una miel, en general, es muy variable y depende de su origen botánico y de la abeja, disminuyen por la pérdida de frescura, bien de forma natural (envejecimiento) o por tratamientos térmicos provocados (calentamiento, pasteurización) que destruyen cualidades biológicas o nutricionales de la miel provocando pérdida de valor nutricional y organoléptico. Por esta razón la evaluación enzimática es empleada como criterio de calidad (Sánchez, 1999).

En general, cuando la miel proviene de un flujo de néctar rápido y abundante contiene menos enzimas que las de flujos menos ricos, ya que en el primer caso las abejas tienen mucho néctar que procesar. De igual forma las mieles que proceden de néctar con elevado contenido de azúcares, tiene menos enzimas (sobre todo diastasa e invertasa) que las que proceden de néctares más diluidos puesto que aquella ha necesitado menos manipulación para elaborarse (Sánchez, 1999).

3.9.5.1. Actividad diastasa

El enzima diastasa fue identificado por Auzinger en 1910 y en 1914 Gothe propone el uso de este enzima como criterio de calidad (White, 1992).

La actividad diastasa es un parámetro analítico que contempla la legislación vigente para medir el grado de frescura de la miel. Se mide en la escala Gothe, que compara el tiempo requerido para que el enzima reduzca su actividad a la mitad del valor inicial al aumentar la temperatura.

La actividad diastasa junto con la del enzima invertasa y el contenido de hidroximetilfurfural son parámetros de control de calidad de la miel y son indicadores de frescura y de las condiciones de almacenamiento y calentamiento para las mieles. Cuando el valor de actividad es bajo, es importante para el mercado de la miel por ser indicativo de envejecimiento, malas condiciones de manejo en la extracción y/o almacenamiento (Crane, 1990).

La diastasa es el único enzima cuyos niveles de actividad se encuentran legislados a nivel comunitario. Debido a su importancia como indicador de la calidad de la miel, sus niveles están incluidos en el Real Decreto 1049/2003 Norma de calidad relativa a la miel, estableciéndose un valor mínimo de 8 para el índice de diastásico en la escala Schade. Las mieles con baja actividad diastasa deberán tener un valor mínimo de 3 unidades Gothe siempre que el contenido de HMF sea menor de 15 mg/kg.

3.9.5.2. Actividad invertasa

La invertasa es el enzima más importante de la miel (Sepúlveda, 1986) ya que cataliza la principal reacción que convierte el néctar en miel al transformar la sacarosa en glucosa y fructosa. El enzima puede continuar la inversión de la sacarosa después de extraer la miel del panal y durante el almacenamiento, reduciendo finalmente el contenido de sacarosa a niveles aceptables. La

acción de la invertasa termina cuando la miel ha madurado, su pH óptimo de acción es 6 (White, 1992).

La invertasa permite que las abejas produzcan una solución de azúcares muy concentrada. Esto hace que la miel resista la fermentación y constituya un alimento de elevado valor energético ocupando un espacio mínimo en la colmena (Sánchez, 1999).

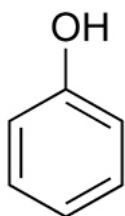
La actividad de la invertasa debería ser el mejor indicador de la calidad de la miel, debido a que los azúcares fructosa y glucosa resultantes de la maduración tienen menor tendencia a cristalizar que la glucosa. El enzima invertasa es más sensible al calor que la diastasa y las abejas lo incorporan a la miel a niveles más elevados que éste (Sánchez, Huidobro, Mato, Muniategui & Sancho, 2001).

Esta actividad enzimática varía considerablemente según su origen, el grado de transformación del néctar y la raza de las abejas. El elevado contenido de sacarosa de algunas mieles (cítricos, algunos tréboles) resulta normalmente de flujos de néctar espesos o con alta concentración de azúcares que necesitan poca manipulación por la abejas para conseguir la densidad, por lo que sus niveles de invertasa son considerablemente inferiores a los de la mayoría de las mieles (White, 1992).

3.9.6. Fenoles totales

El descubrimiento de los compuestos fenólicos en la miel (Bogdanov, 1989) fue de notable importancia al reconocérseles su papel de marcadores objetivos del origen floral/geográfico sin menospreciar su importancia nutricional, además de contribuir a exaltar las calidades sensoriales tales

como su amargor (Tomás-Barberán, Martos, Ferreres, Branka S. & Anklam, 2001).



Químicamente, los compuestos fenólicos están constituidos por un anillo aromático y al menos un grupo hidroxilo (OH) en cualquier posición (fenoles sencillos). Normalmente tienen también en el anillo un grupo funcional (alcohol, ácido, aldehído)

que le da unas características determinadas y uno o varios sustituyentes en cualquier posición libre (Uthurry, Bartolomé & Cordovés, 2007)

Las tres familias principales presentes en la miel son: ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides (flavonas, flavonoles y flavonoides) (Juan, 2001). Los polifenoles como flavonoides, pigmentos como la clorofila, carotenoides y derivados de los taninos son compuestos que afectan al color de la miel (Juszczak, Soch, Roźnowski, Fortuna & Nalepka, 2009).

La tipificación de los compuestos fenólicos y de otros componentes en la miel, es de especial significado para aumentar el conocimiento bromatológico de este alimento. Por otra parte, la identificación de su perfil de flavonoides y el contenido de compuestos fenólicos en mieles de diversas zonas geográficas y climáticas, podría permitir no solo la identificación del origen floral y/o geográfico sino también ser indicador potencial de su calidad biológica (Blasa et al., 2006).

Tradicionalmente estos compuestos han sido considerados como anti nutrientes, debido al efecto adverso de uno de sus componentes mayoritarios, los taninos, sobre la digestibilidad de la proteína. Los taninos tienen propiedades astringentes y afectan la digestibilidad de los nutrientes,

particularmente al nitrógeno alimentario, por su unión a proteínas exógenas y endógenas. Además pueden reducir la actividad de ciertas enzimas digestivas como la tripsina, la amilasa y la lipasa (Vázquez, DeCos & López, 2005).

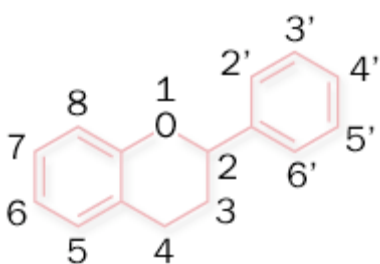
Sin embargo, en la actualidad se ha despertado un reciente interés por ellos dadas sus propiedades antioxidantes (Gheldof & Engeseth, 2002) y sus posibles implicaciones beneficiosas para la salud humana, como son en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (Martínez-Valverde et al., 2000).

El contenido de fenoles totales varía mucho de acuerdo con el origen botánico y geográfico de la miel, teniendo una media de 74 mg ácido gálico/100 g de miel para mieles de néctar (Meda, Lamien, Romito, Millogo & Nacoulma, 2005), y de 94 mg ácido gálico/100 g para mieles de mielada oscuras (Meda et al., 2005).

En la miel de fresa se ha encontrado valores de 79 mg de ácido gálico/100 g de miel (Beretta, Grabata, Ferrero, Orioli & Meffej, 2005). En mieles de California los estudios reportan contenidos de fenoles totales entre $4,6 \pm 0,2$ mg de ácido gálico/100 g de miel hasta $45,6 \pm 55,6$ mg de ácido gálico/100 g de miel (Gheldof, Xiao-Hong & Engeseth, 2002).

En otros estudios han determinado el contenido de fenoles totales para mieles multiflorales expresados como mg de ácido caféico/100 g de miel obteniendo un contenido de 12.5 a 17.5 mg de ácido caféico/100 g de miel (Blasa et al., 2006).

3.9.7. Flavonoides totales



Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de los compuestos fenólicos, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos, siendo los más abundantes en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (Juan, 2001).

Esta estructura básica permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanololes, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandioli y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos estos grupos las flavonas (p.e. apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (p.e. quercetina, mirecitina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales (Juan, 2001; Martínez-Valverde et al., 2000).

Los flavonoides, ocasionalmente, pueden estar presentes en las plantas como agliconas, aunque lo más frecuente es encontrarlos como derivados glicosídicos. Pueden subdividirse en 13 clases: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonol, flavanonas, flavanololes, flavandioli o leucoantocianidinas, antocianidinas, isoflavonoides, biflavonoides, proantocianidinas o taninos condensados.

Entre los flavonoides, los compuestos más comunes en la miel son las flavonas (apigenina, luteolina, diosmetina), los flavonoles (quercetina,

miricetina, kaempferol), las flavanonas (naringenina, hesperidina), y las isoflavonas (genisteína, daidzeína). Los flavonoides (catequina, epicatequina, galocatequina) son constituyentes monoméricos de los taninos, aunque son también muy frecuentes como monómeros libres.

La composición y naturaleza de los distintos flavonoides se hallan presentes en muestras de miel de diversas áreas geográficas (Europa, Norteamérica, Regiones ecuatoriales de Sudamérica, China y Australia) (Tomás-Barberán et al., 2001). Los flavonoides presentes en la miel tienen su origen en el néctar, el polen y propóleos, material cuya fuente botánica puede variar con la ubicación geográfica de las colmenas. Los metabolitos procedentes de flavonoides presentes en el néctar pueden ser los más valiosos marcadores bioquímicos del origen botánico, ya que éste es la principal materia prima a partir de la cual se elaboran mieles florales (Juan, 2001).

Los antioxidantes naturales presentes en la miel, especialmente los flavonoides, están relacionados con las características biológicas de la misma: antibacteriana, antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica y acción vasodilatadora (Gómez-Caravaca, Gómez-Romero, Arraez-Roman, Carretero & Fernández-Gutierrez, 2006).

El contenido de flavonoides totales en miel ha sido estudiado por varios autores, un estudio de miel de Burkina Faso reporta que la miel de este país tiene flavonoides totales entre 0,17 y 8,35 mg de quercetina/100 g de miel con un valor medio de $2,57 \pm 2,09$ mg de quercetina/100 g de miel (Meda et al., 2005). En un estudio de mieles italianas el contenido de flavonoides totales varía de 1,23 a 2,93 mg de catequina/100 g de miel (Blasa et al., 2006).

3.9.8. Actividad antioxidante

El término antioxidante significa que impide la oxidación de otras sustancias químicas, provenientes de reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos. Los antioxidantes actúan suministrando el electrón necesario para completar la capa electrónica externa del radical libre (Gutiérrez, Rodríguez & Vit, 2008).

Un radical libre es una molécula orgánica ó inorgánica extremadamente inestable y muy reactiva debido a que posee un electrón desapareado (\bullet), muy susceptible de establecer un enlace con otro átomo o molécula. Estas moléculas se pueden sintetizar en un laboratorio, se pueden formar en la atmósfera como resultado de la radiación y también se forman en los organismos vivos (incluyendo el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno (Wade, 1993).

Existe un número creciente de estudios, publicaciones y datos experimentales que demuestran los efectos beneficiosos de los antioxidantes frente a enfermedades degenerativas inducidas por el estrés oxidativo y enfermedades relacionadas con el cáncer y el envejecimiento (Pokorny, Yanishlieva & Gordon, 2005).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contribuye significativamente a la salud humana. En varios estudios en miel se ha demostrado que su perfil fenólico está constituido por varios ácidos y ésteres orgánicos aromáticos y por las agliconas de flavonoides (Al-Mamary, Al-Meeri & Al-Habori, 2002; Bertoncelej, Dobersek, Jamnik & Golob, 2007; Cao, Chen & Song, 2005; Kenjeric, Mandic, Primorac, Bubalo & Perl, 2007; Meda et al., 2005; Yao, Jiang, Singanusong, Datta & Raymont, 2004).

La miel se ha utilizado desde la antigüedad y ha ganado el aprecio como el único alimento natural, usado tradicionalmente como agente edulcorante. Sin embargo, varios aspectos de su uso indican que también funciona como un conservante de alimentos (Wang, Gheldof & Engeseth, 2004). Se ha demostrado que la miel sirve como fuente de antioxidantes naturales, eficaz en la inhibición de reacciones de pardeamiento en frutas y vegetales (Chen, Mehta, Berenbaum & Engeseth, 2000; Oszmianski & Lee, 1990) y frente a la oxidación lipídica de productos de origen animal (Antony et al., 2000) y pudiéndose observar que la capacidad antioxidante del suero humano fue incrementada significativamente después del consumo de miel (Gheldof, Xiao-Hong & Engeseth, 2003).

*Material, condiciones
experimentales y metodología*

4. MATERIAL, CONDICIONES EXPERIMENTALES Y METODOLOGÍA

4.1. Material

4.1.1. Miel cruda

30 kg de miel cruda fue adquirida directamente a un apicultor, habiendo transcurrido un periodo de dos meses desde el momento de su cata hasta la recepción de la misma en nuestro laboratorio. A esta partida de miel se le hizo un análisis melisopalinológico (Louveau, Maurizio & Vohwohl, 1978) y se tipificó como miel de “milflores” destacando la presencia de romero (*Rosmarinus officinalis*) y almendro (*Prunus sp.*).

4.1.2. Materiales de envase

Se hicieron inspecciones en diferentes cadenas de supermercados y puntos de venta de alimentos y productos apícolas con la finalidad de comprobar los materiales más utilizados en el envasado de la miel, observando que eran: vidrio, cerámica, tereftalato de polietileno (PET) y polipropileno (PP). Tras ello, se adquirieron envases de estos materiales con calidad alimentaria, de diferentes formatos con capacidad de 250 centímetros cúbicos.

4.1.3. Muestras de miel

A partir de la miel de “mil flores” adquirida, un total de 180 muestras de miel (12 muestras para cada de material de envase, almacenadas en 5 grupos, uno por cada periodo de tiempo de análisis y en 3 condiciones de almacenamiento diferentes) se prepararon con ayuda de espátula y balanza, pesándose para ello 200 g en cada envase de los anteriormente mencionados.

4.2. Condiciones experimentales

4.2.1. Condiciones de almacenamiento de las muestras

El número de muestras se distribuyeron en las tres condiciones de almacenamiento, haciendo análisis de todas las variables respuesta a los 15, 30, 45 y 60 días:

- **Temperatura:** 48 muestras se almacenaron en una estufa de incubación a 45 ± 1 °C.
- **Con iluminación:** 48 muestras se almacenaron en estantería con una luz incidente con intensidad de 1730 lux medidos con un Digital Illuminance Meter TES – 1334^a, a temperatura ambiente (20 ± 5 °C).
- **Sin iluminación:** 48 muestras se almacenaron en ausencia de luminosidad, a temperatura ambiente (20 ± 5 °C).

Para este estudio se determinó la configuración del diseño experimental definiendo factores, niveles y variables respuesta. Se optimizó la selección de variables para reducir el número e identificar las que afectan la calidad de la miel durante el almacenamiento (Tabla 9).

Tabla 9. Elementos del experimento

Factores	Niveles	Variables Respuesta
Condiciones de almacenamiento	Estufa de incubación a 45 ± 1 °C	<ul style="list-style-type: none"> • Hidroximetilfurfural • Color • pH • Acidez • Actividad Diastasa • Actividad Invertasa • Fenoles Totales • Flavonoides Totales • Actividad Antioxidante
	Con iluminación a 20 ± 5 °C	
	Sin iluminación a 20 ± 5 °C	
Materiales de envase	Vidrio	
	Cerámica	
	Tereftalato de polietileno (PET)	
Tiempo de almacenamiento (Días)	Polipropileno (PP)	
	0, 15, 30, 45 y 60	

- **Tratamientos:** corresponden a la combinación de las condiciones de almacenamiento (3), materiales de envase (4) y periodos de tiempo (5), en este caso fueron 60 tratamientos con tres repeticiones, para un total de 180 observaciones, por cada parámetro de calidad analizado.
- **Unidad experimental:** muestra de miel
- **Variables respuesta:** cada uno de los parámetros físico-químicos, enzimáticos y biológicos analizados.

4.3. Repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de análisis

En todos los casos se evaluaron los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad de los métodos de análisis. Los métodos armonizados de la Comisión Internacional de la Miel (Bogdanov, 2002), define los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad de la siguiente manera:

- **Repetibilidad:** diferencia entre los resultados de dos determinaciones obtenidos sucesivamente, mediante el mismo método, los mismos materiales y mismas condiciones (operador, aparatos, laboratorio), sin exceder de los valores señalados en las tablas de precisión. Se ha realizado un total de 10 ensayos para cada uno de los parámetros físico – químicos, enzimáticos y biológicos sobre la miel.
- **Reproducibilidad:** diferencia entre los resultados de dos determinaciones independientes obtenidas por el mismo método, los mismos materiales y diferentes condiciones (operador, aparatos, laboratorio), sin exceder de los valores señalados en las tablas de precisión. Para el estudio de reproducibilidad, los análisis se han realizado 3 días distintos, en dos semanas diferentes.

4.4. Metodología – Parámetros físico-químicos

4.4.1. Hidroximetilfurfural (HMF)

4.4.1.1. Principio

Tras clarificación de la muestra, el contenido de hidroximetilfurfural se determina espectrofotométricamente calculándose la diferencia de absorción frente a un blanco de referencia, en el que la absorbancia debida al cromóforo de HMF ha sido eliminada por adición de bisulfito sódico (Frías et al., 1992). Se aplicó el método propuesto por White en 1979, que es el oficial descrito en la legislación española (Orden de 12 de Junio de 1986).

4.4.1.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Espátulas
- Vaso de precipitados de 100 ml
- Varillas de vidrio
- Pipetas de 1, 5 y 25 ml
- Matraces aforados de 50 ml
- Erlenmeyers de 100 ml
- Embudos de vidrio de 7 cm de diámetro
- Filtros Whatman nº 40 de 15 cm de diámetro
- Tubos de ensayo de 18 X 150 mm
- Cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz
- Pipetas Pasteur con chupete

Reactivos y soluciones

- **Solución de Carrez I:** disolver 15 g de ferrocianuro de potasio trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$), en agua destilada, enrasando hasta 100 ml en matraz aforado.
- **Solución de Carrez II:** disolver 30 g de acetato de zinc dihidratado ($Zn(AcO)_2 \cdot 2H_2O$) en agua destilada, enrasando hasta 100 ml en matraz aforado.
- **Solución de sulfito ácido de sodio al 0.20 por 100:** disolver 0.20 g de sulfito ácido de sodio ($NaHSO_3$) en agua destilada, enrasando hasta 100 ml en matraz aforado.
- Etanol 96% v/v Panreac Química S.A. grado HPLC (España)
- Agua destilada

Equipos

- Espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Helios λ doble haz UV-VIS
- Balanza analítica monoplato Sartorius A200 S (Alemania), con precisión de 0,00001g
- Rotatubos IKA MS2 Minisharker

4.4.1.3. Descripción del método

- Pesar con precisión de 1mg, 5 g de miel que no haya sido calentada y disolverla con 25 ml de agua destilada en vaso de precipitados de 100 ml.
- Transferir la solución a un matraz aforado de 50 ml.
- Añadir 0.5 ml de solución de Carrez I, agitar y añadir 0.5 ml de Solución de Carrez II (adicionar una gota de etanol para eliminar la espuma).
- Mezclar y diluir hasta enrase con agua destilada.

- En un erlenmeyer de 100 ml poner un embudo con papel de filtro Whatman nº 40, depositando allí la solución de miel. Desechar los primeros 10 ml de filtrado.
- En sendos tubos de ensayo, depositar 5 ml del filtrado (tubo muestra y tubo referencia).
- Agregar a uno de los tubos, 5 ml de agua (muestra) y al otro 5 ml de la solución de sulfito ácido de sodio 0,2 % (referencia).
- Mezclar bien y determinar mediante espectrofotómetro la absorbancia de la solución muestra frente a la de referencia a 284 nm y a 336 nm, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz, en un tiempo inferior a 1 hora. Si la absorbancia a 284 nm excede de 0.6, diluir la solución muestra con agua y la solución referencia con solución de sulfito ácido de sodio 0,2 % y leer nuevamente la absorbancia. El contenido de HMF se expresa en mg/kg de miel, para ello se hará el siguiente cálculo:

$$\text{HMF (mg/kg)} = A_{284} - A_{336} \times 149,7 \times 5 \times D/P$$

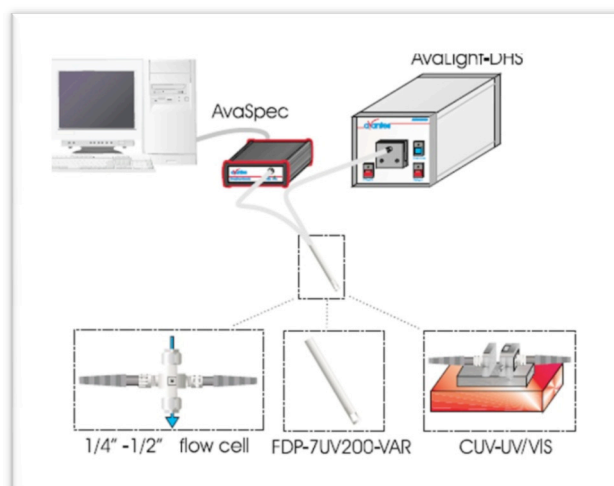
P = peso en gramos de la muestra

D (dilución) = Volumen final de la muestra / 10

4.4.2. Color

4.4.2.1. Principio

No existe metodología oficial de medida de color para la miel. Se ha utilizado un método espectrofotométrico basado en



la medida parcial o total del espectro de transmitancia y/o absorbancia que presenta la miel en el espectro visible. El color se ha determinado en el espacio CIELAB a partir de la medida del espectro de transmitancia en el visible, aplicando la metodología recomendada por la Commission Internationale de L'Éclairage (CIE) (CIE, 1986; Negueruela & Pérez-Arquillué, 2000).

4.4.2.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Espátulas
- Cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz
- Parafilm y tijeras

Equipos

- Espectrofotómetro Avantes (Holanda) AvaSpec 1024 UV-Vis-Nir. Intervalo de medida 200 -1100 nm, resolución 2 nm.
- Estufa de incubación Heraeus (Alemania)

4.4.2.3. Descripción del método

Las muestras, previamente homogeneizadas, son depositadas mediante espátula en cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz. Aquellas muestras que se hallaban en estado sólido, fueron selladas con para film y llevadas a una estufa de incubación a 40 °C el tiempo suficiente para alcanzar su licuación. Posteriormente se realizó la medida de los espectros en un espectrofotómetro a temperatura ambiente. La medida del color está relacionada con sus coordenadas (L^* , a^* , b^* , C^* y h_{ab}^*) del espacio CIELAB (CIE, 1986). L^* , a^* , b^* son coordenadas rectangulares y L^* , C^* y h_{ab}^* son coordenadas cilíndricas de dicho espacio.

Según Lomas (1996), las magnitudes relacionadas con la respuesta visual son:

- **L*** denominada **claridad**, se define como la luminosidad de una superficie comparada con la de otra que parece blanca o posee una transmitancia elevada y está iluminada de idéntico modo, toma valores de 0 a 100.
- **C*** llamada **croma**, es la cromaticidad de una superficie comparada con la de otra iluminada del mismo modo, que parece blanca o que tiene una transmitancia elevada, que varía de 0 a 200.
- **h_{ab}*** denominada **tono**, es el atributo de una sensación visual según el cual una superficie parece ser semejante a uno de los colores percibidos: rojo, amarillo, verde o azul, o a una combinación de dos de ellos consecutivos, que varía de 0 a 360.
- **a*** representa la oposición visual rojo – verde.
- **b*** representa la oposición visual amarillo – azul.

Si consideramos las coordenadas rectangulares L^* , a^* y b^* , la *diferencia de color* entre dos colores se calcula mediante la expresión ΔE^*_{ab} . Esta diferencia se mide en unidades CIELAB y representa la capacidad que tiene el ojo de discriminar dos colores contiguos cuando su diferencia de color mayor o igual a la unidad.

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Las medidas de color de las muestras se realizaron en el espectrofotómetro, entre 380 y 780 nm, cada 1 nm, utilizando cubetas de 1 cm de espesor óptico, con iluminante D65 y el observador patrón CIE64, de 10° en la determinación del color según el método de la CIE.

4.4.3. pH

4.4.3.1. Principio

La determinación de pH se realiza midiendo el potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio usando como referencia un electrodo de calomelanos. Este potencial es función de la actividad de los protones existentes a ambos lados de la membrana (Orden de 12 de Junio de 1986).

4.4.3.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Espátulas
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitados de 250 ml

Equipos

- Balanza analítica monoplato Sartorius (Alemania) A200 S, con precisión de 0,0001g
- pH metro Jenway (Gran Bretaña) 3305

4.4.3.3. Descripción del método

- Pesar 10 g de miel en un vaso de precipitados de 100 ml y mediante varilla de vidrio, disolver la muestra con 75 ml de agua destilada exenta de dióxido de carbono, para lo cual se ha desgasificado previamente mediante ebullición. Introducir los electrodos del pH metro y realizar la medida.

4.4.4. Acidez libre, láctónica y total

4.4.4.1. Principio

La acidez libre se determina por valoración potenciométrica con álcali hasta pH 8,5 y la acidez láctónica por valoración de retroceso tras la adición de un exceso conocido de base. La acidez total es la suma de ambas. Método oficial de análisis para la miel (Orden de 12 de Junio de 1986).

4.4.4.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Espátulas
- Varillas
- Vasos de precipitados de 250 ml
- Pipetas de 10 ml
- Imanes de agitación

Reactivos y soluciones

- Hidróxido de sodio 1 N Panreac (España)
- Solución de hidróxido de sodio 0,05 N preparada a partir de 1 N
- Ácido clorhídrico 0,1 N Panreac (España)
- Solución de ácido clorhídrico 0,05 N, preparada a partir de 0,1 N
- Agua destilada desgasificada

Equipos

- pH metro Jenway (Gran Bretaña) 3305
- Buretas digitales Brand (Alemania) de 25 ml
- Agitador Selecta (España) Agimatic-S

- Balanza analítica monoplato Sartorius (Alemania) A200 S, con precisión de 0,00001g
- Baño ultrasónicos, Selecta (España)

4.4.4.3. Descripción del método

- Pesar 10 g de miel en un vaso de precipitados de 100 ml y mediante varilla de vidrio, disolver la muestra con 75 ml de agua destilada exenta de dióxido de carbono para lo cual se ha desgasificado previamente mediante ebullición.
- Sumergir en esta disolución los electrodos del pH metro, agitar con un agitador magnético y adicionar la solución de hidróxido de sodio 0,05N con una bureta automática a una velocidad de 5 ml/minuto. Detener la adición cuando el valor del pH sea 8,5.
- Añadir con una pipeta de 10 ml la misma disolución y sin pérdida de tiempo valorar por retroceso con la solución de ácido clorhídrico 0,05 N mediante bureta automática hasta llegar a un pH de 8,30.
- Efectuar un ensayo en blanco

Cálculos:

$$\text{Acidez libre (meq/kg)} = (V_b - V_o)N_b \times 1000/P$$

$$\text{Acidez láctica (meq/kg)} = (10N_b - V_a N_a) \times 1000/P$$

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

Siendo:

V_b = Volumen en mililitros de base consumidos hasta alcanzar pH 8,5

V_o = Volumen en mililitros de base consumidos por 75 mililitros de agua destilada para alcanzar pH 8,5

V_a = Volumen en mililitros de ácido gastado en la valoración por retroceso para alcanzar pH 8,3

N_b = Normalidad de la base

N_a = Normalidad del ácido

P = Peso en gramos de la muestra

4.5. Metodología - Actividad enzimática

4.5.1. Actividad diastasa

4.5.1.1. Principio

Se valora la velocidad de hidrólisis de una solución al 1 por 100 de almidón, por acción de las diastasas contenidas en una solución amortiguada de miel. El punto final de esta reacción se determina tomando muestras de la mezcla a diferentes intervalos de tiempo, midiendo la absorbancia a 660 nm. Es necesario primeramente preparar la solución de almidón y determinar su índice de azul para comprobar que ese almidón es válido para la técnica (Bogdanov, 2002).

4.5.1.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Vasos de precipitados de 100 y 250 ml
- Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml
- Probetas de 100 ml
- Matraces volumétricos de 50, 100, 500 y 1000 ml
- Tubos de ensayo 20x200 mm
- Tubos con codo (Soplado de vidrio, Universidad de Zaragoza)
- Cubetas de cuarzo de 1cm de paso de luz

- Frasco de 100 ml con tapón de rosca
- Espátulas
- Varillas de vidrio

Reactivos y soluciones

- Yodo Panreac (España)
- Yoduro de potasio Panreac (España)
- Acetato de sodio trihidratado (NaOAc.3H₂O) Panreac (España)
- Ácido acético glacial (HOAC) Panreac (España)
- Almidón de patata soluble Panreac (España)
- Almidón solución 2% Panreac (España)
- Ácido clorhídrico 1N Panreac (España)
- Cloruro de Sodio 1M Panreac (España)
- Yodo crudo QP Panreac (España)
- Yoduro de potasio PA-ACS-ISO Panreac (España)
- **Solución patrón de yodo (a):** disolver 8,80 g de yodo crudo en 30 – 40 ml de agua destilada que contenga 22 g de yoduro de potasio y diluir hasta 1 litro en matraz volumétrico.
- **Solución de yodo 0,02 N (b):** disolver 20 g de yoduro de potasio en 30 – 40 ml de agua destilada. Transvasar la solución a un matraz volumétrico de 500 ml, agregar 143 ml de la solución patrón de yodo (a), mezclar y enrasar con agua destilada (solución estable 24 horas).
- **Solución de yodo 0,0007N (c):** disolver 20 g de yoduro de potasio con 30 o 40 ml de agua destilada, añadir 5 ml de solución patrón de yodo (a) y diluir hasta 500 ml en matraz volumétrico (solución estable durante 48 horas).
- **Amortiguador de acetato pH 5.3 (1,59 M):** disolver 87 g de acetato de sodio trihidratado (NaOAc.3H₂O) en 400 ml de agua destilada, añadir 10,5 ml de ácido acético glacial (HOAC) en un poco de agua y completar hasta 500 ml en

el matraz volumétrico. Ajustar el pH a 5.3 con acetato de sodio o ácido acético según convenga, utilizando el pH-metro.

- **Solución de cloruro de sodio 0,5 M:** disolver 14,5 g de cloruro de sodio (NaCl) en agua destilada hervida y diluir hasta 500 ml en matraz volumétrico.
- Agua destilada

Equipos

- Baño termostático Panreac (España) Precistern, regulado a $40 \pm 0,2$ °C
- Espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Helios λ doble haz UV-VIS
- Balanza analítica monoplato Sartorius A200 S (Alemania), con precisión de 0,00001g
- Placa calefactora (Panreac) Selectemp
- Cronómetro

4.5.1.3. Descripción del método

- **Preparación de la solución de almidón:** en vaso de precipitados de 250 ml poner una pequeña cantidad de agua destilada (50 ml aproximadamente) y someter a ebullición en placa eléctrica. En el momento de ebullición del agua, retirar el vaso de la placa y añadir 2 g de almidón soluble anhidro (eliminar previamente la humedad por desecación a 130 °C), agitando vigorosamente con varilla de vidrio. La solución debe quedar transparente completamente, lo que indica la buena disolución del almidón. Dejar enfriar a unos 40° C. Trasvasar a un matraz volumétrico de 100 ml y enrasar con agua destilada. Guardar en un frasco de vidrio con tapón de rosca.
- **Determinación del índice azul:** debe utilizarse almidón soluble cuyo índice de azul se halle comprendido entre 0,50 y 0,55 valores de absorbancia, para

lo cual su determinación se realiza de la siguiente manera: disolver 1 g de almidón anhidro en unos 50 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 250 ml sometiendo la mezcla a ebullición (según el procedimiento anterior), enfriar la solución y añadir 2,5 ml de amortiguador de acetato y completar hasta 100 ml con agua destilada en matraz volumétrico.

Verter, en un matraz volumétrico de 100 ml: 75 ml de agua, 1 ml de ácido clorhídrico 1N y 1,5 ml de solución de yodo 0,02 N. Añadir 0,5 ml de solución de almidón y completar con agua destilada hasta enrase. Dejar reposar 1 hora en la oscuridad y leer después la absorbancia en espectrofotómetro a 600 nm, frente a un testigo que contenga todos los ingredientes anteriores, excepto la solución de almidón. La lectura de la absorbancia es el índice de azul que deberá estar comprendido entre 0,50 y 0,55.

- **Normalización de la solución de almidón:** calentar el frasco con la solución de almidón hasta 40 °C en un baño de agua. Mediante una pipeta tomar 5 ml de la solución de almidón calentada a 40° C, y depositarla en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm donde se añaden 10 ml de agua destilada a 40° C. Mezclar bien en un rotatubos. En un vaso de precipitados de 100 ml, depositar mediante una pipeta, 1 ml de la mezcla anterior y mezclar bien con 10 ml de solución de yodo 0'0007N diluida en 35 ml de agua destilada.
- Leer la absorbancia a 660 nm frente a un testigo de agua destilada.
- La absorbancia debe ser $0,760 \pm 0,020$. En caso necesario deberá ajustarse el volumen de agua añadido a la solución de yodo hasta obtener la absorbancia exacta (a mayor valor de absorbancia, menor cantidad de agua a añadir, y viceversa).

Preparación de la solución de miel

- Pesar con espátula 10,0 g de miel en un vaso de precipitados de 100 ml y disolverla con 20 ml de agua destilada.
- Añadir 5 ml de amortiguador de acetato y una vez disuelta perfectamente y amortiguada la muestra, añadir 3 ml de cloruro de sodio 0.5 M.
- Transvasar a un matraz aforado de 50 ml y enrasar con agua destilada.

Determinación

- Depositar con pipeta y por duplicado, 10 ml de solución de miel en el codo de sendos tubos y colocarlos en baño maría a 40 °C, junto con el matraz que contiene la solución de almidón.
- A parte, preparar 4 vasos de precipitados de 100 ml, con 10 ml de solución de yodo 0,0007N en cada uno y el volumen de agua obtenido en la normalización del almidón. Introducir una varilla de vidrio
- Transcurridos 15 minutos, verter mediante pipeta 5 ml de agua (blanco) y 5 ml de la solución de almidón (problema), indistintamente, en los tubos de codo que contienen la solución de miel en la otra parte del tubo de codo que contiene la solución de miel.
- Mezclar bien y poner en marcha un cronómetro.
- Tomar 1ml de la solución blanco y verterlo en uno de los recipientes que contiene la solución de yodo, siendo éste el blanco de lectura.
- A intervalos de 5 minutos, sacar porciones de 1ml de la solución problema y verterlas sucesivamente en los recipientes preparados anteriormente. Mezclar bien.
- Determinar inmediatamente en el espectrofotómetro la absorbancia a 660 nm frente al blanco de lectura.
- Seguir tomando porciones de 1 ml a intervalos conocidos de tiempo hasta lograr una absorbancia de 0,235.

Absorbancia Tras 5 minutos de hidrólisis	Tiempo Aproximado en minutos
0	30 o más
0,65	25 – 30
0,60	16 – 20
0,55	13 – 15
0,50	11 – 12
0,45	9 – 10
0,40	8 – 9

Cálculos y expresión de resultados

- Representar gráficamente la absorbancia en función del tiempo (minutos)
- Ajustar la recta
- Determinar el tiempo (t) en que la mezcla alcanza la absorbancia de 0,235

$$\text{Índice de diastasa (ID)} = (300/t)$$

t = tiempo en minutos transcurrido

ID = Índice de diastasa de la escala Schade = Actividad de la diastasa en 1 ml de solución de almidón al 1 por 100 hidrolizada por el enzima contenido en 1 g de miel en una hora a 40° C.

Cuando la muestra indique un ID > 35, sólo es necesaria una lectura a los 5 minutos, si se toma suficientemente pronto otra muestra que dé una absorbancia de 0,20. Si se desea un resultado más exacto debe repetirse la determinación tomando muestras cada minuto. En muestras con ID bajo, se pueden espaciar las lecturas teniendo en cuenta la tabla de aproximaciones.

4.5.2. Actividad invertasa

4.5.2.1. Principio

El p-nitrofenil α - D – glucopiranososa (pNPG) como sustrato adicionado a la muestra de miel, se desdobla en glucosa y p-nitrofenol por acción de la α -

glucosidasa. Ajustando el pH a 9.5, la reacción enzimática se detiene y el nitrofenolato se transforma en el anión nitrofenol, que representa la cantidad de sustrato convertido, el cual se valora espectrofotométricamente a 400 nm (Bogdanov, 2006).

4.5.2.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Tubos de ensayo 20 x 200 mm
- Matraces volumétricos de 25, 100 y 500 ml
- Pipetas de 1 y 5 ml
- Vasos de precipitados de 100 ml
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz
- Varillas de vidrio

Reactivos y soluciones

- Fosfato ácido de potasio Panreac (España)
- Fosfato ácido de sodio Panreac (España)
- p-nitrofenil α - D – glucopiranososa Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- tris-hidroximetil aminometano Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Ácido clorhídrico 3M Panreac (España)
- **Solución Buffer 0.1 M pH 6:** disolver 5,830 g de fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) y 1,280 g de fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4), diluir con agua destilada y enrasar hasta 500 ml en matraz volumétrico.
- **Solución de Sustrato p-nitrofenil α - D – glucopiranososa (pNPG) – (0,02M):** disolver 0,603 g de pNPG en solución buffer hasta completar 100 ml en matraz volumétrico. El pNPG es poco soluble en agua y además es poco estable (almacenamiento en recipiente oscuro y refrigeración hasta un mes).

La solución se prepara calentando a temperatura inferior a 60 °C y debe enfriarse por completo.

- **Solución para detención de la reacción 3M pH 9,5:** disolver 9,05 g de tris-hidroximetil aminometano con agua destilada y enrasar hasta 25 ml en matraz volumétrico. Ajustar el pH a 9,5 con HCl 3M.

Equipos

- Espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Helios λ doble haz UV-VIS
- Baño termostático Panreac (España) Precistern, regulado a $40 \pm 0,2$ °C
- Rotatubos IKA MS2 Minisharker
- pH metro Jenway (Gran Bretaña) 3305

4.5.2.3. Descripción del método

- Pesar 5 g de miel en un vaso de precipitados de 100 ml, añadir unos mililitros de solución buffer y homogeneizar con varilla de vidrio.
- Llevar a un matraz volumétrico de 25 ml y enrasar con la solución buffer (se puede guardar en refrigeración hasta un día).
- Depositar 5 ml de solución substrato mediante pipeta en sendos tubos de ensayo (muestra y blanco), llevándolos a baño de agua a 40 °C durante 5 minutos.
- Adicionar 0,5 ml de solución de miel al tubo muestra y 0,5 ml de la solución detención de la reacción al tubo blanco, homogeneizar con rotatubos y mediante cronómetro iniciar el control de tiempo.
- En el tiempo 0, al tubo blanco se le adiciona 0,5 ml de la solución de miel y se homogeneiza mediante rotatubos.
- El tubo muestra se incuba a 40 °C durante 20 minutos en un baño, añadiendo seguidamente 0,5 ml de la solución que detiene la reacción.

Volver a homogeneizar en rotatubos y enfriar rápidamente (agua de grifo o hielo) hasta temperatura ambiente.

- Lectura espectrofotométrica a 400 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz, de la muestra frente al blanco, que debe realizarse entre 15 minutos y 1 hora como máximo.

Cálculos y expresión de los resultados

La cantidad de p-nitrofenil α -D – glucopiranososa (pNPG) expresada en μM que se produce durante la prueba, corresponde exactamente a la cantidad de μM de sustrato utilizado. Por lo tanto, la actividad invertasa en miel puede calcularse con la diferencia de medidas de absorbancia a 400 nm e indicarse en **Unidades/kg (U/kg)**.

$$1 \text{ U/kg} = (1 \mu\text{M p-NPG})/(\text{minutos} \times \text{kg miel})$$

$$\text{Invertasa en U/kg} = 6 \times 0,05 \times 0,05298 \times 104 \times \Delta A_{400}$$

$$\text{Invertasa en U/kg} = 158,94 \times \Delta A_{400}$$

Donde:

6 = factor para expresar los mililitros de solución muestra utilizados.

0,05 = factor de conversión del tiempo de reacción, de 20 minutos a 1 minuto.

104 = factor de conversión de la cantidad de miel en la muestra (0.1 g en 0.5 ml) a 1 kg

0,05298 = $7.37/139.11$; factor de conversión para llevar de μg hasta μM por ml.

Donde 7,37 = factor para el p-nitrofenol del gráfico correspondiente.

139,11 = peso molecular del p-nitrofenol.

La actividad invertasa se puede expresar como *Número de Invertasa (IN)* que representa los gramos de sacarosa hidrolizada en 1 hora por los enzimas contenidos en 100 gramos de miel bajo las condiciones del test (Bogdanov,

2006; Hadorn & Zürcher., 1966). Si la actividad invertasa se determina simultáneamente por el método descrito anteriormente y por el método polarimétrico de Hadorn, la siguiente relación entre IN y ΔA_{400} resulta:

$$\text{IN} = 21,64 \times \Delta A_{400}$$

21,64 = pendiente de la regresión lineal de IN (eje de las y) y ΔA_{400} (eje de las x).

4.6. Metodología - Sustancias bioactivas y actividad antioxidante

4.6.1. Fenoles totales

4.6.1.1. Principio

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en miel se ha realizado mediante el método de Folin-Ciocalteu, método espectrofotométrico que consiste en hacer la curva de calibración de un compuesto fenólico puro (ácido caféico) y cuantificar el contenido de compuestos fenólicos de la muestra de miel midiendo la absorbancia de los mismos después de una reacción colorimétrica (Meda et al., 2005; Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos, 1999).

4.6.1.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Espátula
- Vasos de precipitados de 100 ml
- Matraces aforados de 25, 50 y 100 ml
- Embudos de 7 cm de diámetro
- Matraces Erlenmeyers de 250 ml

- Tubos de ensayo Pyrex de 20 x 100 mm con tapón de rosca
- Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml
- Cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz
- Varillas de vidrio
- Papel de filtro Whatman No.1
- Zapatilla

Reactivos y soluciones

- Reactivo Folin-Ciocalteu Panreac (España)
- Solución acuosa de Folin-Ciocalteu 0,2 N , preparado a partir del reactivo Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) Panreac (España)
- Solución de carbonato de sodio: pesar 7,5 g de carbonato de sodio, disolver y enrasar con agua destilada hasta 100 ml en matraz volumétrico.
- Ácido caféico Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Metanol Lab Scan grado HPLC (Irlanda)
- Agua destilada

Equipos

- Balanza analítica monoplato Sartorius A200 S (Alemania), con precisión de 0,00001g
- Rotatubos IKA MS2 Minisharker
- Espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Helios λ doble haz UV-VIS
- Baño de ultrasonidos Selecta (España)

4.6.1.3. Descripción del método

El método consta de 3 fases:

1ª Fase de preparación de la muestra, del blanco y de los patrones

2ª Fase de reacción e incubación en condiciones de oscuridad

3ª Fase de lectura en espectrofotómetro.

1ª Fase: preparación de la muestra, del blanco y de los patrones

Preparación de la muestra

- Se pesan 5 g de miel en un vaso de precipitados de 100 ml, se añaden unos 10 ml de agua destilada y se remueve con una varilla de vidrio hasta disolver la muestra. Después se transfiere la solución a un matraz volumétrico de 50 ml y se añade agua destilada hasta enrasar.
- Se filtra el contenido del matraz aforado a través de un papel Whatman No.1 en un erlenmeyer de 250 ml con la ayuda de un embudo de 7 cm de diámetro.
- En un tubo de ensayo con tapón de rosca se depositan: 0.5 ml del filtrado y 2.5 ml de la solución 0,2 N del reactivo Folin-Ciocalteu. Se homogeneiza en rotatubos.

Preparación del blanco

- En un tubo de ensayo con tapón de rosca se depositan: 0.5 ml de metanol y 2.5 ml de la solución 0,2N del reactivo Folin-Ciocalteu, mezclando bien en el rotatubos

Preparación de las Soluciones Patrón

Para estimar la concentración de compuestos fenólicos presentes en la muestra, debe realizarse una recta de calibrado con soluciones patrón de concentración conocida y luego interpolar los resultados experimentales utilizando la ecuación de la recta de calibración. El patrón que se utiliza es ácido caféico. Por tanto, la concentración estimada de compuestos fenólicos en la muestra se expresa

como mg de ácido caféico / 100 g de miel. Primero se prepara la disolución madre y a partir de ella, los patrones.

Disolución madre (200 µg/ml): con ayuda de una zapatilla pesar 0,0270 g de ácido caféico, y diluir con metanol hasta 100 ml en matraz volumétrico. En matraces volumétricos de 25 ml y enrasando con metanol, preparar las soluciones patrón con los volúmenes que a continuación se detallan, tomados a partir de la disolución madre.

80 µg/ml: tomar 10 ml.

40 µg/ml: tomar 5 ml.

20 µg/ml: tomar 2,5 ml.

10 µg/ml: tomar 1,25 ml.

5 µg/ml: tomar 0,625 ml.

Preparadas las soluciones de patrones, se toman 0,5 ml de cada una de ellas con una pipeta de 1 ml y se depositan en sendos tubos de ensayo con tapón de rosca. A cada tubo se le añaden 2.5 ml de la solución 0,2N del reactivo Folin-Ciocalteu y se homogeneiza bien en el rotatubos.

2ª Fase: reacción e incubación: la muestra, blanco y patrones, se dejan en reposo durante 5 minutos y seguidamente se añade 2 ml de la solución de carbonato de sodio a cada uno de los tubos, se homogeneiza en rotatubos y se lleva a incubar durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente.

3ª Fase: lectura espectrofotométrica: se procede a la determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos mediante el protocolo que a continuación se detalla.

Lectura de la absorbancia con espectrofotómetro

- Llenar una cubeta de cuarzo de 1 cm paso luz con la solución blanco y hacer una lectura de la absorbancia a 760 nm, poniendo el espectrofotómetro a cero.
- Realizar una curva de calibración usando ácido caféico como estándar. Para ello se miden sus valores de absorbancia a 760 nm. Con estos valores se hace una gráfica de absorbancia a 760 nm frente a concentración del ácido caféico obteniendo la curva de calibración.
- Se deposita la muestra en una cubeta de cuarzo de 1 cm paso luz y se mide su absorbancia a 760 nm.
- Interpolar en la curva de calibración el valor de absorbancia de la muestra, obteniendo así el contenido en compuestos fenólicos totales expresados en mg de equivalentes de ácido caféico / 100 g de miel.

4.6.2. Flavonoides totales

4.6.2.1. Principio

La determinación del contenido de flavonoides totales en miel se ha realizado mediante el método del tricloruro de aluminio. Este reactivo, reacciona con los flavonoides formando un color amarillo que varía su intensidad de acuerdo con el contenido global de flavonoides que tenga la muestra. Para hacer la cuantificación se realiza una medida espectrofotométrica de la muestra y de unas soluciones patrón para elaborar una curva de calibración, utilizando como sustancia de referencia la quercetina, un flavonol que se encuentra libre o como glicósido en las mieles, método aplicado (Meda et al., 2005; Romero, 2006).

4.6.2.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Espátulas
- Vasos de precipitados de 100 ml
- Matraces volumétricos de 25 ml
- Pipetas de 1 ml y 5 ml
- Micropipeta LABMATE+ 100-10000 μ l
- Tubos de ensayo Pyrex 20x100 mm con tapón de rosca
- Cubetas de cuarzo de 1 cm paso luz
- Varillas de vidrio

Reactivos y soluciones

- Aluminio Cloruro anhidro, 98% PS Panreac
- Metanol Lab Scan grado HPLC (Irlanda)
- Quercetina dihidrato, Sigma Q0125-25G
- Agua destilada

Equipos

- Balanza analítica monoplato Sartorius A200 S (Alemania), con precisión de 0,0001g
- Rotatubos IKA MS2 Minisharker
- Espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Helios λ doble haz UV-VIS

4.6.2.3. Descripción del método

Preparación de la solución de miel

- Preparar una solución de miel 10% p/v, para ello, en un vaso de precipitados de 100 ml se pesan 5,0 g de miel, se añaden unos 10 ml de agua destilada y

se remueve con una varilla de vidrio hasta disolver la muestra. Después se transfiere a un matraz volumétrico de 50 ml y se añade agua destilada hasta enrasar.

- Se filtra la solución a través de un papel Whatman No.1 a un erlenmeyer de 250 ml con la ayuda de un embudo de 7 cm de diámetro.

Preparación de la solución de AlCl_3 en metanol

En un vaso de precipitados de 100 ml, se pesan 0,1 g de AlCl_3 , se añaden unos 10 ml de metanol y se remueve con una varilla de vidrio hasta disolver la muestra. Después se transfiere a un matraz volumétrico de 100 ml y se añade metanol hasta enrasar.

Preparación del blanco

En un tubo de ensayo se depositan 1 ml de agua destilada y 9 ml de metanol. Se homogeneiza en un rotatubos.

Preparación de la solución madre y de las soluciones patrón

Para estimar la concentración de flavonoides totales presentes en la muestra, debe realizarse una recta de calibrado con soluciones patrón de concentración conocida y así poder interpolar los resultados de la muestra en esa recta. El patrón que se utiliza es la quercetina. Las soluciones patrón en metanol deben estar en el rango de 0 – 10 mg/l.

Se realizará el promedio de tres lecturas consecutivas de la muestra, expresadas en mg quercetina (QE)/100 g de miel.

Solución madre (200 $\mu\text{g/ml}$): en una zapatilla pesar 0,0204 g de quercetina, transvasar a un matraz volumétrico de 100 ml y enrasar con metanol.

Soluciones patrón: en matraces volumétricos de 25 ml y enrasando con metanol, mediante micropipeta preparar las siguientes soluciones, tomando a partir de la solución madre los siguientes volúmenes:

12 µg/ml: se toman 1,5 ml

8 µg/ml: se toma 1 ml

6 µg/ml: se toman 750 µl

4 µg/ml: se toman 500 µl

2 µg/ml: se toman 250 µl

- **Determinación colorimétrica de los flavonoides totales:** necesitaremos preparar “tubos patrón”, “tubo muestra” y “tubo blanco”. Para los “tubo patrón”, en sendos tubos de ensayo: 1 ml de solución patrón + 1 ml de AlCl_3 + 8 ml de metanol; para “tubo muestra”: 1 ml de la solución de miel + 1 ml de AlCl_3 + 8 ml de metanol y para el “tubo blanco”: 1 ml de agua destilada + 9 ml de metanol.

Lectura de la absorbancia con espectrofotómetro

- Llenar una cubeta de cuarzo de 1 cm paso de luz con la solución blanco y hacer una lectura de la absorbancia a 415 nm poniendo el espectrofotómetro a cero.
- Realizar la medida de absorbancia a 415 nm de cada “tubo patrón” para así elaborar una curva de calibración.
- Medir la absorbancia de la muestra a 415 nm.
- Con ayuda de la ecuación de la recta de calibración interpolar el valor de absorbancia obtenido para la muestra, obteniendo así el contenido de flavonoides totales expresados en mg de quercetina /100g de miel.

4.6.3. Actividad antioxidante

4.6.3.1. Principio

La determinación de la Actividad Antioxidante se ha realizado utilizando el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), técnica que se basa en la monitorización de la peroxidación inducida por un compuesto azo, generador de radicales peroxilo (2,2' - azobis (2 – amidinopropano), (Abap)), mediante medida de la pérdida de fluorescencia de un sustrato proteico fluorescente (ficoeritrina), a medida que éste se oxida. Metodología según (Beretta et al., 2005; Cao, HM & Cutler, 1993; Cao, Verdon, Wu, Wang & Prior, 1995).

4.6.3.2. Material, reactivos y equipos

Material

- Cubetas de fluorescencia de plástico de 1 cm y capacidad 3 ml
- Micropipeta LABMATE⁺ 100 -1000 µl
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Tubos de ensayo de 16 x 160 mm
- Rotatubos IKA MS2 Minisharker
- Zapatilla

Reactivos

- Fluoresceína sódica Sigma F6377-100G
- Tampón fosfato pH 7.4
- Agua miliQ
- ABAP: 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride Wako Pure Chemical Industries, Ltd
- (R)-Trolox[®] methyl ether (Sigma)

Equipos

- Balanza analítica monoplato Sartorius A200 S (Alemania), con precisión de 0,0001g
- Rotatubos IKA MS2 Minisharker
- Espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse

4.6.3.3. Descripción del método

- **Preparación de la solución de miel:** preparar una solución acuosa de miel que tenga una concentración de 1:10 (p/v), para lo cual se pesa 1 g de miel en un vaso de precipitados con 5 ml de agua miliQ, se homogeneiza con varilla de vidrio y se transvasa a un matraz volumétrico de 10 ml.
- **Preparación de los reactivos.**
 - **Tampón fosfato pH 7.4:** pesar en un vaso de precipitados de 250 ml, 1.043 g de KH_2PO_4 y 2.686 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, añadir unos 50 ml de agua miliQ y ajustar a pH 7.4. Enrasar en matraz volumétrico de 100 ml.
 - **Fluoresceína (concentración en la cubeta: 6×10^{-8} M)**

Disolución madre: Pesar en vaso de precipitados de 50 ml, 0.039 g de fluoresceína, disolver con 10 ml de tampón fosfato de pH 7,4 y luego enrasar en un matraz volumétrico hasta 25 ml con tampón fosfato pH 7.4. Esta solución se puede conservar a 4°C y oscuridad durante varios meses.
 - **Disolución de trabajo**

La disolución de trabajo es la dilución 1/1000 obtenida de la disolución madre, en tubos Ependorf de 1.5 ml de la siguiente manera:

Dilución 1/10: 100 μl de la disolución madre + 900 μl tampón fosfato pH 7.4

Dilución 1/100: 100 μ l de la disolución 1/10 + 900 μ l tampón fosfato pH 7.4

Dilución 1/1000: 100 μ l de la disolución 1/100 + 900 μ l tampón fosfato pH 7.4

- **Disolución ABAP (concentración en la cubeta: 8.75 mM)**

Pesar en un tubo Eppendorf 0,1 g ABAP y agregar con micropipeta 100 μ l de tampón fosfato pH 7.4, disolver completamente con ayuda del rotatubos. Esta disolución se puede conservar en hielo hasta 8 horas antes de su uso.

- **Disolución de Trolox**

Disolución madre 0.02 M: 0.1256 g de Trolox se pesa en una zapatilla y con tampón fosfato pH 7.4 se lleva a un matraz volumétrico de 25 ml, enrasándose. Para obtener la disolución de trabajo 1/100, se realizan dos diluciones decimales en tubos Eppendorf de 1.5 ml de la siguiente manera:

Dilución 1/10: 100 μ l dilución madre + 900 μ l tampón fosfato pH 7.4

Dilución 1/100: 100 μ l 1/10 + 900 μ l tampón fosfato pH 7.4

Preparación de las cubetas: añadir a la cubeta (volumen final 3ml), los siguientes reactivos para realizar una evaluación de la actividad antioxidante en miel:

- **Cubeta control**, no contiene Trolox (antioxidante de referencia).
- **Cubeta con Trolox 5,3 μ M**, utilizado como referencia en la cuantificación de la actividad antioxidante en unidades ORAC.
- **Cubeta muestra**, contiene la solución de miel.

Reactivo	Control	5,3 µM	Muestra
Fluoresceína	50 µl	50 µl	50 µl
Tampón fosfato pH 7.4	2875 µl	2795 µl	2775 µl
Trolox	-	80 µl (-2)	
Solución de miel			100 µl
ABAP	75 µl	75 µl	75 µl

Condiciones de programación del espectrofotómetro de fluorescencia:

Las condiciones de lectura:

λ excitación = 493 nm

Rendija de excitación = 10

λ emisión = 511 nm

Rendija de emisión = 5

Tiempo de reacción = 120 minutos

Etapas

- **Atemperar las muestras:** poner las muestras durante 15 minutos dentro del espectrofotómetro de fluorescencia para que alcancen 37 °C.
- **Adición del ABAP:** se añade cuando se ha alcanzado la una temperatura de 37 °C. Se homogeniza bien y en este momento se inicia el análisis.
- **Monitorizar la pérdida de fluorescencia en el espectrofotómetro de fluorescencia.**
- **Cuantificación de la actividad antioxidante en miel**

1 Unidad ORAC es equivalente al área neta de protección proporcionada por una concentración final de Trolox de 1 µM.

$$\text{ORAC}(1\text{g miel}) = \frac{(\text{Area Neta Muestra})}{(\text{Area Neta Trolox}/5,3\mu\text{M})} * \text{Factor de dilución}$$

4.7. Tratamiento estadístico de los resultados

Se ha realizado utilizando un *diseño factorial*, que permite el estudio simultáneo de los efectos de los factores (envases, almacenamiento y tiempo) sobre la variación de los parámetros de calidad considerados: HMF, pH, acidez (libre, láctica y total), color, actividad diastasa, actividad invertasa, contenido de compuestos fenólicos totales, contenido de compuestos flavonoides totales y actividad antioxidante. Dado que cada factor contempla diversos niveles, al hacer un análisis es más eficiente analizar todos los niveles de los factores de forma simultánea que variarlos de forma independiente.

El desarrollo de este experimento va a determinar si los materiales de envase, las condiciones y tiempo de almacenamiento influyen en la calidad físico-química y biológica de la miel, y para ello nos formulamos las siguientes cuestiones:

- ¿Los materiales de envase Vidrio, Cerámica, Tereftalato de polietileno (PET) y Polipropileno (PP) modifican la calidad físico-química y biológica de las muestras de miel almacenadas en el tiempo?
- ¿Con qué intensidad varía la calidad físico-química y biológica de las muestras de miel almacenadas según el material de envase?
- ¿Las interacciones de los materiales y las condiciones de almacenamiento en el tiempo, influyen en la calidad físico-química y biológica de las muestras de miel almacenadas?

Diseño factorial general completo

El diseño experimental corresponde a un *experimento factorial completo*, midiéndose las respuestas en todas las combinaciones de niveles de factores experimentales. Cada condición experimental es denominada un "*tratamiento*"

y la medición de la respuesta es denominada una "*observación*". La totalidad del conjunto de tratamientos es lo que se denomina el "*diseño*".

Modelo General Lineal

El *Modelo General Lineal* (GLM) es un procedimiento de Análisis de Varianza (ANOVA) para poder comparar los datos obtenidos en una amplia variedad de diseños experimentales. En este caso, las variables dependientes (parámetros físico-químicos y biológicos) están relacionadas linealmente con variables independientes (envases, almacenamiento y tiempo). Su relación funcional puede describirse como una generalización de la función de regresión muestral con el siguiente modelo:

$$\text{Parámetro físico-químico}_{ijk} = \mu + A_i + E_j + T_k + AE_{ij} + AT_{ik} + ET_{jk} + AET_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

μ = media general de las variables respuestas

A_i = efecto del nivel i de cada condición de almacenamiento (temperatura, luz y oscuridad)

E_j = efecto del nivel j de cada material de envase (Vidrio, Cerámica, PET y PP)

T_k = efecto del nivel k de cada tiempo en el que se efectuó el análisis (0, 15, 30, 45 y 60 días).

ϵ_{ijk} = error

$i = 1:3; j = 1:4; k = 1:5$

Los datos del experimento se trataron conforme al *diseño experimental completamente regido al azar* (DCA) (Romagosa, 2005), mediante un diseño factorial 3 x 4 x 5 (condiciones de almacenamiento, materiales de envase y tiempo) y con tres repeticiones. Este diseño permite comparar los tratamientos entre sí.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete *Minitab 15* (© 2007 Minitab Inc.), para realizar comparación de diferencias estadísticas (ANOVA). Las diferencias entre los tratamientos individuales se estudiaron mediante una *Prueba de Comparaciones Factoriales*, (Anexo).

Para hacer un análisis de medias que cumpla con las condiciones de independencia de los datos, normalidad y homoscedasticidad, se hizo necesario organizar los datos en tres matrices con arreglo factorial 4 X 5 para así poder evaluar la influencia de los materiales de envase y el tiempo en cada una de las condiciones de almacenamiento.

Gráfica de efectos principales: la gráfica indica la media de la respuesta para cada nivel de la variable analizada, luego conecta los puntos para cada factor. Para determinar si está presente un efecto principal o no, observe las líneas que conectan los niveles de factores, para factores que son significativos según la tabla de análisis de varianza existe un efecto principal cuando el cambio en la respuesta media a través de los niveles de un factor es significativo.

- Cuando la línea es horizontal (paralela al eje x), entonces, no hay efecto principal presente. Cada nivel del factor afecta la respuesta de la misma manera y la media de respuesta es la misma para todos los niveles de factores.
- Cuando la línea no es horizontal (paralela al eje X), entonces está presente un efecto principal. Los diferentes niveles del factor afectan la respuesta de manera diferente. Mientras mayor sea la diferencia en la posición vertical de los puntos graficados (menos paralela al eje X esté la línea), mayor será la magnitud del efecto principal.

- Al comparar las pendientes de las líneas, usted puede comparar la magnitud relativa de los efectos del factor.

Gráfica de interacción: se utiliza generalmente en combinación con un análisis de varianza, la gráfica muestra la interacción entre dos factores y se interpreta observando las líneas para determinar si hay o no una interacción:

- Si las líneas son paralelas, no hay ninguna interacción y mientras más lejos están las líneas de ser paralelas, mayor es el grado de interacción entre los factores analizados.

Resultados y discusión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, para los parámetros físico-químicos y enzimáticos se han utilizado metodologías publicadas en los métodos oficiales de análisis para la calidad de la miel en España (Orden de 12 de Junio de 1986) y en los Métodos Armonizados de la Comisión Internacional de la Miel (Bogdanov, 2002), en todos los casos los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad de los métodos se encuentran dentro del límite recomendado en el estudio interlaboratorio realizado por la Comisión Internacional de la Miel (Bogdanov, 2002).

Los resultados para la repetibilidad del método utilizado en la medida de color muestra coeficientes de variación (CV%) entre 0,9 - 1,7 % para L*, entre 1,5 - 2,5 % para a*, entre 1,4 - 1,8 % para b*, entre 1,4 - 1,7 % para C* y entre 0,15 - 0,21 % para h_{ab}*. En la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales el coeficiente de variación (CV%) estuvo entre 2,3 - 3,2%, para el contenido de flavonoides totales estuvo entre 4,1 - 6,9% y para la actividad entre 3,6 - 4,3%.

En el caso de la reproducibilidad del método de medida de color tuvo un coeficiente de variación (CV%) de 2% para L*, 1,75% para a*, 1,47% para b*, 1,51% para C* y 1% para h_{ab}*. En la determinación de compuestos fenólicos totales el coeficiente de variación (CV%) fue 3,64%, en la determinación de flavonoides totales fue 7,21% y en la determinación de la actividad antioxidante fue 5%.

A continuación se analiza la influencia de los materiales de envase, la temperatura y la iluminación sobre las muestras de miel, pudiéndose destacar, que en líneas generales, las condiciones de almacenamiento influyen de forma

diferente sobre cada uno de los parámetros físico-químicos y biológicos contemplados en este estudio.

5.1. Influencia de los materiales de envase

No hay estudios científicos que realicen una comparación entre los distintos tipos de material de envase y su influencia sobre la calidad de la miel, únicamente Jiménez et al. (1994) trabajan sobre material de vidrio y Wang et al. (2004) estudian la influencia del efecto del vidrio y plástico sobre los compuestos fenólicos totales, HMF y la actividad antioxidante de la miel.

5.1.1. Contenido de HMF

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza, para todos los casos indicando si hay o no significancia estadística con cada uno de los factores o su interacción.

Tabla 10. Influencia de los materiales de envase y el tiempo de almacenamiento en el contenido de HMF

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	NS	*	NS
Tiempo	**	**	**
Envases * Tiempo	**	NS	NS

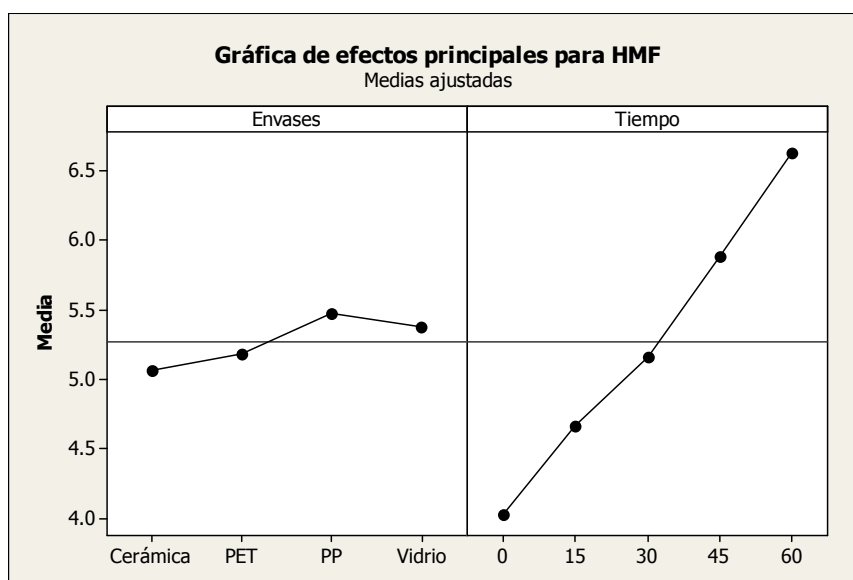
NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias significativas (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

Las muestras de miel almacenadas a 45 ± 1 °C no tienen diferencias significativas estadísticamente por influencia del material de envase, pero sufren fuertes cambios en el contenido de HMF a lo largo del almacenamiento, influenciados principalmente por el factor tiempo y la interacción de los factores Envases*Tiempo (p<0,01).

Las muestras almacenadas con iluminación a 20 ± 5 °C tienen diferencias significativas por influencia del material de envase ($p < 0,05$) y una alta diferencia significativa por el tiempo de almacenamiento ($p < 0,01$). Se realizó una gráfica de efectos principales (Figura 1) donde indica la respuesta media para cada nivel con el fin de discriminar por nivel (materiales de envase: vidrio, cerámica, PET y PP) y determinar qué muestras almacenadas en los diferentes materiales de envase presentaban mayor o menor influencia sobre la media del contenido de HMF.

Las muestras de miel almacenadas en cerámica y el PET son las que menos variaciones en el contenido de HMF presentaban y el vidrio y PP los materiales que mayores variaciones presentaban.

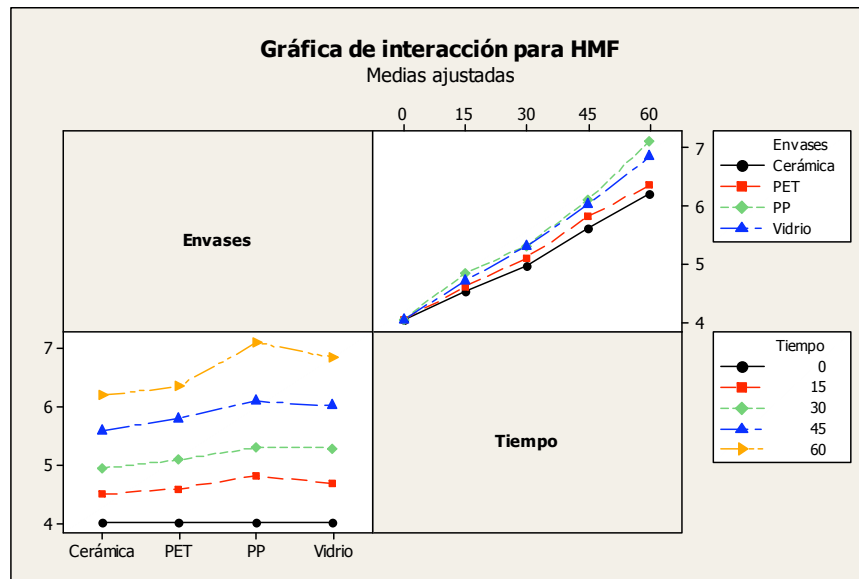
Figura 1. Efectos principales para el contenido de HMF con iluminación



En la Figura 2, se observa que no hay interacción Envases*Tiempo para el contenido de HMF, debido al comportamiento independiente que tiene el

factor Envases y el factor Tiempo sobre el contenido de HMF durante el almacenamiento.

Figura 2. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de HMF con iluminación



Las muestras de miel almacenadas sin iluminación a 20 ± 5 °C no tienen diferencias influenciadas por el material de envase, las variaciones que se presentan en el contenido de HMF se deben al factor tiempo de almacenamiento ($p < 0,01$).

5.1.2. Color

Las muestras de miel almacenadas a 45 ± 1 °C son las que mayores cambios de color presentan, donde hay diferencias de color de hasta 11,54 unidades CIELAB, considerables y apreciables. El material de envase que más influye sobre este parámetro es el PP y el que menos la cerámica.

El efecto de la iluminación sobre las muestras es menor ya que las diferencias de color no superaron las 4 unidades CIELAB y los cambios fueron menos apreciables.

En el tratamiento estadístico se observaron diferencias con significancia estadística para los materiales de envase que se almacenaron a 45 ± 1 °C (Tabla 11) en la coordenada de claridad (L^*) ($p < 0,05$), las coordenadas a^* y b^* sufren variaciones pero influenciadas por el factor tiempo y la interacción Envases*Tiempo ($p < 0,01$).

Tabla 11. Influencia de los materiales de envase y el tiempo del almacenamiento en las coordenadas de color

Coordenada de color	Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
L^*	Envases	*	NS	NS
	Tiempo	**	**	**
	Envases * Tiempo	**	**	**
a^*	Envases	NS	**	NS
	Tiempo	**	*	**
	Envases * Tiempo	**	NS	**
b^*	Envases	NS	**	NS
	Tiempo	**	**	**
	Envases * Tiempo	**	NS	NS

NS No hay significancia ($p > 0.05$); Diferencias significativas (* $p < 0.05$); Altas diferencias significativas (** $p < 0.01$)

Las Figuras 3 y 4 muestran los cambios de color que se presentan en las muestras almacenadas en diferentes materiales de envase a 45 ± 1 °C. Las muestras almacenadas en PP y la cerámica son las que presentan cambios apreciables y las muestras almacenadas en vidrio y PET son las que menores cambios tienen, se consideran perceptibles las diferencias de color superiores a 3 unidades CIELAB (Martínez, Melgosa, Pérez, Hita & Negueruela, 2001). Los cambios de color de las muestras fundamentalmente están afectados al disminuir la claridad y aumentar la cromaticidad.

Figura 3. Claridad (L^*) en función de la cromaticidad (C^*) a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

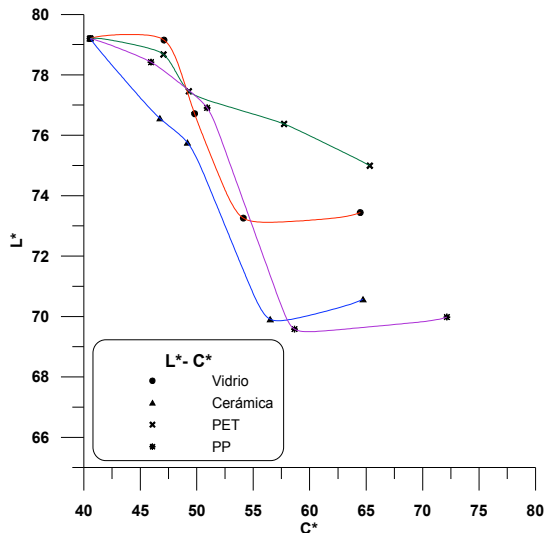
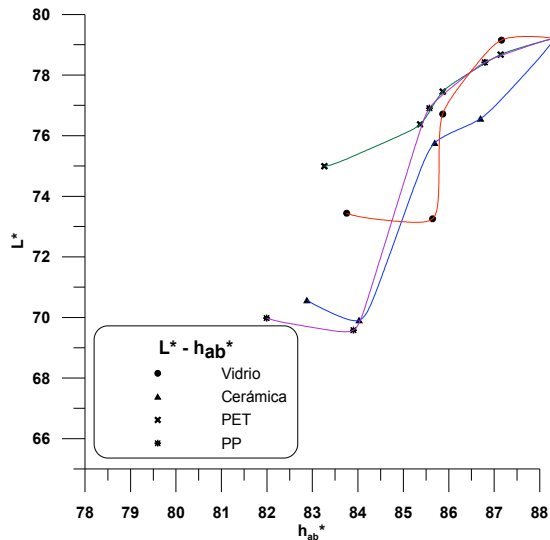


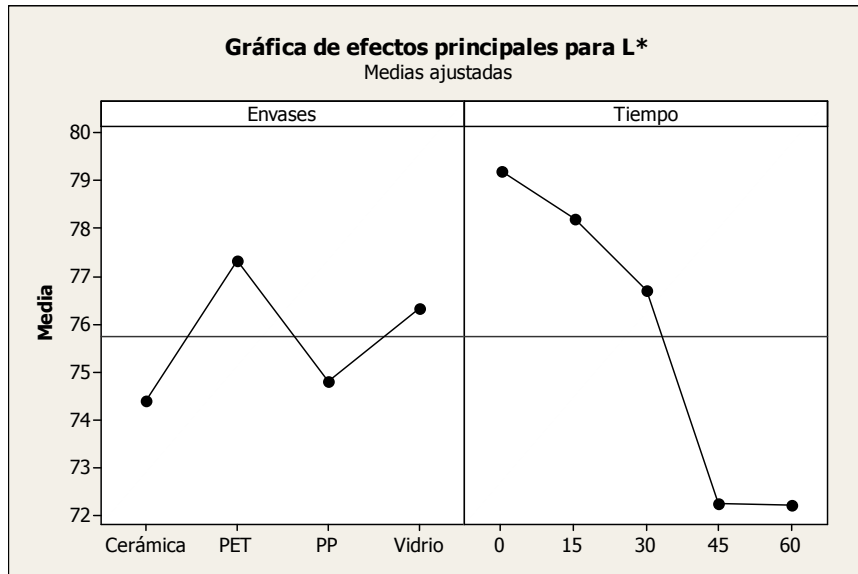
Figura 4. Claridad (L^*) en función del tono (h_{ab}^*) a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



En la Figura 3 se observan los cambios en la claridad de las muestras almacenadas donde se presentan pérdidas de hasta 11 unidades CIELAB. La disminución del tono (h_{ab}^*) en las muestras de miel de la Figura 4 indica que su color va cambiando de amarillos hacia naranjas. Solo las muestras envasadas en PET tienen una disminución continua de la claridad al contrario que los demás materiales, cuyas muestras estabilizan la medida de claridad en la última medida.

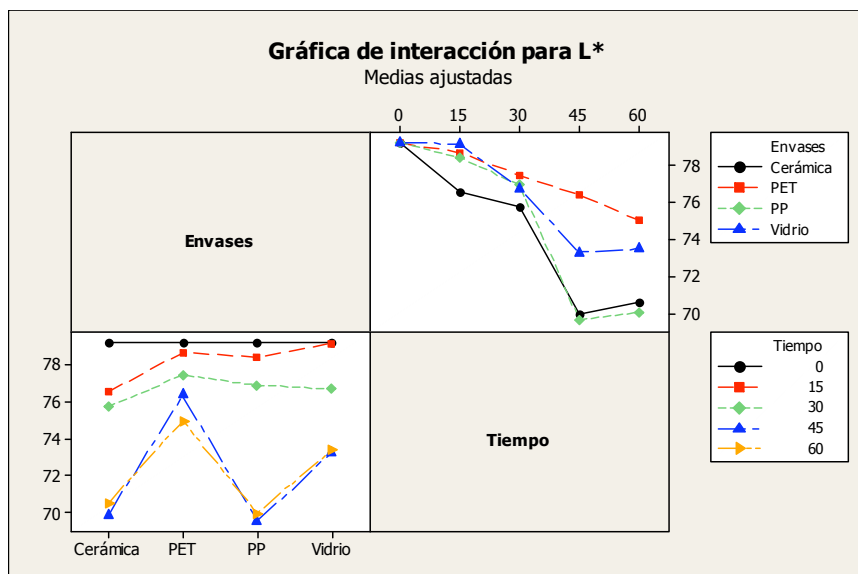
La única coordenada de color que presentó diferencias significativas por influencia de los materiales de envase fue la claridad (L^*), en la Figura 5, se muestra que los efectos principales de la claridad a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Las mayores variaciones fueron en las muestras de miel almacenadas en PP y cerámica y que menos variaciones tuvieron fueron las almacenadas en PET y vidrio.

Figura 5. Efectos principales para la claridad (L*) a 45 ± 1 °C



En la Figura 6 se observa el comportamiento de los materiales de envase en cada una de las mediciones de la claridad durante el almacenamiento. La cerámica y el PP tuvieron los cambios más fuertes en la coordenada de claridad en las mediciones a los 45 y 60 días. El hecho de que el comportamiento no sea paralelo indica que hay interacción entre los factores envases y tiempo.

Figura 6. Interacción Envases*Tiempo para la claridad (L*) a 45 ± 1 °C



5.1.3. pH

Las variaciones en el pH de las muestras de miel almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ tienen diferencias significativas para los materiales de envase ($p < 0,05$) (Tabla 12), estando también afectadas por el factor tiempo y la interacción de los factores Envases*Tiempo ($p < 0,05$).

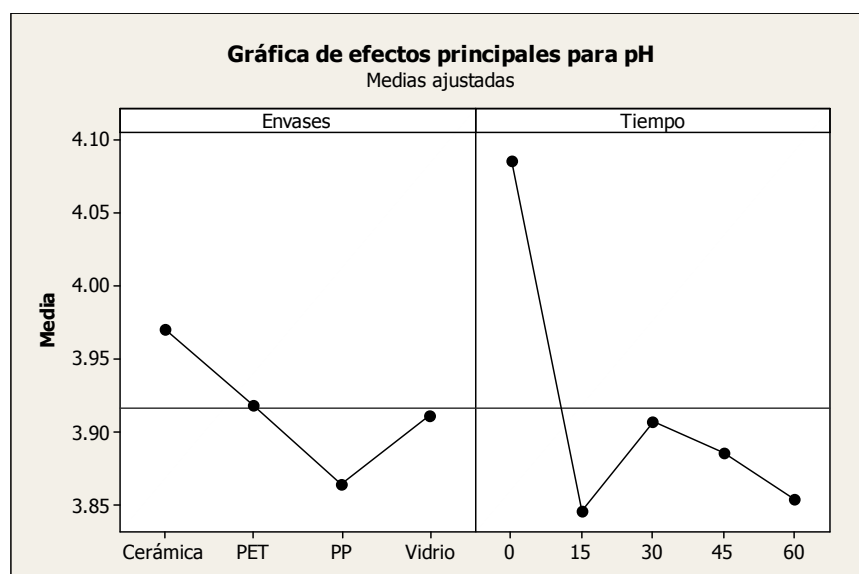
Tabla 12. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el contenido de pH

Factor	Temperatura $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$	Con iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$	Sin iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$
Envases	*	NS	NS
Tiempo	**	**	**
Envases * Tiempo	**	**	NS

NS No hay significancia ($p > 0,05$); Diferencias ($* p < 0,05$); Altas diferencias significativas ($** p < 0,01$)

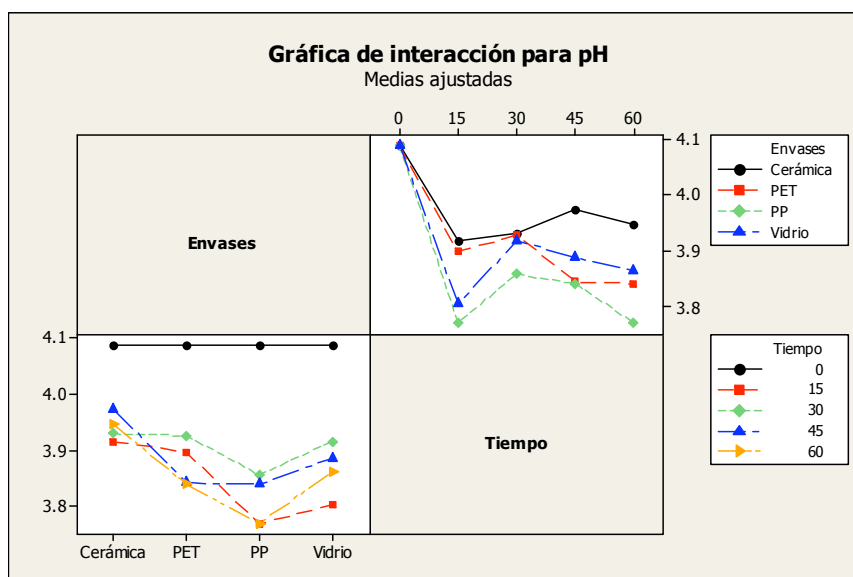
La Figura 7 muestra que el material que más influye en los cambios de pH de las muestras almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ es el PP, el vidrio y el PET tienen una influencia menor y la cerámica es el material que menos afecta a las muestras de miel.

Figura 7. Efectos principales para el pH a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



La Figura 8 muestra el comportamiento de los envases en cada una de las medidas en el tiempo y se observa que para este caso los factores Envases * Tiempo tienen una interacción con una alta diferencia significativa.

Figura 8. Interacción Envases*Tiempo para el pH a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



Las muestras almacenadas con y sin iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ no tienen diferencias debidas al material de envase, solamente les afecta el tiempo de almacenamiento ($p < 0,01$). En las muestras con iluminación, a diferencia de las muestras sin iluminación, sufren influencia de la interacción Envases*Tiempo ($p < 0,01$).

5.1.4. Acidez

La acidez es un parámetro físico-químico que no tiene diferencias estadísticas influenciadas por los materiales de envase durante el almacenamiento con temperatura e iluminación (Tabla 13, 14 y 15). El análisis de varianza prueba que las variaciones de acidez (libre, láctica y total) en las muestras almacenadas se deben al factor tiempo ($p < 0,01$) y a la interacción Envases*Tiempo ($p < 0,01$).

Tabla 13. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la acidez libre

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	NS	NS	NS
Tiempo	*	**	**
Envases * Tiempo	**	**	**

NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

Tabla 14. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la acidez láctica

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	NS	NS	NS
Tiempo	**	*	**
Envases * Tiempo	NS	*	*

NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

Tabla 15. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la acidez total

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	NS	NS	NS
Tiempo	*	**	**
Envases * Tiempo	*	**	**

NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

Los resultados estadísticos no evidencian diferencias significativas por los materiales de envase, sin embargo, sí se presentaron variaciones en la acidez de las muestras almacenadas, las envasadas en vidrio tienen una variación de 1,7, 3,07 y 4,7 meq/kg para la acidez libre, acidez láctica y acidez total respectivamente; las muestras almacenadas en cerámica tienen una variación de 3, 2 y 6 meq/kg para la acidez libre, acidez láctica y acidez total respectivamente; las muestras almacenadas en PET tiene una variación de 5,22, 2,17 y 9 meq/kg para la acidez libre, acidez láctica y acidez total respectivamente y las muestras almacenadas en PP tienen una variación de 6,47, 1,6 y 8,14 meq/kg para la acidez libre, acidez láctica y acidez total respectivamente.

Muestras de miel cruda, ajustado su contenido en humedad y almacenadas a temperatura ambiente durante 24 meses en envases de vidrio, no variaron apreciablemente su contenido de acidez libre en los primeros 6 meses (Jiménez, 1994). Estos autores no estudian otro tipo de material.

5.1.5. Actividad diastasa

Los resultados del análisis estadístico muestran que la actividad diastasa de las muestras de miel almacenadas (Tabla 16), en todas las condiciones estudiadas está influenciada por los materiales de envase, el tiempo de almacenamiento y la interacción Envases*Tiempo para las muestras almacenadas con temperatura e iluminación.

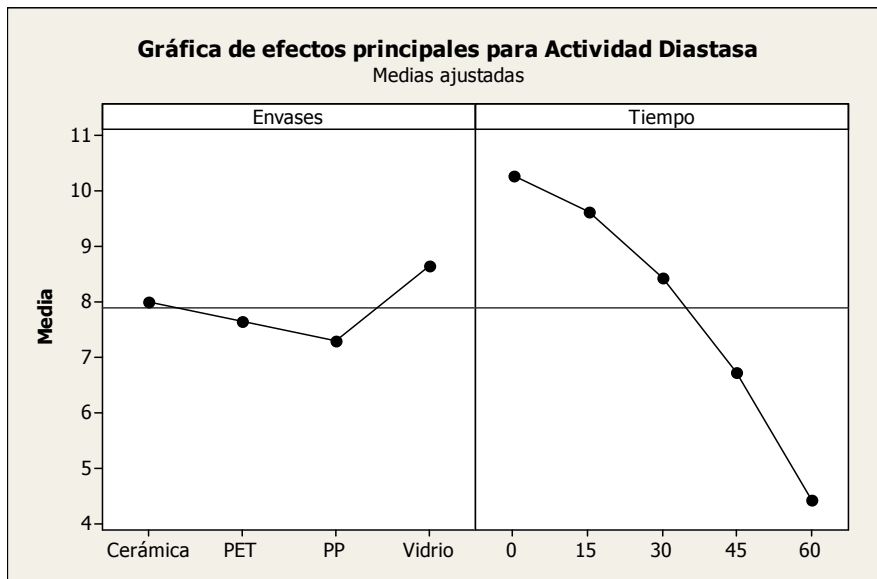
Tabla 16. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la actividad diastasa

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	*	*	*
Tiempo	**	**	**
Envases * Tiempo	**	*	NS

NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

En las Figuras 9, 11 y 13 se observa que para las muestras de miel almacenadas en todas las condiciones de almacenamiento, el material que más afecta a las muestras es el PP y el PET y los materiales que menos afectan son la cerámica y el vidrio.

Figura 9. Efectos principales para la actividad diastasa a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



En la Figura 10 se observa que las muestras están influenciadas por la interacción entre los factores Envases * Tiempo.

Figura 10. Interacción Envases*Tiempo para la actividad diastasa a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

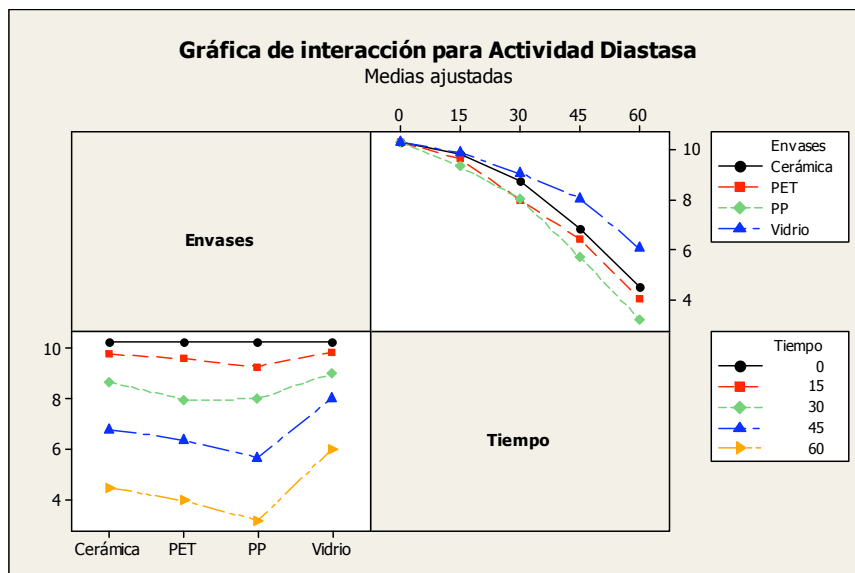
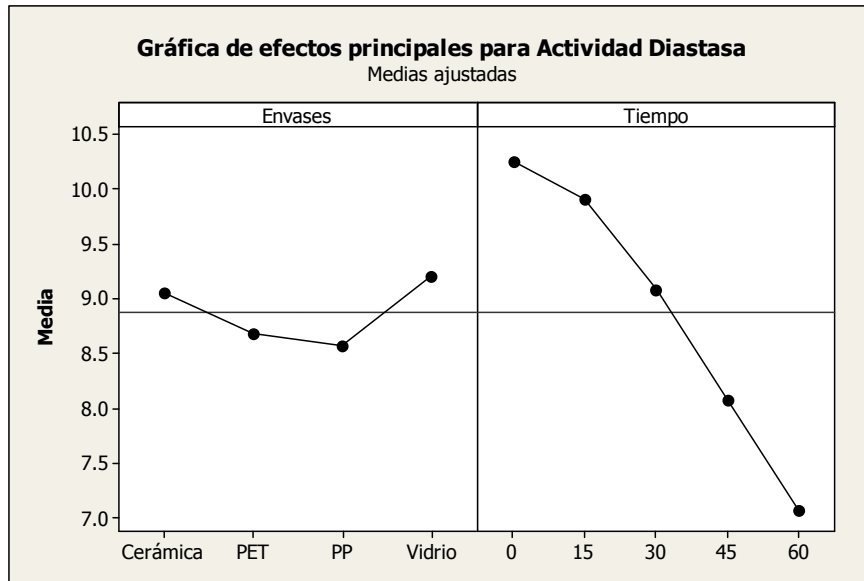
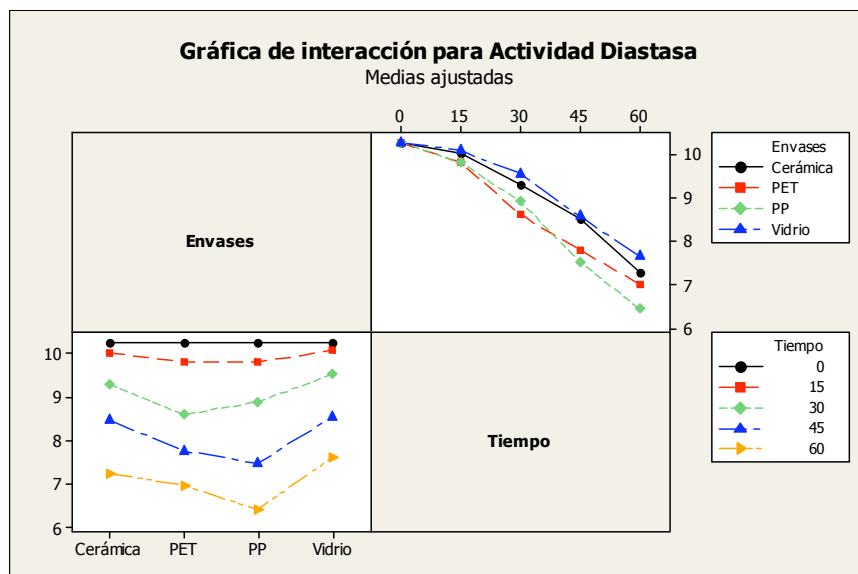


Figura 11. Efectos principales para la actividad diastasa con iluminación



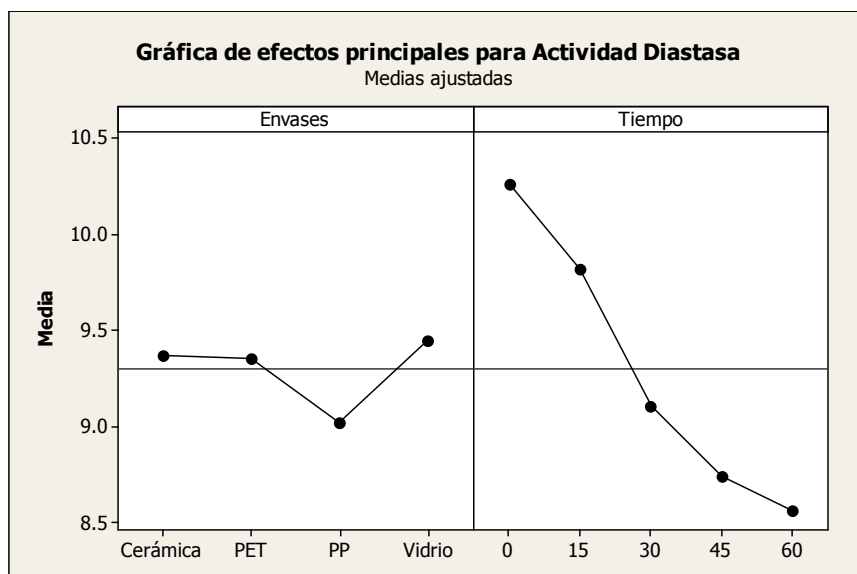
La interacción de los factores envases y tiempo es significativa ($p < 0,05$), lo que quiere decir que estos factores en conjunto influyen en los cambios que se presentan en la muestras de miel almacenadas con iluminación (Figura 12).

Figura 12. Interacción Envases*Tiempo para la actividad diastasa con iluminación



En la Figura 13 se observa que en las muestras de miel almacenadas sin iluminación el material que mayor influencia tiene sobre la actividad diastasa es el PP y el que menor influencia tiene es el vidrio.

Figura 13. Efectos principales para la actividad diastasa sin iluminación



Para las muestras almacenadas sin iluminación no hay significancia en la interacción Envases*Tiempo para la actividad diastasa

5.1.6. Actividad invertasa

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza para la actividad invertasa, para todos los casos indicando si hay o no significancia estadística con cada uno de los factores o su interacción.

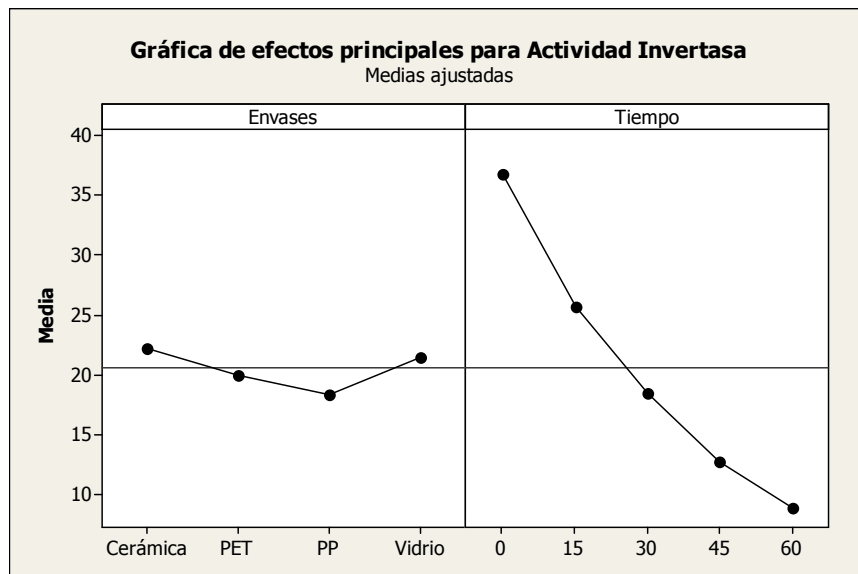
Tabla 17. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la actividad invertasa

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	**	*	*
Tiempo	**	*	*
Envases * Tiempo	**	**	**

NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

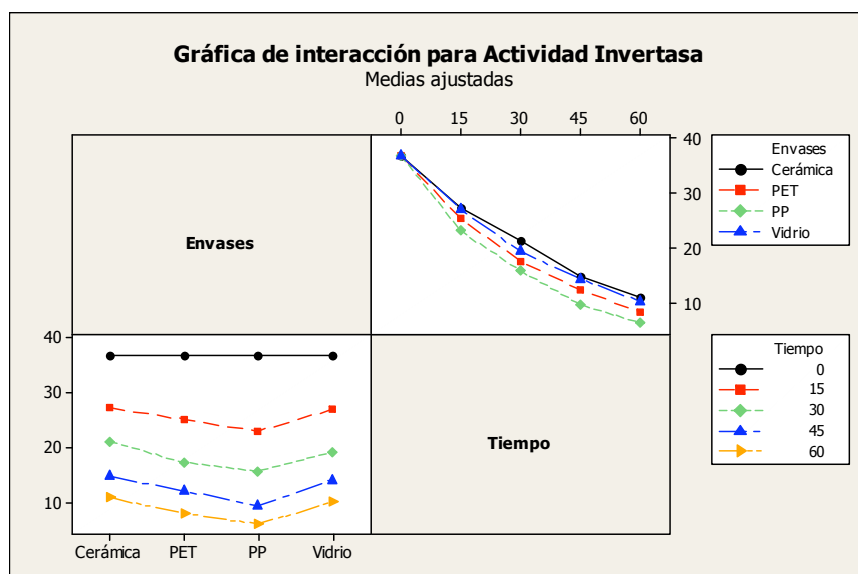
En la Figura 14 se observa que el material de envase que más afecta la actividad invertasa de las muestras de miel almacenadas a 45 ± 1 °C es el PP, seguido por el PET, el vidrio y finalmente la cerámica.

Figura 14. Efectos principales para la actividad invertasa a 45 ± 1 °C



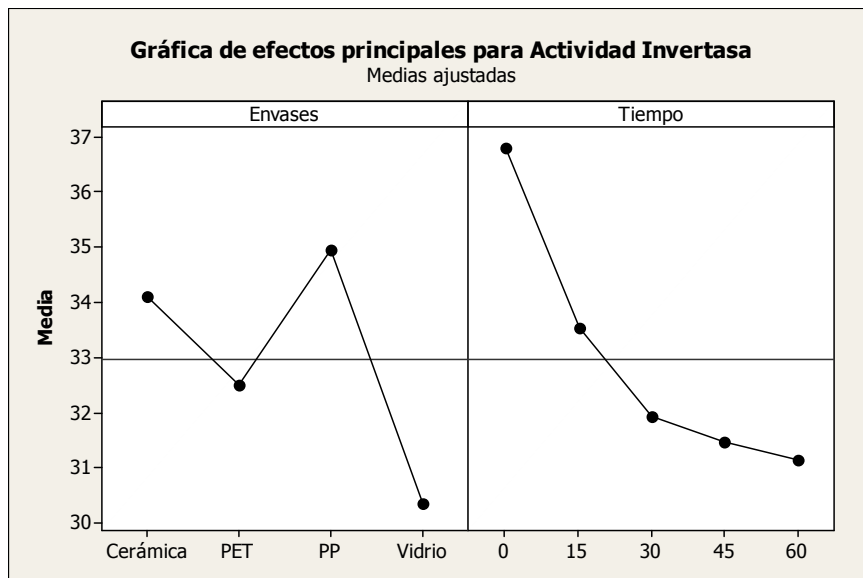
La actividad invertasa de muestras envasadas a 45 ± 1 °C tiene influencia de la interacción ($p < 0,01$), entre los factores Envases*Tiempo, como puede observarse en la Figura 15, sobre la actividad invertasa.

Figura 15. Interacción Envases*Tiempo para la actividad invertasa a 45 ± 1 °C



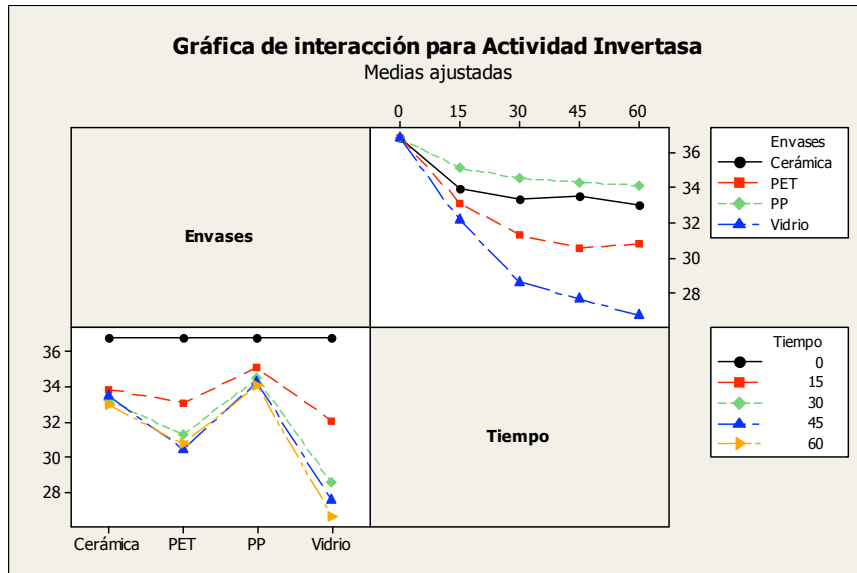
La Figura 16 muestra que la influencia de la iluminación en la actividad invertasa tiene alta diferencia significativa estadísticamente ($p < 0,01$), afecta más a las muestras almacenadas en vidrio y PET y menos a las muestras almacenadas en PP y cerámica.

Figura 16. Efectos principales para la actividad invertasa con iluminación



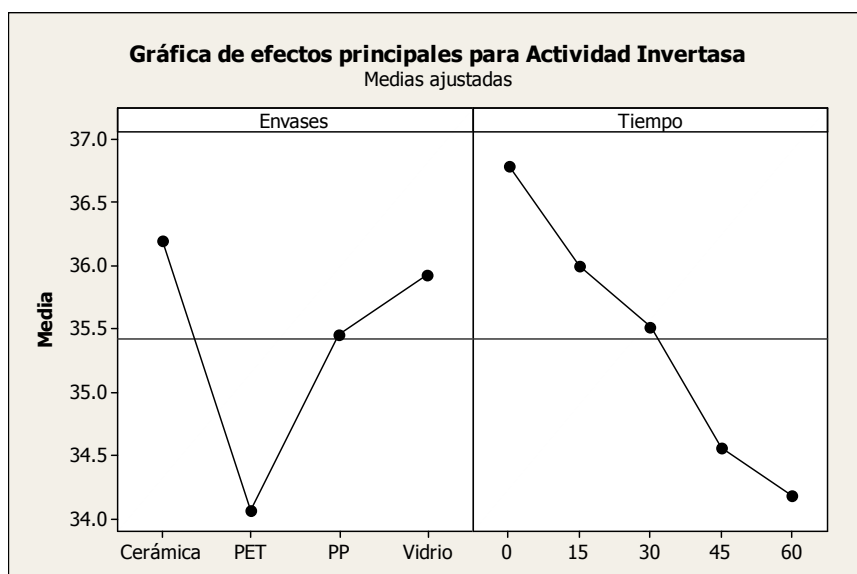
En la Figura 17 se observa que la actividad invertasa de las muestras de miel almacenadas con iluminación tienen una alta interacción entre los factores Envases * Tiempo.

Figura 17. Interacción Envases*Tiempo para la actividad invertasa con iluminación



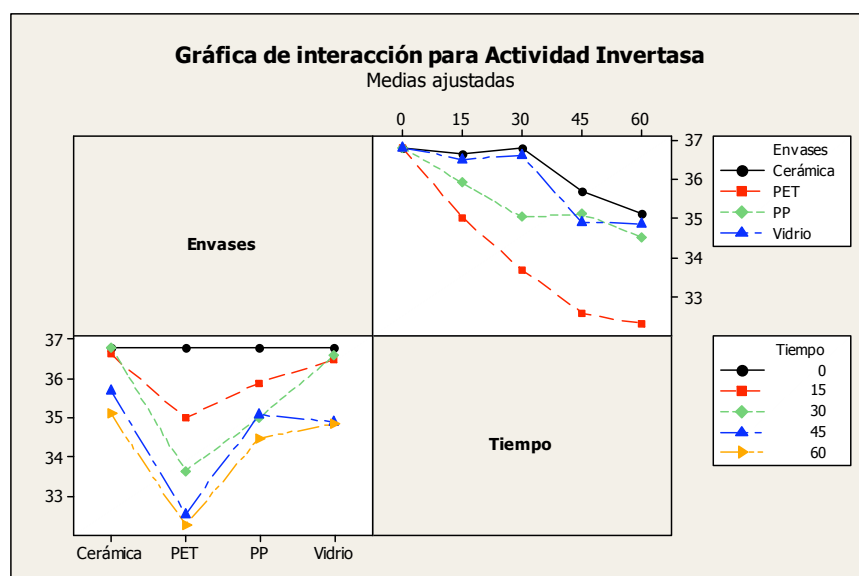
En las muestras de miel almacenadas sin influencia de la iluminación, también se presentaron cambios en la actividad invertasa influenciados por los materiales de envase. En este caso, las muestras con mayores variaciones fueron las almacenadas en PET y PP y las almacenadas en vidrio y cerámica las menores variaciones presentaron (Figura 18).

Figura 18. Efectos principales para la actividad invertasa sin iluminación



La interacción de los factores Envases*Tiempo en las muestras almacenadas sin iluminación es significativa ($p < 0,01$), para la Actividad Invertasa (Figura 19), debido a que ambos factores producen un efecto en el cambio durante el almacenamiento.

Figura 19. Interacción Envases*Tiempo para la actividad invertasa sin iluminación



5.1.7. Compuestos fenólicos totales

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza, para todos los casos indicando si hay o no significancia estadística con cada uno de los factores o su interacción.

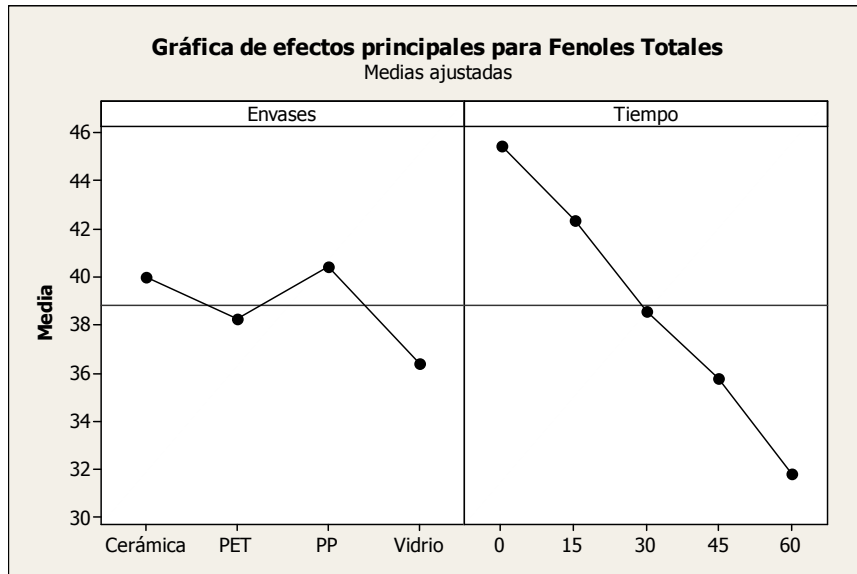
Tabla 18. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el contenido de fenoles totales

Factor	Temperatura $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$	Con iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$	Sin iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$
Envases	*	*	*
Tiempo	**	**	**
Envases * Tiempo	**	**	**

NS No hay significancia ($p > 0.05$); Diferencias (* $p < 0.05$); Altas diferencias significativas (** $p < 0.01$)

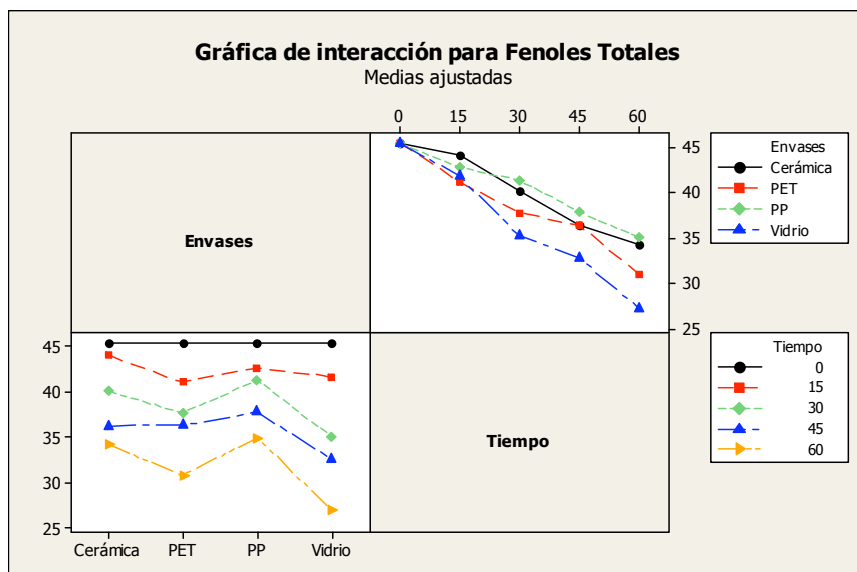
Los materiales que más afectan al contenido de fenoles totales en miel son el vidrio y el PET. La cerámica y el PP afectan en menor grado este parámetro de calidad (Figura 20).

Figura 20. Efectos principales para el contenido de fenoles totales a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



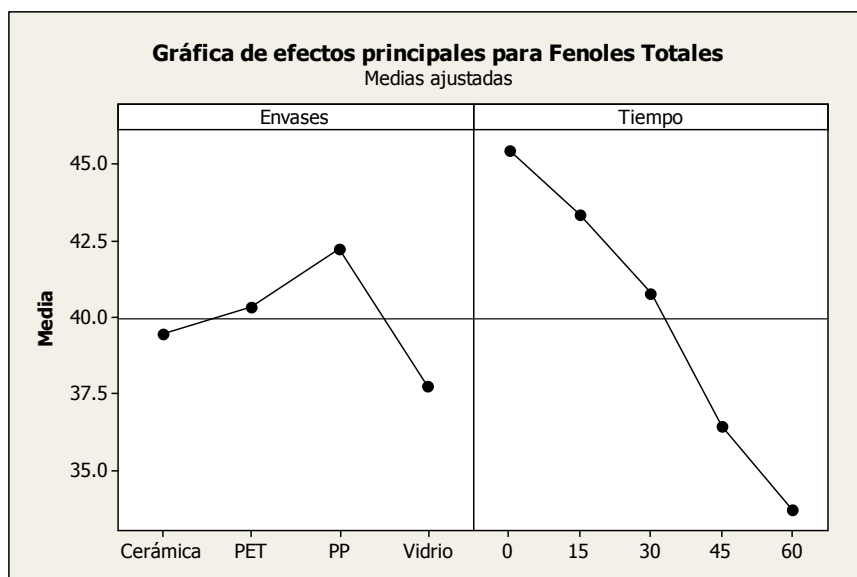
En la Figura 21 se muestra que hay interacción entre los factores envases y tiempo de las muestras almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 21. Interacción Envases*Tiempo para fenoles totales a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



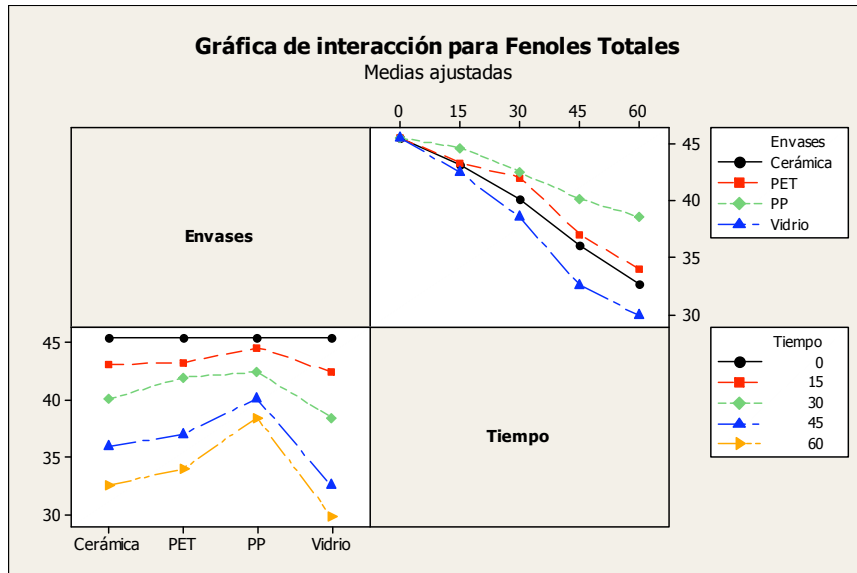
En la Figura 22 se observa que las muestras almacenadas con influencia de la iluminación, el vidrio y la cerámica son los materiales que menos afectan y el PET y PP son los materiales que más afectan el contenido de fenoles totales en la miel almacenada.

Figura 22. Efectos principales para el contenido de fenoles totales con iluminación



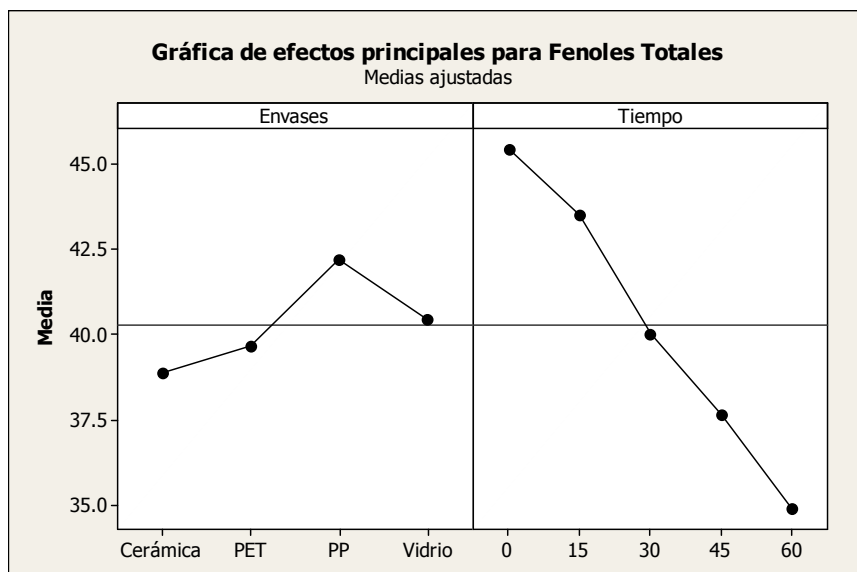
La Figura 23 muestra una alta interacción ($p < 0,01$) entre los factores Envases*Tiempo que afectan el contenido de fenoles totales en las muestras almacenadas con influencia de la iluminación.

Figura 23. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de fenoles totales con iluminación



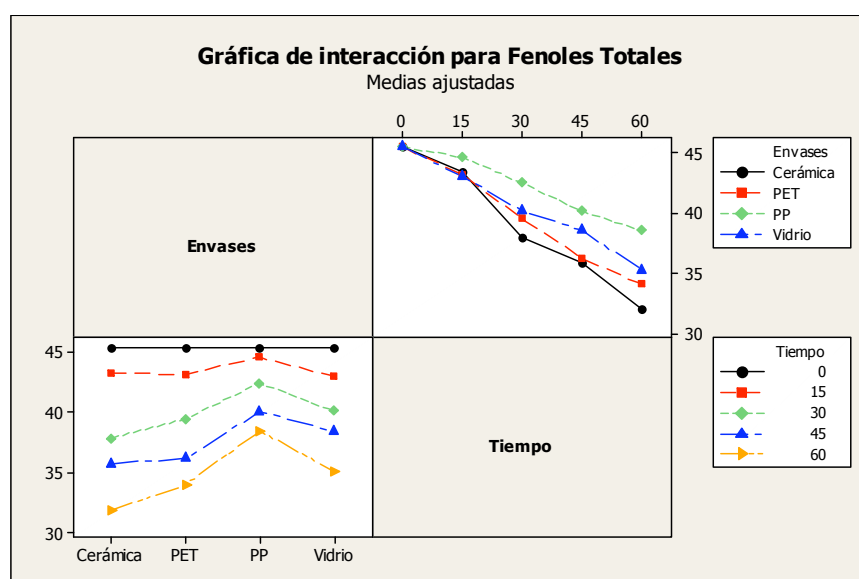
Las muestras almacenadas sin iluminación se ven influenciadas por los materiales de envase, el que mayor influencia tiene sobre el contenido de fenoles totales es la cerámica y el PET y los que menor influencia tienen son el vidrio y el PP (Figura 24).

Figura 24. Efectos principales para el contenido de fenoles totales sin iluminación



En la Figura 25 se observa el comportamiento del contenido de fenoles totales y su interacción de los factores envases y almacenamiento para las muestras almacenadas sin iluminación.

Figura 25. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de fenoles totales sin iluminación



5.1.8. Contenido de flavonoides totales

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza, para todos las condiciones de almacenamiento indicando si hay o no significancia estadística con cada factor o su interacción.

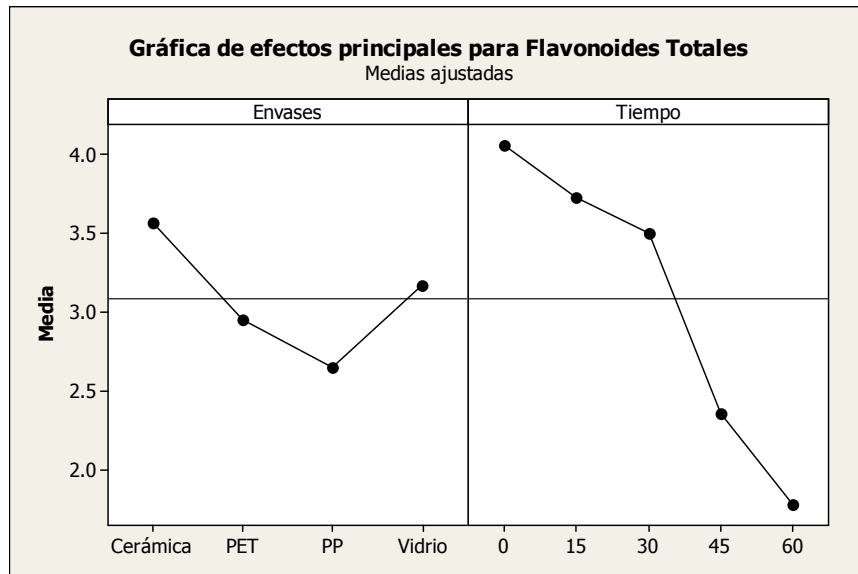
Tabla 19. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en el contenido de flavonoides totales

Factor	Temperatura 45 ± 1 °C	Con iluminación a 20 ± 5 °C	Sin iluminación a 20 ± 5 °C
Envases	*	*	*
Tiempo	**	*	**
Envases * Tiempo	**	**	NS

NS No hay significancia (p>0.05); Diferencias (* p < 0.05); Altas diferencias significativas (** p <0.01)

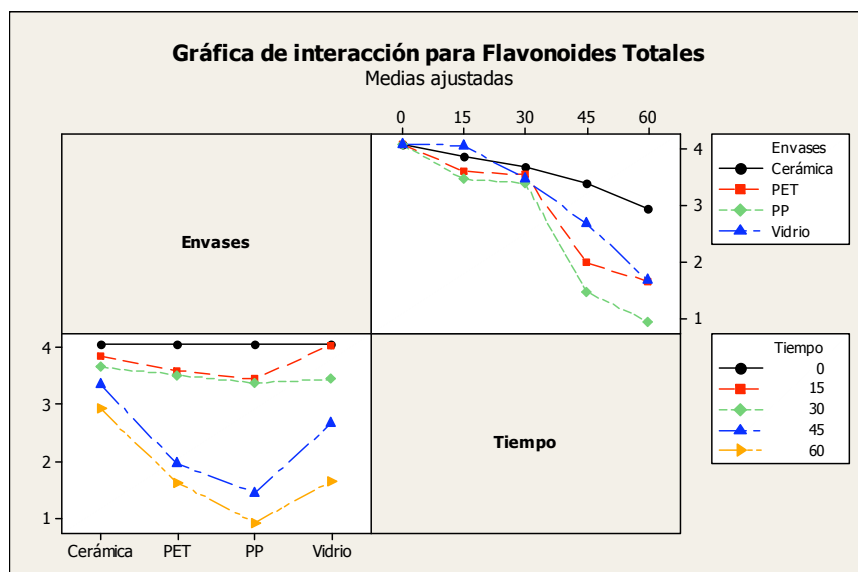
El contenido de flavonoides totales en la miel es sensible al almacenamiento a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, el material que más afecta a las muestras almacenadas es el PP y el PET y los que menor influencia tienen son el vidrio y la cerámica (Figura 26).

Figura 26. Efectos principales para los flavonoides totales a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



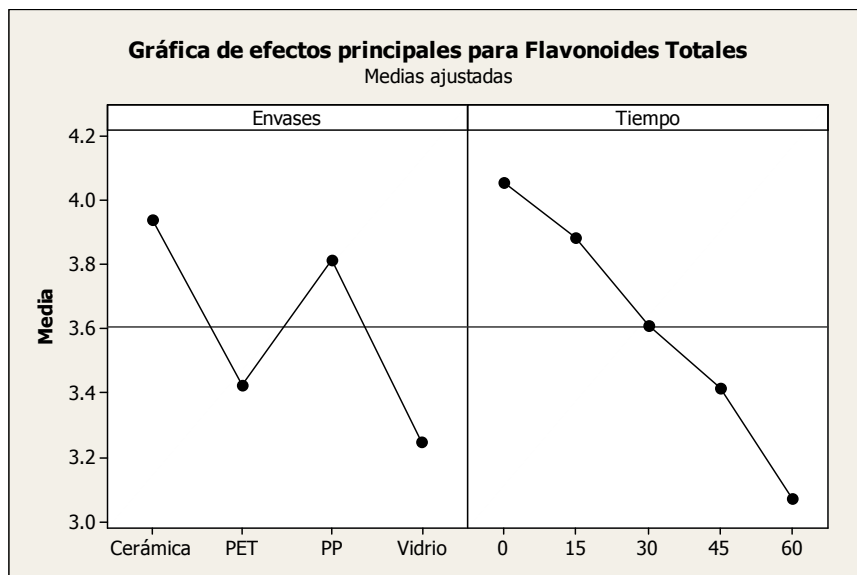
En la Figura 27 se observa que los factores Envases*Tiempo tienen una alta interacción ($p < 0,01$) y la combinación afectan el contenido de Flavonoides Totales durante el almacenamiento.

Figura 27. Interacción Envases*Tiempo para los flavonoides totales a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



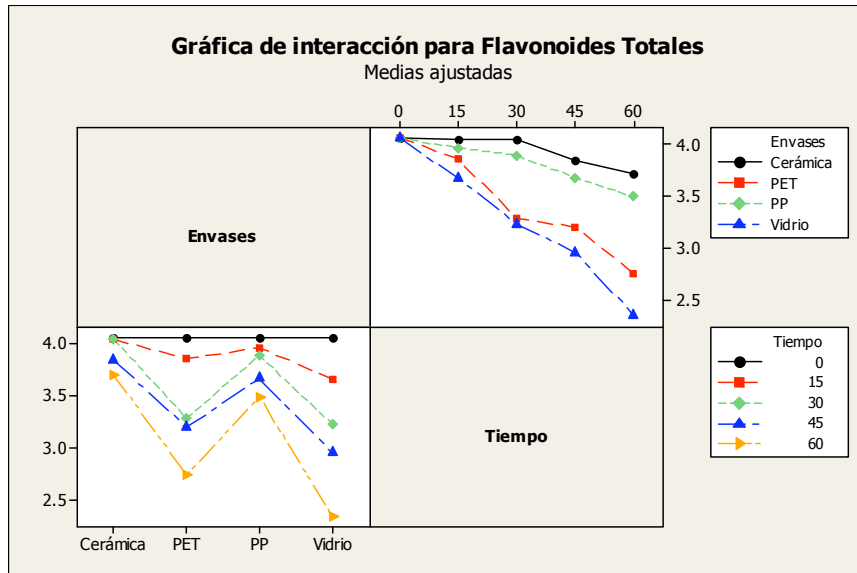
El contenido de flavonoides totales en la miel es afectada por la iluminación, el material que más afecta a las muestras almacenadas es el vidrio y el PET y los que menor influencia tienen son el PP y la cerámica (Figura 28).

Figura 28. Efectos principales para el contenido de flavonoides totales con iluminación



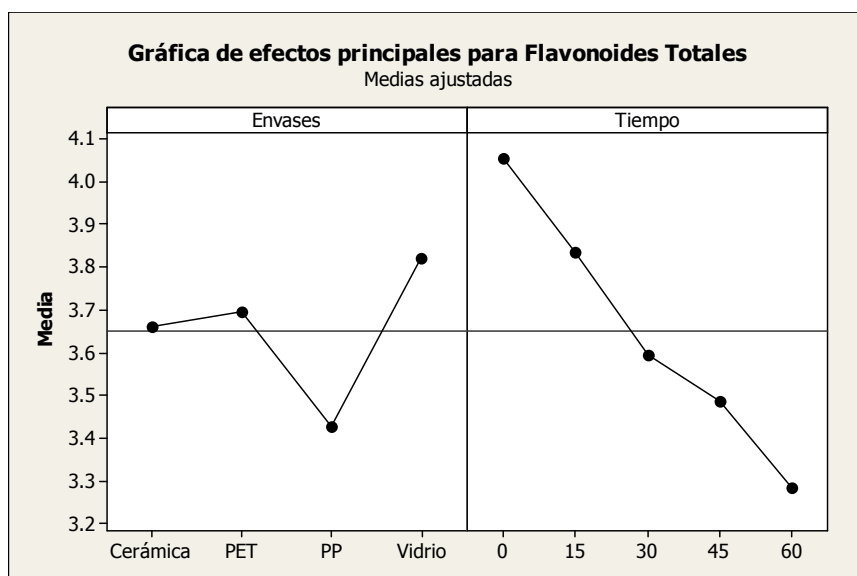
En la Figura 29 se observa que los factores envases y tiempo tienen una alta interacción ($p < 0,01$) y afectan el contenido de flavonoides totales durante el almacenamiento con iluminación.

Figura 29. Interacción Envases*Tiempo para el contenido de flavonoides totales con iluminación



El contenido de flavonoides totales para muestras de miel almacenadas sin iluminación, el material que más afecta a las muestras es el PP y los que menor influencia tienen son la cerámica, el PET y el vidrio (Figura 30).

Figura 30. Efectos principales para el contenido de flavonoides totales sin iluminación



Los factores Envases*Tiempo no tienen una alta interacción sobre el contenido de flavonoides totales durante el almacenamiento sin iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$

5.1.9. Actividad antioxidante

En la Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza de los resultados relacionados con la actividad antioxidante de las muestras de miel almacenadas en todas las condiciones de almacenamiento, indicando si hay o no significancia estadística con cada factor o su interacción.

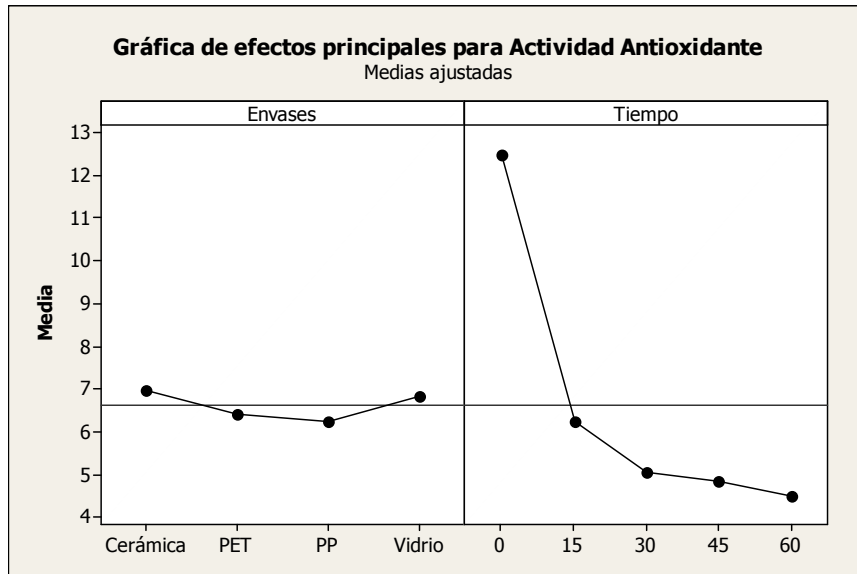
Tabla 20. Influencia de los materiales de envase y el tiempo en la actividad antioxidante

Factor	Temperatura $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$	Con iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$	Sin iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$
Envases	*	**	**
Tiempo	**	**	**
Envases * Tiempo	*	**	**

NS No hay significancia ($p > 0.05$); Diferencias (* $p < 0.05$); Altas Diferencias significativas (** $p < 0.01$)

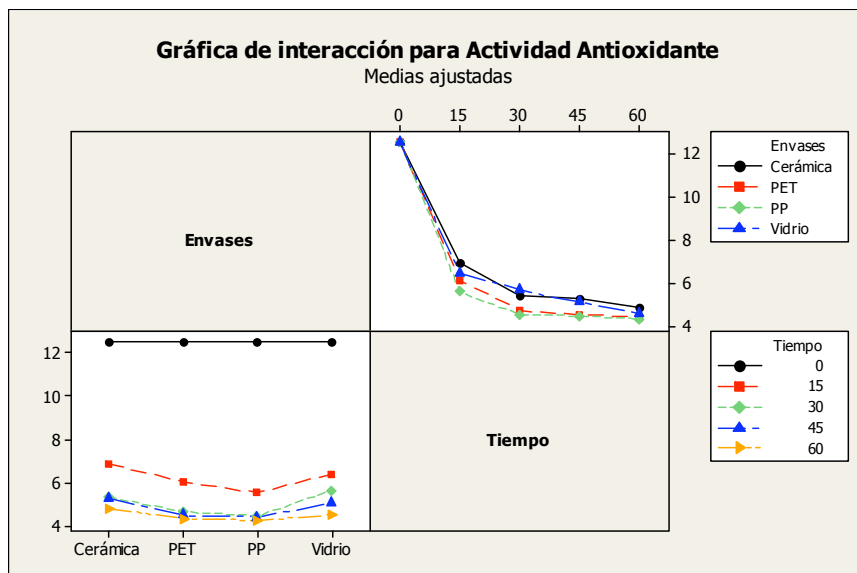
La influencia de los materiales de envase sobre la actividad antioxidante a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 31) son menos marcados estadísticamente que en los enzimas, los fenoles y flavonoides totales, sin embargo es un factor que influye en la actividad antioxidante de las muestras almacenadas. Los materiales que menos influyen son la cerámica y el vidrio y los que más influyen son el PET y PP.

Figura 31. Efectos principales para la actividad antioxidante a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



En la Figura 32 se muestra la interacción ($p < 0,05$) entre los factores Envases*Tiempo sobre la actividad antioxidante para muestras de miel almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

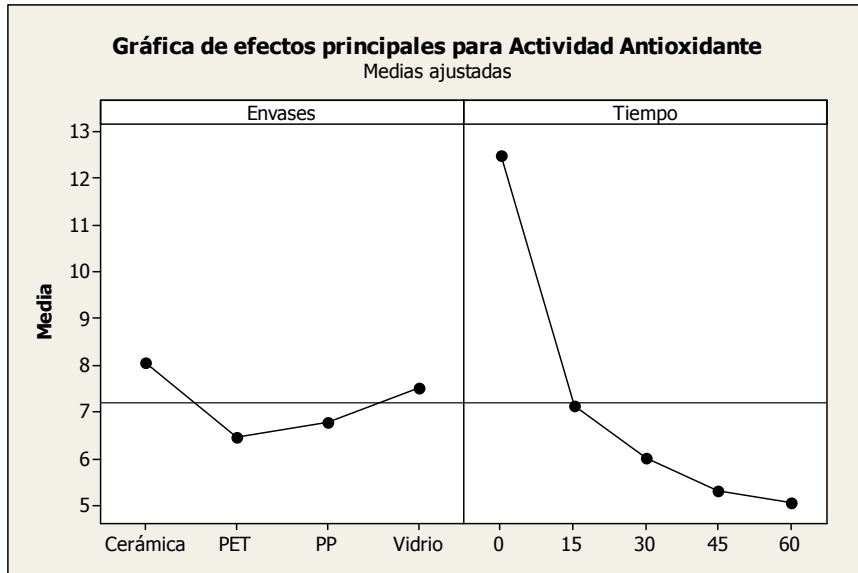
Figura 32. Interacción Envases*Tiempo para actividad antioxidante a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



La actividad antioxidante de las muestras almacenadas con iluminación, tienen influencia de los materiales de envase con alta significancia estadística. Los

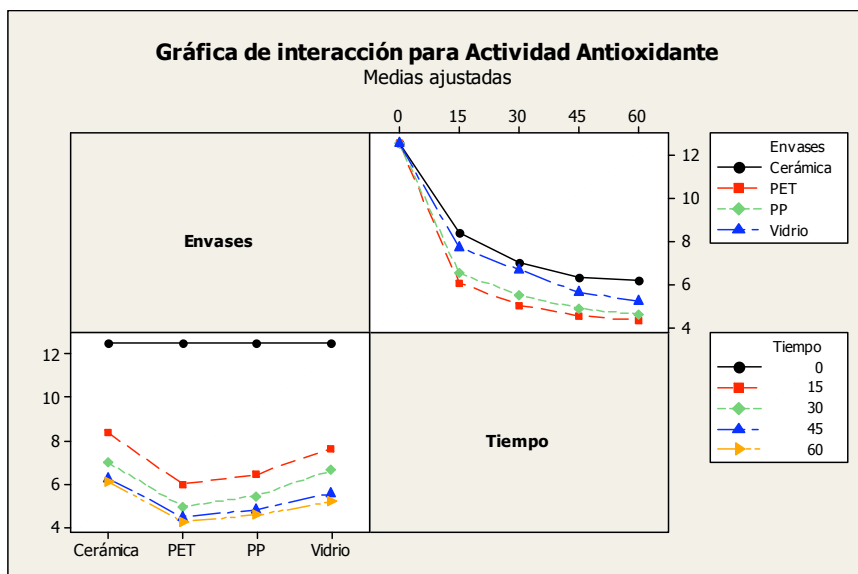
materiales que tienen mayores variaciones son el PET y el PP y los que menores variaciones presentan son el vidrio y la cerámica (Figura 33).

Figura 33. Efectos principales para la actividad antioxidante con iluminación



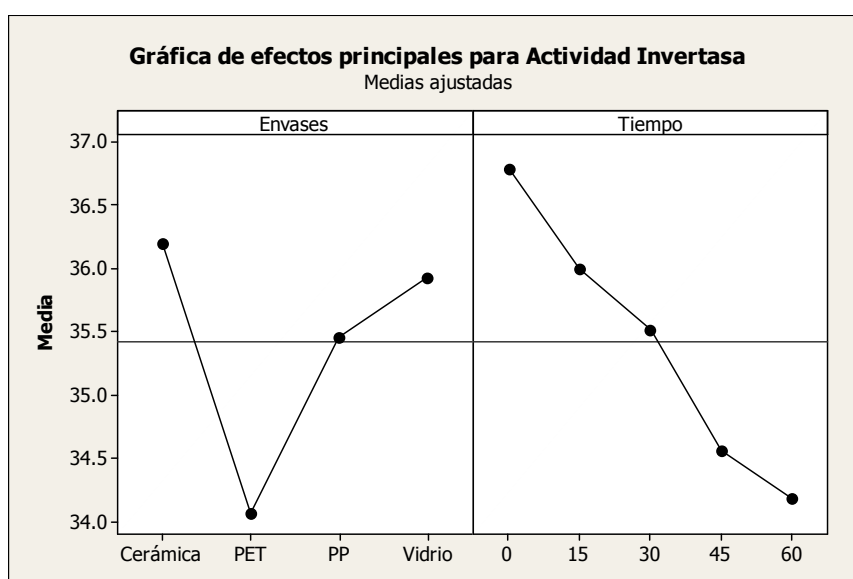
En la Figura 34 se muestra una alta interacción ($p < 0,01$) entre los factores Envases*Tiempo de la actividad antioxidante para muestras de miel almacenadas con iluminación a 20 ± 5 °C.

Figura 34. Interacción Envases*Tiempo para actividad antioxidante con iluminación



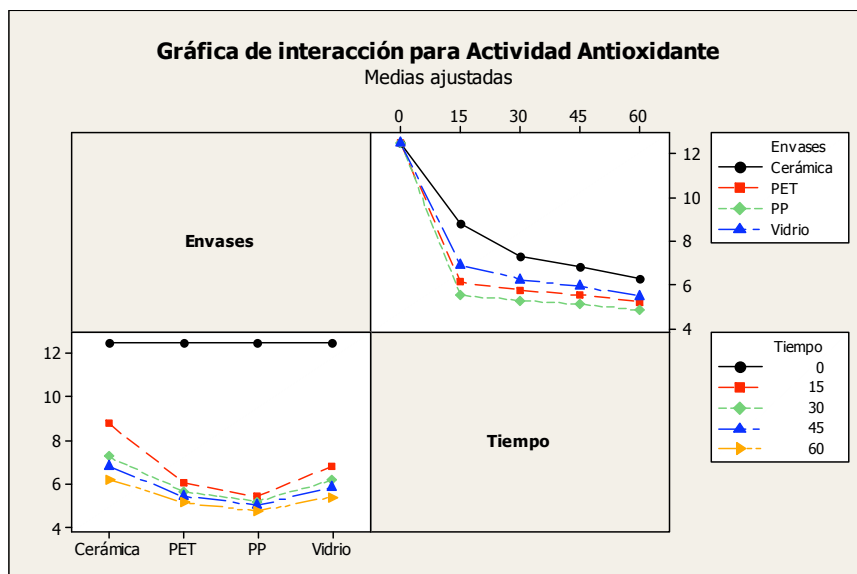
La actividad antioxidante de las muestras almacenadas sin iluminación, tienen influencia de los materiales de envase con alta significancia estadística. El material que más afectado se ve es el PET, los materiales que tienen menores variaciones son el PP, el vidrio y la cerámica (Figura 35).

Figura 35. Efectos principales para actividad antioxidante sin iluminación



En la Figura 36 se muestra una alta interacción ($p < 0,01$) entre los factores envases y tiempo de la actividad antioxidante para muestras de miel almacenadas sin iluminación a 20 ± 5 °C.

Figura 36. Interacción Envases*Tiempo para actividad antioxidante sin iluminación



El control del tiempo y las condiciones de almacenamiento a la cual está sometida la miel, en todas sus etapas, desde el momento de su recolección, almacenamiento, distribución y finalmente consumo, es de gran importancia para garantizar su calidad.

Para resumir la influencia de los materiales de envase en las diferentes condiciones de almacenamiento, y en cada uno de los parámetros de calidad analizados, observar la Tabla 21.

Tabla 21. Influencia de los materiales de envase en todas las condiciones de almacenamiento

Muestras a 45 ± 1 °C									
Influencia del Material	HMF	L*	pH	Acidez	AD	AI	Fenoles	Flavonoides	AO
Mayor	NS	PP	PP	NS	PP	PP	PP	PP	PP
		C	V		PET	V	V	V	V
		V	PET		C	PET	PET	PET	PET
Menor		PET	C		V	C	C	C	C

Muestras con iluminación a 20 ± 5 °C.									
Influencia del Material	HMF	L*	pH	Acidez	AD	AI	Fenoles	Flavonoides	AO
Mayor	PP				PP	V	V	V	V
	V	NS	NS	NS	PET	PET	C	PET	C
	PET				C	C	PET	PP	PP
Menor	C				V	PP	PP	C	PET

Muestras sin iluminación a 20 ± 5 °C.									
Influencia del Material	HMF	L*	pH	Acidez	AD	AI	Fenoles	Flavonoides	AO
Mayor					PP	PET	C	PP	PP
	NS	NS	NS	NS	PET	PP	PET	PET	PET
					C	V	V	C	V
Menor					V	C	PP	V	C

V (Vidrio), C (Cerámica), PET (Tereftalato de polietileno) y PP (Polipropileno)
NS (No hay significancia estadística)

5.2. Influencia de la temperatura

5.2.1. Contenido de HMF

En la Tabla 22 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de HMF en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a 45 ± 1 °C.

Tabla 22. Contenido de HMF a 45 ± 1 °C

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,03 ± 0,45	10,30 ± 0,17	20,20 ± 0,53	50,70 ± 0,80	96,30 ± 0,90
Cerámica	4,03 ± 0,45	9,10 ± 0,20	23,30 ± 0,50	52,50 ± 0,70	109,60 ± 0,80
PET	4,03 ± 0,45	10,60 ± 0,20	22,30 ± 0,60	54,00 ± 0,30	118,00 ± 0,50
PP	4,03 ± 0,45	9,80 ± 0,70	26,50 ± 0,80	65,30 ± 0,30	132,90 ± 0,76

El HMF es el parámetro más importante y fiable para detectar el calentamiento de la miel cruda, en una miel con periodos cortos de cata sus valores de HMF

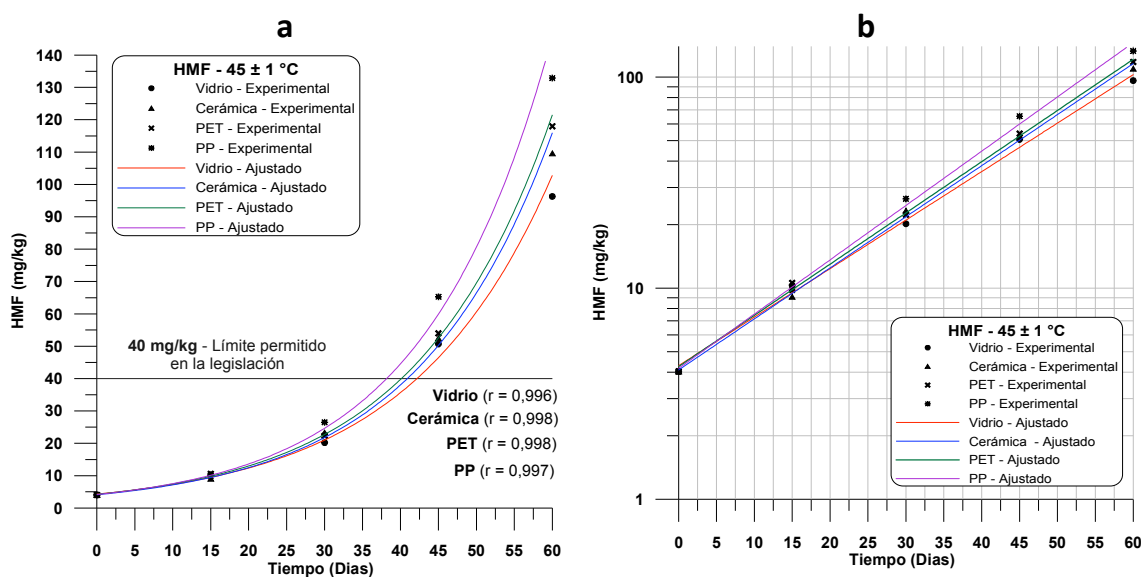
son muy bajos. La variación del pH y su acidez, así como la sobre exposición a alta temperatura, inciden en el aumento progresivo de este compuesto.

En nuestro estudio se ha observado que el intervalo de 40 a 50 °C de temperatura es crítico para observar un incremento notable de HMF en almacenamiento (Figura 37).

El almacenamiento a 45 ± 1 °C es la condición que más influye en el contenido de HMF de las muestras de miel iniciales y las muestras almacenadas al cabo de 60 días; los materiales de envase no ofrecen diferencias estadísticas ya que su comportamiento es similar a lo largo del tiempo, sin embargo, el factor tiempo sí influye en el incremento del HMF con alta significancia estadística.

El contenido de HMF en miel y su evolución en el tiempo por acción de la temperatura ha sido un proceso estudiado por diversos autores, demostrando que este compuesto se forma por deshidratación de las hexosas (fructosa, glucosa) en medio ácido. (Fallico et al., 2004; Jiménez, Mateo, Huerta & Mateo, 1994; Sancho et al., 1992; Tosi, Ciappini, Rè & Lucero, 2002; Turhan et al., 2008).

La Figura 37 a y b muestra la misma información para la evolución de HMF a 45 ± 1 °C durante el almacenamiento, la diferencia está en la escala del eje que representa el HMF (mg/kg) y su bondad radica en que la información está puesta de una manera tal que permite una fácil interpretación.

Figura 37. Evolución del contenido de HMF a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 

La cinética que se ajusta a la formación del HMF durante el almacenamiento fue determinada por Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F., & Lozano, J.S., 1992. Estos autores observaron cómo la mayoría de las muestras analizadas (96.5%) presentaban una relación lineal entre el logaritmo del contenido de HMF y el tiempo de almacenamiento, hecho coincidente con nuestros resultados para los diferentes materiales de envase (Figura 37 b).

El contenido de HMF sobrepasa el límite máximo establecido por la legislación (40 mg/kg) a los 42, 36, 35 y 28 días, en las muestras almacenadas en vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente.

5.2.2. Color

Se han calculado las diferencias de color (ΔE^*) para cada material de envase en cada tiempo de análisis (Tabla 23), para observar la evolución del color en las muestras almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

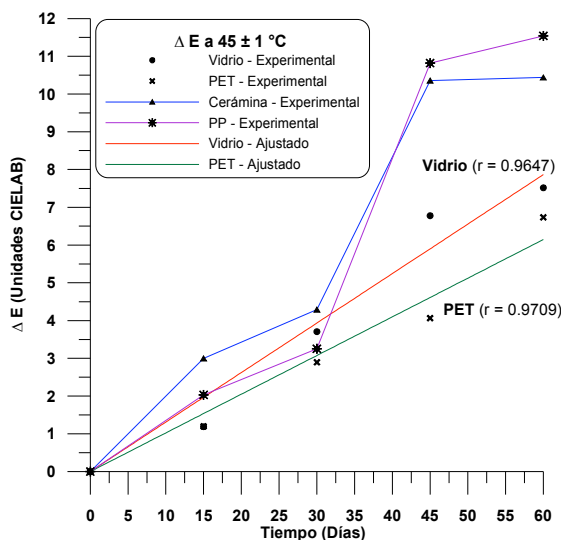
Tabla 23. Diferencias de color para muestras almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Tiempo	ΔE^* Vidrio	ΔE^* Cerámica	ΔE^* PET	ΔE^* PP
0	0.00	0.00	0.00	0.00
15	1.19	3.00	1.20	2.03
30	3.71	4.29	2.89	3.25
45	6.78	10.36	4.06	10.82
60	7.52	10.44	6.73	11.54

En la Figura 38 se observa que existen diferencias marcadas entre los envases, siendo las muestras de miel menos afectadas las envasadas en PET y vidrio, los cuales tienen una relación lineal con el tiempo. Las muestras más afectadas son las envasadas en PP y cerámica, en donde las diferencias de color aumentan hasta el día 45 y luego tienden a estabilizar los 45 y 60 días.

El tratamiento de calor suave y/o el almacenaje prolongado de la miel conducen a los cambios de color debido al proceso de caramelización de carbohidratos en la reacción del Maillard y a la descomposición de la fructosa en el medio ácido de la miel (Villamiel, Castillo, Corzo & Olano, 2001). Estas reacciones conducen a la formación de HMF y de otros compuestos furfural, de entre otros que se producen oscurecimiento de la miel.

Figura 38. Diferencias de color (ΔE)* a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



5.2.3. pH

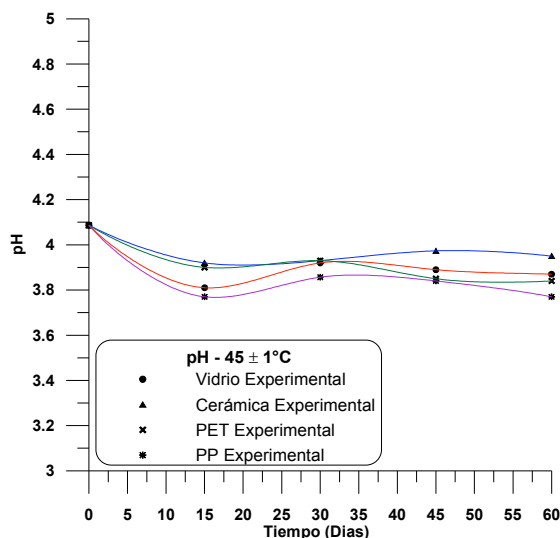
En la Tabla 24 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del pH en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a 45 ± 1 °C.

Tabla 24. pH a 45 ± 1 °C

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,09 ± 0,03	3,80 ± 0,03	3,92 ± 0,03	3,89 ± 0,01	3,86 ± 0,02
Cerámica	4,09 ± 0,03	3,92 ± 0,06	3,93 ± 0,01	3,97 ± 0,01	3,95 ± 0,02
PET	4,09 ± 0,03	3,90 ± 0,03	3,93 ± 0,02	3,84 ± 0,01	3,84 ± 0,02
PP	4,09 ± 0,03	3,77 ± 0,06	3,86 ± 0,01	3,84 ± 0,01	3,77 ± 0,01

En el estudio realizado, las muestras almacenadas a temperatura de 45 ± 1 °C presentaron un descenso del pH en los primeros 15 días y posteriormente los valores se estabilizaron en los restantes 45 días. En general, todos los materiales de envase se comportan de la misma manera, sin embargo, se observan menos variaciones en las muestras de miel almacenadas en cerámica (Figura 39).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en un estudio realizado en mieles italianas, donde los autores hallan una ligera disminución del pH cuando las muestras son almacenadas durante 12 meses a 25 °C (Cherchi et al., 1997). Sin embargo otras investigaciones realizadas en 1991 y 1994 consideran que el pH es un parámetro muy estable durante el almacenamiento (Jiménez et al., 1994; Krauze et al., 1991).

Figura 39. Evolución del pH a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 

Mieles con diferente contenido de agua y almacenadas durante 2 años a 28°C presentan unas variaciones de pH insignificante según (Jiménez et al., 1994). Para otros autores este parámetro permanece estable sin influirle las variaciones de temperatura durante el almacenamiento (Consentino, Tuberoso, Pisiano, Cherchi, Spanedda & Palmas, 1996; Gonnet, 1965; Jiménez et al., 1994).

5.2.4. Acidez

La acidez de las muestras almacenadas a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tablas 25, 26, 27 y 28) presenta ligeras variaciones con tendencia a aumentar en el tiempo. En las condiciones estudiadas, ninguna muestra superó el límite máximo establecido por la legislación, que corresponde a 50 meq/kg de acidez libre (Real Decreto 1049/2003).

Tabla 25. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en vidrio

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	21,80 ± 0,50	19,37 ± 0,75	18,36 ± 0,93	16,57 ± 0,68
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,99 ± 0,50	4,50 ± 0,50	5,00 ± 0,51	6,02 ± 0,93
A Total	18,20 ± 0,62	25,80 ± 0,03	23,87 ± 0,97	23,36 ± 0,98	22,91 ± 0,96

Tabla 26. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en cerámica

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	17,34 ± 0,38	17,10 ± 0,51	17,17 ± 0,52	17,94 ± 0,85
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,57 ± 0,81	4,99 ± 1,00	5,49 ± 0,50	6,33 ± 1,00
A Total	18,20 ± 0,62	20,90 ± 0,93	22,10 ± 0,95	22,67 ± 0,39	24,27 ± 0,80

Tabla 27. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en PET

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	18,82 ± 0,99	17,52 ± 0,98	18,00 ± 0,84	20,09 ± 1,00
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,32 ± 0,77	5,16 ± 0,96	5,32 ± 0,87	5,50 ± 0,87
A Total	18,20 ± 0,62	22,15 ± 0,94	22,68 ± 0,58	23,34 ± 0,82	27,19 ± 0,91

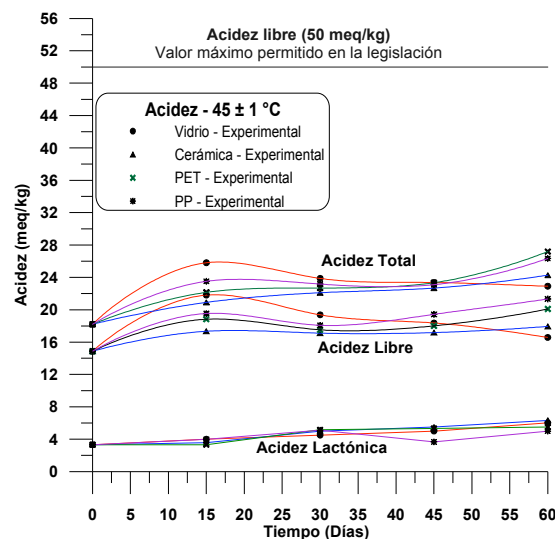
Tabla 28. Acidez a 45 ± 1 °C, almacenadas en PP

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	19,53 ± 0,99	18,07 ± 0,87	19,42 ± 0,95	21,34 ± 0,96
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,97 ± 0,51	5,10 ± 0,36	3,66 ± 0,76	5,00 ± 0,93
A Total	18,20 ± 0,62	23,51 ± 0,91	23,17 ± 0,91	23,09 ± 0,22	26,34 ± 0,67

En la Figura 40 se muestra la evolución de la acidez a 45 ± 1 °C, que en términos generales, la acidez total permanece estable con ligeras variaciones entre los 18 y 26 meq/kg. La acidez libre varía entre 15 y 22 meq/kg y la acidez lactónica es la más estable de las tres y solamente varía entre 2 y 4 meq/kg.

Estudios realizados por Jiménez et al. (1994), en muestras de miel cruda almacenadas en frascos de vidrio, a lo largo de dos años a temperaturas en torno a 5 °C y a 28 °C, con medidas a 6, 12, 18 y 24 meses, presentan como resultados que la acidez de la miel cambia significativamente por influencia del tiempo y el contenido de humedad (variación de 21,5 a 27,2 meq/kg) y en cambio con la temperatura no se presentan diferencias significativas, este último factor coincidente con nuestro estudio.

Figura 40. Evolución de la acidez a 45 ± 1 °C



Muchos autores señalan que la acidez libre se incrementa ligeramente con el tiempo por acción del almacenamiento o por fermentación originada por la transformación de azúcares en alcohol debido a la acción de las levaduras presentes en la miel (Bath & Singh, 2000; Cavia et al., 2007; Gonnet, 1965; Jiménez et al., 1994; Sancho et al., 1991 a; White et al., 1975).

Otros estudios que abordan la evolución de la acidez de la miel por influencia de la granulación inducida estando las muestras almacenadas durante 30 meses a temperatura entre 15 y 25 °C, encuentran incrementos continuos en la acidez libre debido a la actividad del enzima glucosa – oxidasa presente en la miel

(Cavia et al., 2007; Montes, 1996). El aumento de la acidez libre se debe principalmente a compuestos como el ácido levulínico y fórmico que se forman en la reacción donde se forma el hidroximetilfurfural (Cavia et al., 2007).

La acidez láctica varía levemente durante el almacenamiento (Gonnet, 1965; Krauze et al., 1991) dependiendo del balance químico que se presente entre los ácidos que se encuentran en la miel.

5.2.5. Actividad diastasa

En la Tabla 29 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar de la Actividad Diastasa en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a 45 ± 1 °C.

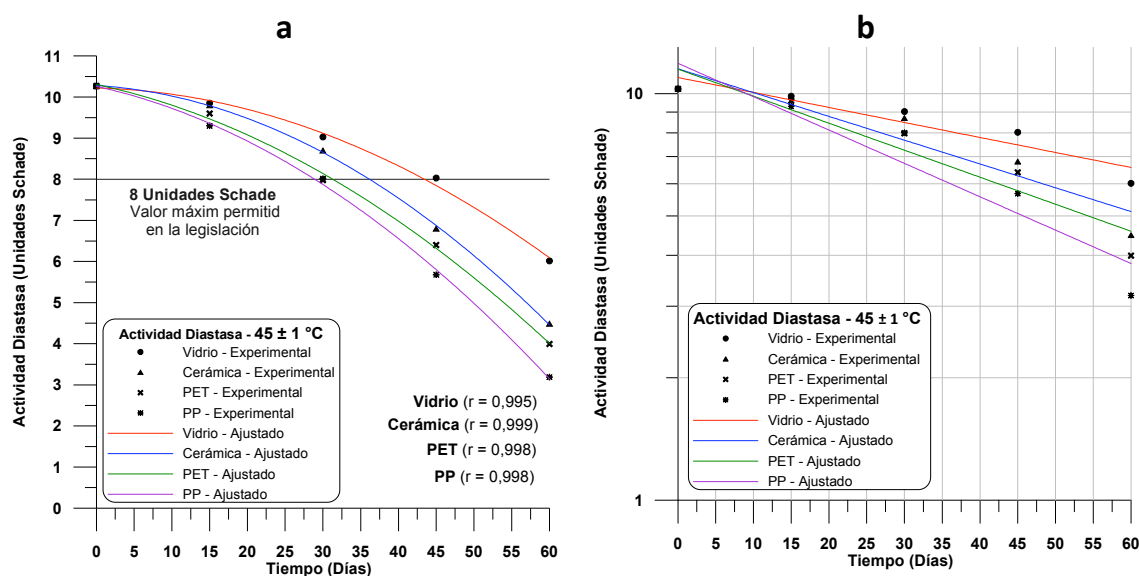
Tabla 29. Actividad diastasa a 45 ± 1 °C

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	10,26 ± 0,40	9,85 ± 0,16	9,03 ± 0,28	8,03 ± 0,54	6,01 ± 0,34
Cerámica	10,26 ± 0,40	9,80 ± 0,32	8,69 ± 0,23	6,80 ± 0,35	4,48 ± 0,35
PET	10,26 ± 0,40	9,59 ± 0,47	7,97 ± 0,28	6,39 ± 0,57	3,99 ± 0,16
PP	10,26 ± 0,40	9,29 ± 0,38	8,00 ± 0,03	5,68 ± 0,19	3,19 ± 0,26

La actividad diastasa tiene diferencias con significancia estadística en las muestras almacenadas a 45 ± 1 °C debido a los materiales de envase. Los descensos observados son de 7,1, 6,3, 5,8 y 4,3 Unidades Schade a los 29, 31, 36 y 43 días, para PP, PET, cerámica y vidrio, respectivamente (Figura 41). Los valores alcanzados se sitúan por debajo del límite permitido por la legislación (8 Unidades Schade) (Real Decreto 1049/2003).

Las mieles frescas difieren del contenido de actividad diastasa según su origen botánico destacando que en nuestro estudio la miel utilizada es de milflores con predominancia de romero y almendro, la cual presentó una baja actividad enzimática inicial (10.26 Unidades Schade). En investigaciones realizadas, el índice Diastásico para mieles de romero es $9,7 \pm 3,2$ Unidades Schade (Persano-Oddo & Piro, 2004). El clima también es un factor que influye en la actividad diastasa de las mieles, así la que se produce en climas cálidos tiene niveles bajos de actividad diastasa (Persano-Oddo, Piazza, Sabatini & Accorti, 1995; Sánchez, 1999; Singh & Kuar Bath, 1997; White, 1992).

Figura 41. Evolución de la actividad diastasa a 45 ± 1 °C



El índice de diastasa disminuye durante el procesamiento, calentamiento y almacenamiento prolongados (Huidobro et al., 1995).

La cinética de la actividad diastasa durante el almacenamiento fue determinada en un trabajo sobre envejecimiento de la miel (Sancho et al., 1992) en el que la actividad enzimática demostró frente al tiempo tres comportamientos diferentes: relación lineal entre el logaritmo de la actividad diastasa y el tiempo

de almacenamiento (68,7% de las muestras), relación lineal entre la actividad diastasa y el tiempo de almacenamiento (21,7% de las muestras) y relación asintótica (9,6% de las muestras) (Sancho et al., 1992).

Bogdanov, 1993 señala que someter la miel a 40°C durante 31 días puede destruir la actividad diastasa de ella, resultados coincidentes con nuestro estudio (Figura 41).

En otro trabajo que aborda la modificación de la actividad diastasa por acción del calentamiento se ensayan variaciones de temperaturas entre 60 °C y 100°C y tiempos entre 0 y 20 minutos, encontrándose que la actividad enzimática muestra un descenso entre 25,8 a 8,1 unidades (Tosi, Martinet, Ortega, Lucero & Ré, 2008).

La correlación entre parámetros analíticos demuestra que entre la actividad diastasa de las muestras almacenadas a 45 ± 1 °C y el contenido de HMF existe una correlación inversa (-0.963) y una correlación directa con la actividad invertasa (0.890).

5.2.6. Actividad invertasa

En la Tabla 30 se observan las medias con su correspondiente desviación estándar de la actividad invertasa en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a 45 ± 1 °C.

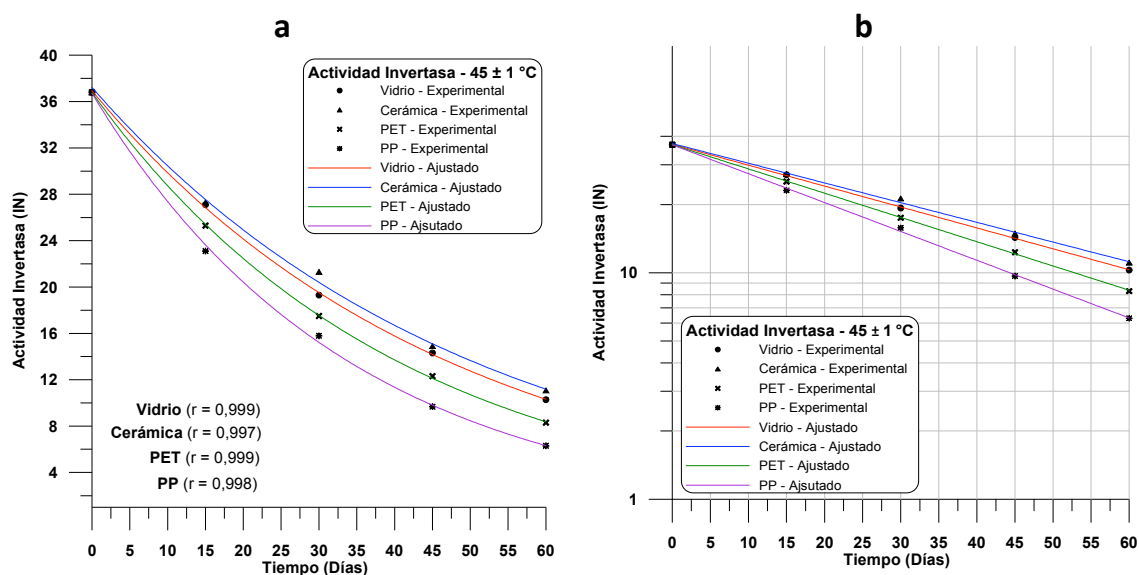
Tabla 30. Actividad invertasa a 45 ± 1 °C

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	$36,80 \pm 0,08$	$27,10 \pm 0,20$	$19,29 \pm 0,11$	$14,31 \pm 0,09$	$10,28 \pm 0,06$
Cerámica	$36,80 \pm 0,08$	$27,30 \pm 0,12$	$21,29 \pm 0,09$	$14,90 \pm 0,10$	$11,08 \pm 0,10$
PET	$36,80 \pm 0,08$	$25,29 \pm 0,27$	$17,50 \pm 0,15$	$12,31 \pm 0,09$	$8,29 \pm 0,19$
PP	$36,80 \pm 0,08$	$23,10 \pm 0,15$	$15,79 \pm 0,08$	$9,68 \pm 0,10$	$6,30 \pm 0,17$

La actividad invertasa de las muestras de miel ofrece un descenso considerable durante el almacenamiento a 45 ± 1 °C, con diferencias significativas estadísticamente entre los materiales de envase, siendo el PP y la cerámica los que mayores y menores variaciones presentan, respectivamente. La variaciones de actividad invertasa, de mayor a menor grado, fueron: 30,5 IN, 27,9, 26,52 y 25,7, para el PP, PET, vidrio y cerámica, respectivamente. (Figura 42)

Un estudio sobre el efecto de la temperatura sobre la calidad de la miel en almacenamiento, indican que la actividad invertasa es más sensible al calentamiento que la actividad diastasa (White, White, Kushnir & Subers, 1964). En nuestro caso sí que hay variaciones más altas en la actividad invertasa como puede observarse en la Figura 42 a.

Hardorn & Zürcher, 1962 proponen que el valor mínimo de invertasa sea de 29 μ moles 4-nitrophenil – α – D – glucopiranósido/kg miel/ min. Suiza y Alemania fijan actividades mínimas de 59 y 74 μ moles 4-nitrophenil – α – D – glucopiranósido/kg miel/ min, respectivamente (Aldcorn, Wandler & Sporns, 1985; Sánchez, 1999). En el País Vasco el Label para la calidad de la miel fija una actividad mínima de 59 μ moles 4-nitrophenil – α – D – glucopiranósido/kg miel/ min para miel multifloral (Boletín Oficial del País Vasco, 1993)

Figura 42. Evolución de la actividad invertasa a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 

La evolución de la actividad invertasa a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, presenta comportamientos diferentes para los materiales de envase, las muestras más estables son las almacenadas en cerámica y el vidrio, las mayores variaciones se presentan en el PET y PP, esta discriminación se apoya en las pendientes de las rectas que se muestran en la Figura 42b.

La actividad invertasa en la miel varía considerablemente según el origen botánico de, el grado de transformación del néctar y la raza de las abejas (Ivanov, 1978). Los valores de la invertasa encontrados en mieles españolas se hallan entre 1,2 y 36,8 IN (Serrano, Espejo, Villarejo & Jodral, 2007), que en su mayoría corresponden a mieles milflores.

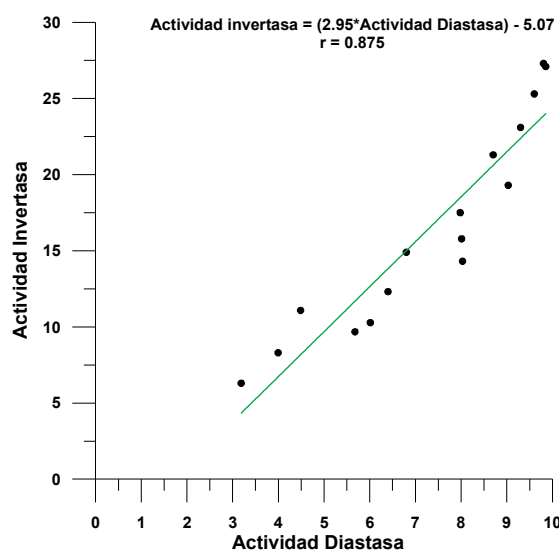
La cinética del comportamiento de la actividad invertasa en el tiempo se determinó en un estudio realizado en dos años (Sánchez et al., 2001) y allí se especifica que el 56% de las muestras tiene un comportamiento exponencial, el 25% de las muestras un comportamiento lineal, un 11% de las muestras logarítmico, un 5% de las muestras un comportamiento inverso y 3% un

comportamiento cuadrático. El comportamiento de las muestras almacenadas en nuestro experimento muestra un ajuste exponencial (Figuras 42 a y b).

Entre la actividad invertasa de las muestras almacenadas a 45 ± 1 °C y el contenido de HMF hay una correlación inversa (-0.834) y una correlación directa con la actividad diastasa (0.890).

En cuanto a la correlación entre los dos enzimas (Figura 43), la actividad diastasa y actividad invertasa en las muestras almacenadas a temperatura de 45 ± 1 °C muestran correlación altamente significativa, el ajuste lineal tiene un $r = 0.875$ y un coeficiente de correlación de Pearson de 0,890, confirmándose la relación invertasa/diastasa como un buen criterio de evaluación del grado de frescura de las mieles. Los valores de r oscilan entre 0,700 y 0,878 (Aldcorn et al., 1985; Horn & Boehm, 2004; Huidobro et al., 1995; Krauze et al., 1991; Persano-Oddo, Piazza & Pulcino, 1999; Serrano et al., 2007; Vit & Pulcini, 1996), comparables con nuestros resultados.

Figura 43. Relación entre la actividad invertasa y diastasa a 45 ± 1 °C



En el análisis estadístico, el coeficiente de correlación de Pearson mide hasta qué punto dos variables continuas están linealmente relacionadas. En el caso de la correlación de la actividad diastasa e invertasa este valor es de 0,890 para las muestras almacenadas a 45 ± 1 °C.

5.2.7. Contenido de fenoles totales

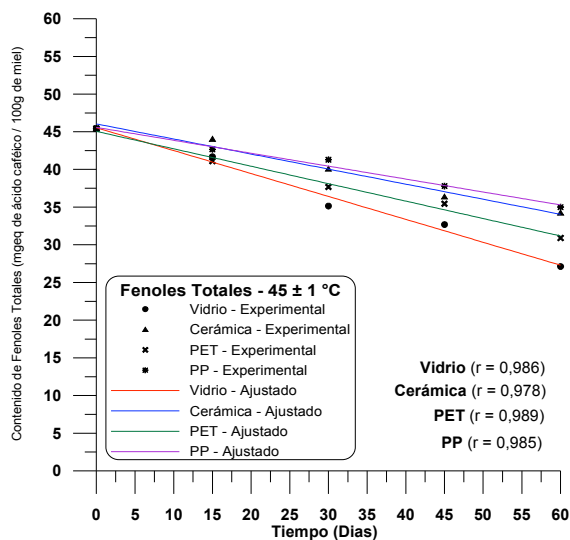
En la Tabla 31 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de fenoles totales en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a 45 ± 1 °C.

Tabla 31. Contenido de fenoles totales a 45 ± 1 °C

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	45,43 \pm 0,43	41,70 \pm 0,88	35,14 \pm 0,93	32,69 \pm 0,88	27,12 \pm 0,69
Cerámica	45,43 \pm 0,43	44,05 \pm 0,97	40,09 \pm 0,86	36,30 \pm 0,71	34,25 \pm 0,90
PET	45,43 \pm 0,43	41,09 \pm 0,65	37,68 \pm 0,85	36,35 \pm 0,98	30,90 \pm 0,81
PP	45,43 \pm 0,43	42,67 \pm 0,92	41,29 \pm 0,64	37,79 \pm 0,77	35,00 \pm 0,99

La Figura 44 muestra la forma cómo cambian los fenoles totales en el periodo de los 60 días de almacenamiento. Observando un comportamiento lineal descendente entre 45 y 25 mg de ácido caféico/100 g de miel. Las muestras más estables son las almacenadas en PP y le siguen la cerámica el PET y el vidrio, siendo este último el que presenta mayores variaciones.

Figura 44. Evolución del contenido de fenoles totales a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$



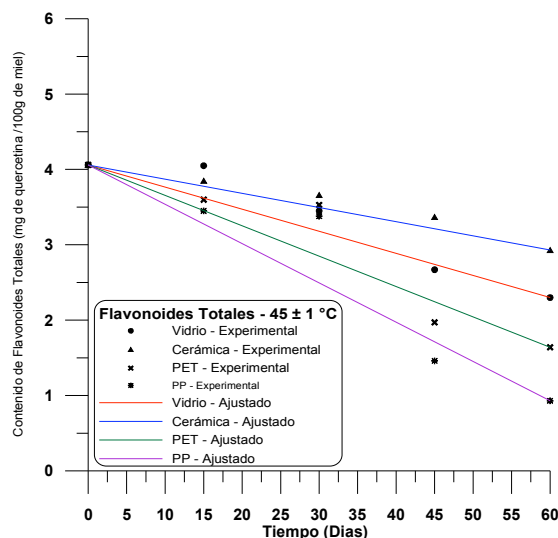
5.2.8. Contenido de flavonoides totales

En la Tabla 32 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de flavonoides totales en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla 32. Contenido de flavonoides totales a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	$4,06 \pm 0,33$	$4,04 \pm 0,33$	$3,45 \pm 0,25$	$2,66 \pm 0,24$	$1,65 \pm 0,48$
Cerámica	$4,06 \pm 0,33$	$3,84 \pm 0,55$	$3,66 \pm 0,24$	$3,36 \pm 0,42$	$2,93 \pm 0,38$
PET	$4,06 \pm 0,33$	$3,59 \pm 0,15$	$3,52 \pm 0,27$	$1,97 \pm 0,46$	$1,63 \pm 0,57$
PP	$4,06 \pm 0,33$	$3,45 \pm 0,22$	$3,38 \pm 0,38$	$1,45 \pm 0,28$	$0,93 \pm 0,21$

La Figura 45 muestra la forma cómo cambian los flavonoides totales en el periodo de los 60 días de almacenamiento. Observando un comportamiento lineal descendente entre 4 y 1 mg de quercetina/100 g de miel. Las muestras más estables son las almacenadas en cerámica y le siguen el vidrio, el PET y el PP, siendo este último el que presenta mayores variaciones.

Figura 45. Evolución del contenido de flavonoides totales a 45 ± 1 °C

5.2.9. Actividad antioxidante

En la Tabla 33 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar de la actividad antioxidante en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a 45 ± 1 °C.

Tabla 33. Actividad antioxidante a 45 ± 1 °C

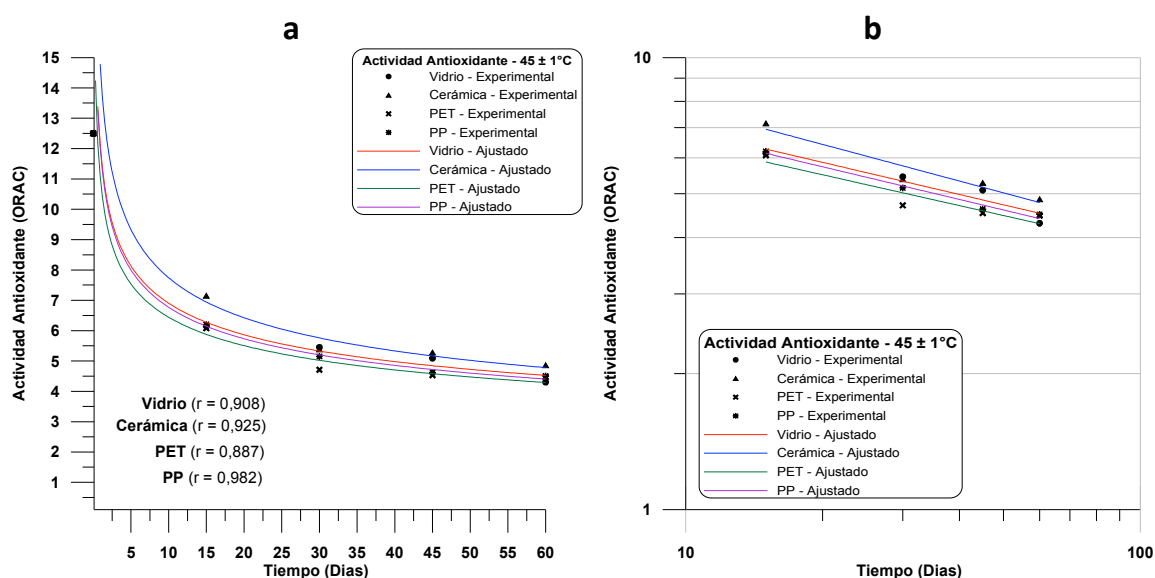
Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	12,49 ± 0,48	6,42 ± 0,51	5,67 ± 0,25	5,08 ± 0,15	4,54 ± 0,06
Cerámica	12,49 ± 0,48	6,88 ± 0,16	5,38 ± 0,63	5,28 ± 0,06	4,86 ± 0,23
PET	12,49 ± 0,48	6,08 ± 0,13	4,70 ± 0,14	4,53 ± 0,17	4,38 ± 0,07
PP	12,49 ± 0,48	5,57 ± 0,14	4,50 ± 0,15	4,45 ± 0,16	4,30 ± 0,07

La Figura 46 a y b muestra la misma información para la evolución de la actividad antioxidante a 45 ± 1 °C durante el almacenamiento, la diferencia está en las escalas de los dos ejes de las gráficas y su bondad radica en que la información está puesta de una manera tal que permite una fácil interpretación.

La Figura 46b muestra el comportamiento de la evolución de la actividad antioxidante a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en el periodo de experimentación.

La evolución de la actividad antioxidante para los diferentes envases se presenta en rectas paralelas que en términos generales tienen la misma variación por unidad de tiempo, la diferencia radica en el nivel de la magnitud de la actividad antioxidante, se observa que el material que tiene mayor influencia es el PET y le siguen en su orden el PP el vidrio y cerámica.

Figura 46. Evolución de la actividad antioxidante a $45 \pm 1^\circ\text{C}$



5.3. Influencia de la iluminación

5.3.1. Contenido del HMF

En las Tablas 34 y 35 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de HMF en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis a con iluminación y sin iluminación.

Tabla 34. Contenido de HMF con iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,03 ± 0,45	4,70 ± 0,15	5,30 ± 0,41	6,02 ± 0,15	6,85 ± 0,16
Cerámica	4,03 ± 0,45	4,51 ± 0,20	4,95 ± 0,15	5,60 ± 0,20	6,20 ± 0,17
PET	4,03 ± 0,45	4,60 ± 0,16	5,10 ± 0,25	5,80 ± 0,21	6,35 ± 0,16
PP	4,03 ± 0,45	4,83 ± 0,18	5,30 ± 0,18	6,10 ± 0,25	7,10 ± 0,60

Tabla 35. Contenido del HMF sin iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,03 ± 0,45	4,10 ± 0,20	4,18 ± 0,16	4,25 ± 0,20	4,40 ± 0,20
Cerámica	4,03 ± 0,45	4,11 ± 0,35	4,20 ± 0,16	4,32 ± 0,20	4,60 ± 0,40
PET	4,03 ± 0,45	4,20 ± 0,30	4,41 ± 0,21	4,60 ± 0,23	4,80 ± 0,14
PP	4,03 ± 0,45	4,18 ± 0,15	4,19 ± 0,14	4,39 ± 0,32	4,90 ± 0,11

En las Figuras 47 y 48 se observa la influencia de la iluminación sobre el contenido de HMF en las muestras almacenadas, los análisis de varianza solo indican diferencias en las muestras almacenadas con iluminación a $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ influenciadas por los materiales de envase.

Figura 47. Evolución del contenido de

HMF con iluminación

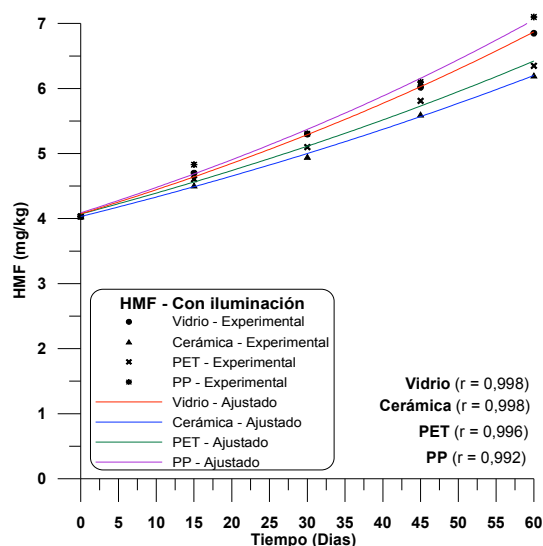
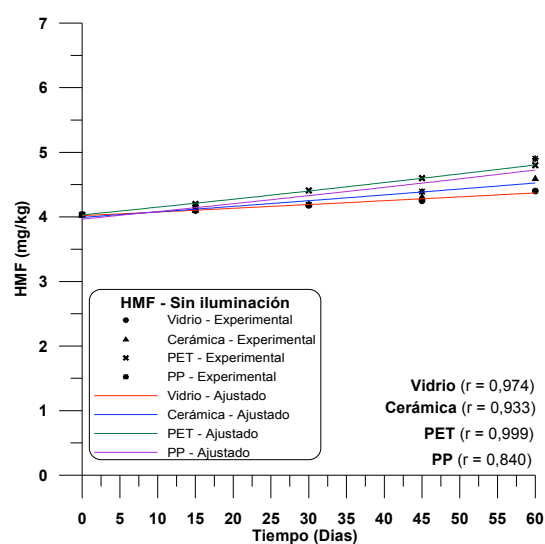


Figura 48. Evolución del contenido de

HMF sin iluminación



Las muestras almacenadas con iluminación a 20 ± 5 °C tuvieron variaciones en el contenido de HMF hasta de 3 mg/kg.

Para las muestras almacenadas sin iluminación a 20 ± 5 °C (Figura 48), el único factor que tiene influencia sobre la formación de HMF en miel, es el tiempo ($p < 0,01$). Se midieron las variaciones y no superan 1mg/kg con respecto a la muestra inicial. Haciendo una comparación con las muestras almacenadas a 45 ± 1 °C, los cambios en el HMF son muy pequeños.

5.3.2. Color

Las muestras de miel almacenadas con y sin iluminación a 20 ± 5 °C muestran diferencias de color (Tablas 36 y 37) poco apreciables y se observa que las muestras a las cuales les influye la iluminación tienen variaciones más altas que aquellas que permanecen en oscuridad.

Tabla 36. Diferencias de color para muestras almacenadas con iluminación

Tiempo	ΔE^* Vidrio	ΔE^* Cerámica	ΔE^* PET	ΔE^* PP
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15.00	1.44	1.79	0.94	1.43
30.00	2.09	2.54	0.32	0.31
45.00	0.85	3.71	2.99	3.02

Tabla 37. Diferencias de color para muestras almacenadas sin iluminación

Tiempo	ΔE^* Vidrio	ΔE^* Cerámica	ΔE^* PET	ΔE^* PP
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15.00	1.80	1.94	2.34	0.78
30.00	3.73	1.94	2.42	3.52
45.00	2.62	3.77	2.90	3.38
60.00	2.65	2.85	2.97	3.71

5.3.3. pH

En las Tablas 38 y 39 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del pH en cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 38. pH con iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,09 ± 0,03	4,03 ± 0,01	3,83 ± 0,01	3,92 ± 0,03	3,94 ± 0,02
Cerámica	4,09 ± 0,03	3,98 ± 0,01	3,73 ± 0,02	3,88 ± 0,01	3,93 ± 0,02
PET	4,09 ± 0,03	3,99 ± 0,02	3,90 ± 0,02	3,93 ± 0,03	3,91 ± 0,02
PP	4,09 ± 0,03	4,00 ± 0,03	3,71 ± 0,01	3,91 ± 0,02	3,93 ± 0,01

Tabla 39. pH sin iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,09 ± 0,03	3,91 ± 0,02	3,88 ± 0,02	3,92 ± 0,03	3,76 ± 0,02
Cerámica	4,09 ± 0,03	3,93 ± 0,01	3,84 ± 0,02	3,88 ± 0,01	3,74 ± 0,01
PET	4,09 ± 0,03	3,91 ± 0,02	3,87 ± 0,02	3,93 ± 0,03	3,72 ± 0,02
PP	4,09 ± 0,03	3,91 ± 0,01	3,84 ± 0,01	3,91 ± 0,01	3,71 ± 0,01

Los materiales de envase sometidos a condiciones de iluminación no son un factor que tenga diferencias significativas estadísticamente sobre el pH de las muestras almacenadas.

Las muestras almacenadas con iluminación a 20 ± 5 °C tienen un descenso de pH a los 30 días de almacenamiento, pero el pH vuelve a ascender, por lo tanto el valor de pH inicial de las muestras y el valor final de las mismas, tiene variaciones alrededor de 0,2 – 0,5 unidades (Figura 49). A diferencia de las muestras almacenadas sin iluminación, que tienen un ligero descenso del pH (Figura 50).

Figura 49. Evolución del pH con iluminación

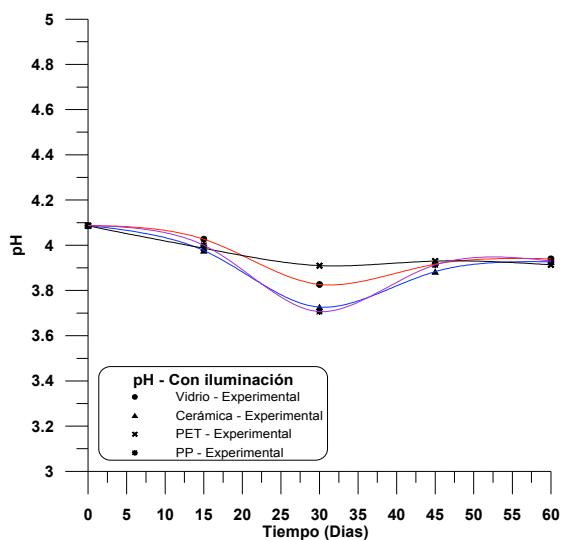
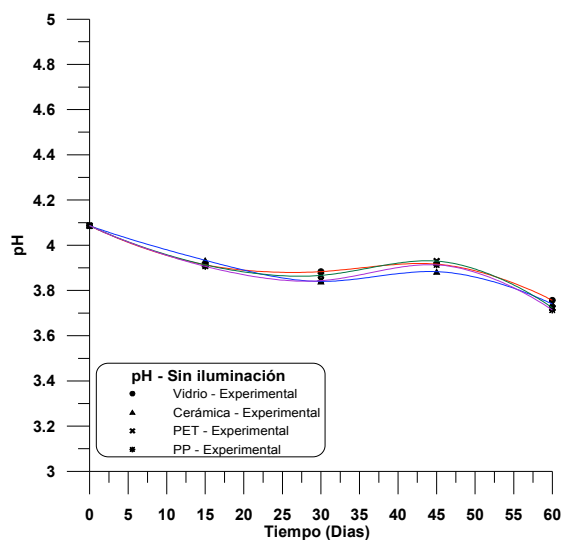


Figura 50. Evolución del pH sin iluminación



5.3.4. Acidez

En las Tablas 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar de la acidez cada uno de los materiales de envase durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 40. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en vidrio

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	17,93 ± 0,87	19,74 ± 0,96	18,60 ± 0,84	20,25 ± 0,92
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,33 ± 0,76	4,83 ± 0,29	2,99 ± 0,50	4,66 ± 0,76
A Total	18,20 ± 0,62	21,26 ± 0,33	24,58 ± 0,92	21,60 ± 0,95	24,91 ± 0,99

Tabla 41. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en cerámica

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	17,70 ± 0,93	20,21 ± 0,86	18,99 ± 1,00	20,12 ± 0,80
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,66 ± 0,76	4,49 ± 1,0	3,16 ± 0,96	2,66 ± 0,76
A Total	18,20 ± 0,62	21,37 ± 0,66	24,71 ± 0,63	22,15 ± 0,99	22,78 ± 0,86

Tabla 42. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en PET

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	19,23 ± 0,97	19,49 ± 0,96	17,77 ± 0,70	20,75 ± 0,97
A Lactónica	3,33 ± 0,76	2,99 ± 0,50	4,83 ± 0,50	4,66 ± 0,76	2,82 ± 0,76
A Total	18,20 ± 0,62	22,23 ± 0,91	24,32 ± 0,08	22,44 ± 0,90	23,59 ± 0,57

Tabla 43. Acidez con iluminación de muestras almacenadas en PP

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	18,59 ± 0,95	19,77 ± 0,51	17,05 ± 0,90	24,32 ± 0,24
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,83 ± 0,76	4,99 ± 0,50	4,66 ± 1,04	3,83 ± 0,29
A Total	18,20 ± 0,62	22,42 ± 0,82	24,77 ± 0,38	21,72 ± 0,19	28,15 ± 0,08

Tabla 44. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en vidrio

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	19,18 ± 0,84	17,53 ± 0,90	20,62 ± 0,56	24,43 ± 0,78
A Lactónica	3,33 ± 0,76	2,99 ± 0,50	4,53 ± 0,50	5,00 ± 0,50	4,50 ± 0,87
A Total	18,20 ± 0,62	22,18 ± 0,92	22,06 ± 0,89	25,62 ± 0,63	28,93 ± 0,99

Tabla 45. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en cerámica

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	17,25 ± 0,76	17,67 ± 0,23	20,57 ± 0,26	22,78 ± 0,68
A Lactónica	3,33 ± 0,76	2,83 ± 0,98	5,66 ± 0,29	3,16 ± 0,76	3,32 ± 1,58
A Total	18,20 ± 0,62	20,09 ± 0,82	23,33 ± 0,21	23,73 ± 0,50	26,11 ± 0,88

Tabla 46. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en PET

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	19,51 ± 0,98	17,48 ± 0,40	18,99 ± 0,80	23,37 ± 0,93
A Lactónica	3,33 ± 0,76	2,49 ± 1,00	6,16 ± 0,58	4,66 ± 0,76	2,99 ± 0,95
A Total	18,20 ± 0,62	22,01 ± 0,99	23,65 ± 0,44	23,66 ± 0,45	26,37 ± 0,80

Tabla 47. Acidez sin iluminación de muestras almacenadas en PP

Valor Medio	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
A Libre	14,87 ± 0,69	16,22 ± 0,70	18,04 ± 0,23	20,67 ± 0,99	22,48 ± 0,95
A Lactónica	3,33 ± 0,76	3,15 ± 0,77	4,49 ± 0,50	3,16 ± 0,92	3,66 ± 0,76
A Total	18,20 ± 0,62	19,38 ± 0,86	22,53 ± 0,48	23,83 ± 0,28	26,14 ± 0,98

La acidez de las muestras de miel almacenadas con y sin iluminación no tienen diferencias significativas estadísticamente por efecto de los materiales de envase, el factor tiempo y la interacción de los factores Envases*Tiempo son los que mayor influencia tienen en las muestras de miel. (Figura 51 y 52).

Figura 51. Evolución de la acidez con iluminación

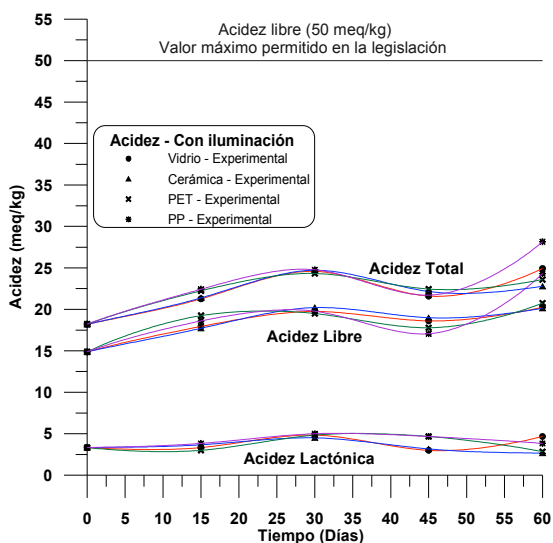
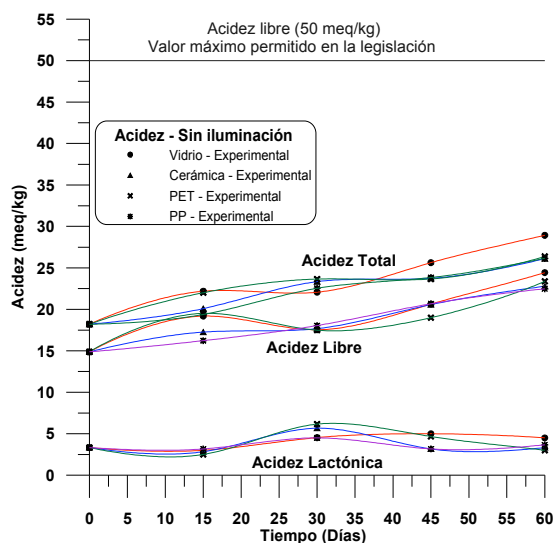


Figura 52. Evolución de la acidez sin iluminación



Las muestras almacenadas con iluminación al final del periodo de almacenamiento, entre los 45 y 60 días, la acidez libre y total de las muestras envasadas en PP tienen un ascenso superior (4meq/kg) que las muestras almacenadas en otros materiales.

En ningún caso las muestras almacenadas con y sin iluminación, superan el límite máximo establecidos por la legislación para el valor de la acidez libre (Real Decreto 1049/2003).

5.3.5. Actividad diastasa

En las Tablas 48 y 49 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar de la actividad diastasa para cada uno de los materiales de envase, durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 48. Actividad diastasa con iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	10,26 ± 0,40	10,07 ± 0,25	9,53 ± 0,31	8,55 ± 0,13	7,63 ± 0,40
Cerámica	10,26 ± 0,40	10,01 ± 0,26	9,30 ± 0,10	8,48 ± 0,20	7,25 ± 0,15
PET	10,26 ± 0,40	9,80 ± 0,45	8,60 ± 0,23	7,77 ± 0,18	6,98 ± 0,08
PP	10,26 ± 0,40	9,80 ± 0,60	8,89 ± 0,13	7,49 ± 0,21	6,44 ± 0,07

Tabla 49. Actividad diastasa sin iluminación

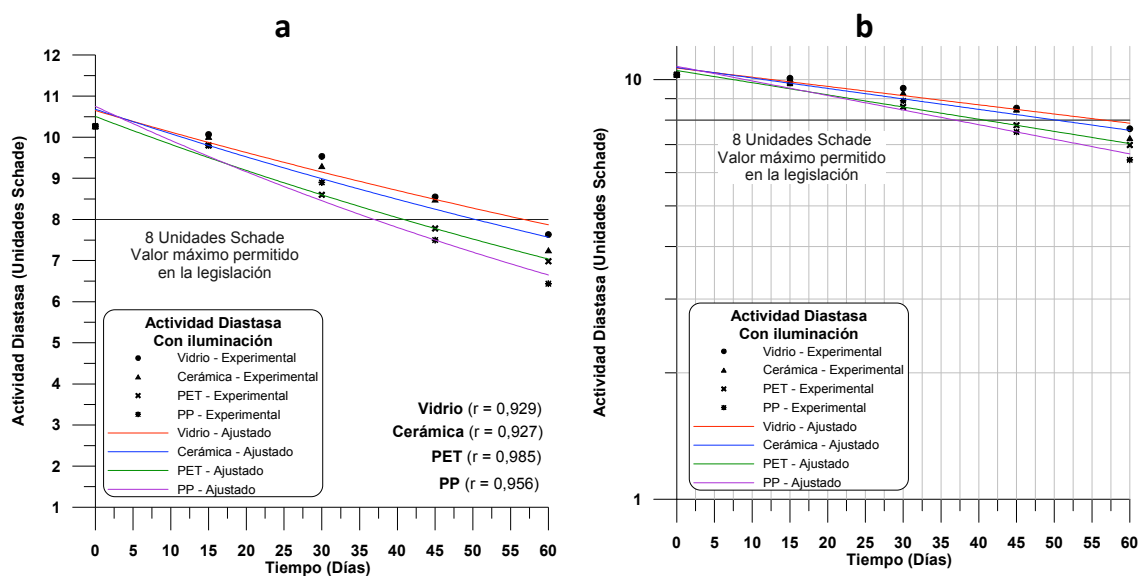
Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	10,26 ± 0,40	9,83 ± 0,08	9,26 ± 0,09	9,11 ± 0,12	8,78 ± 0,14
Cerámica	10,26 ± 0,40	9,90 ± 0,23	9,19 ± 0,07	8,80 ± 0,08	8,70 ± 0,15
PET	10,26 ± 0,40	10,02 ± 0,30	9,33 ± 0,36	8,63 ± 0,27	8,54 ± 0,41
PP	10,26 ± 0,40	9,53 ± 0,07	8,65 ± 0,14	8,44 ± 0,41	8,25 ± 0,27

En este estudio, la actividad diastasa tiene diferencias entre los materiales de envase utilizados y también por efectos del tiempo de almacenamiento. La iluminación influye en la medida de esta actividad enzimática, las muestras que ha estado bajo la influencia de la iluminación a 20 ± 5 °C, presentan diferencias mayores entre las muestras iniciales y las muestras a los 60 días de

almacenamiento que las muestras que no han estado almacenadas con influencia de la iluminación. Las muestras almacenadas en PP sobrepasan el límite permitido por la legislación (8 Unidades Schade) (Real Decreto 1049/2003) a los 41 días de almacenamiento, las almacenadas en PET a los 43 días, las almacenadas en cerámica a los 51 días y las almacenadas en vidrio a los 54 días. A diferencia de las muestras que no han sido influenciadas por la iluminación, donde ninguna muestra sobrepasa el límite legal establecido, observándose mayores variaciones en las muestras almacenadas en PP.

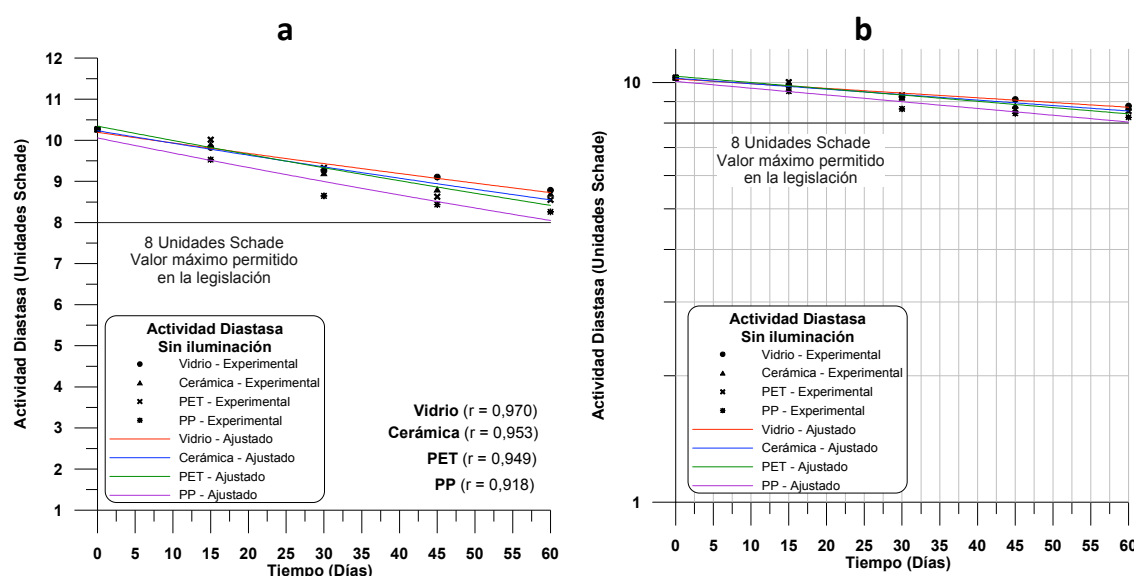
En el estudio de envejecimiento de la miel (Sancho et al., 1992) encuentra que la mayoría de las muestras analizadas en su estudio tienen una relación lineal entre el logaritmo de la actividad diastasa y el tiempo (68,7% de las muestras), como se puede observar en las Figuras 53 a y b y 54 a y b, el comportamiento de las muestras de este estudio también tiene ese comportamiento y se puede diferenciar el comportamiento entre los materiales de envase utilizados.

Figura 53. Evolución de la actividad diastasa con iluminación



El comportamiento de las muestras en el tiempo es lineal con el logaritmo de la actividad diastasa para las muestras con y sin iluminación los coeficientes de correlación son de 0,92, 0,92, 0,98 y 0,95 para vidrio, PET, cerámica y PP, respectivamente. Las muestras almacenadas sin iluminación tienen variaciones pequeñas hasta de 2 Unidades Schade los 60 días de almacenamiento.

Figura 54. Evolución de la actividad diastasa sin iluminación



5.3.6. Actividad invertasa

En las Tablas 50 y 51 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar de la actividad invertasa para cada uno de los materiales de envase, durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 50. Actividad invertasa con iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	36,80 ± 0,08	32,09 ± 0,35	28,60 ± 0,32	27,60 ± 0,17	26,70 ± 0,08
Cerámica	36,80 ± 0,08	33,90 ± 0,12	33,30 ± 0,17	33,49 ± 0,08	33,00 ± 0,09
PET	36,80 ± 0,08	33,10 ± 0,10	31,30 ± 0,17	30,50 ± 0,11	30,80 ± 0,16
PP	36,80 ± 0,08	35,10 ± 0,13	34,50 ± 0,09	34,28 ± 0,06	34,10 ± 0,10

Tabla 51. Actividad invertasa sin iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	36,80 ± 0,08	36,49 ± 0,08	36,59 ± 0,15	34,90 ± 0,10	34,86 ± 0,03
Cerámica	36,80 ± 0,08	36,63 ± 0,04	36,80 ± 0,05	35,70 ± 0,10	35,11 ± 0,39
PET	36,80 ± 0,08	34,50 ± 0,24	33,67 ± 0,14	32,57 ± 0,16	32,30 ± 0,08
PP	36,80 ± 0,08	35,90 ± 0,10	35,02 ± 0,17	35,10 ± 0,21	34,50 ± 0,12

En las Figuras 55 y 56 se observa que los cambios en la evolución de la actividad invertasa son mayores en las muestras de miel expuestas a la luminosidad, los mayores cambios están en el vidrio y los menores en el PP. Para las muestras almacenadas con iluminación, su comportamiento en el tiempo tiene un ajuste lineal con unos coeficientes de correlación de 0,88, 0,78, 0,66 y 0,80 para las muestras de vidrio, PET, cerámica y PP, respectivamente.

Las muestras almacenadas sin iluminación sufren cambios más pequeños y el orden de influencia de los materiales de envase es diferente. En este caso las muestras menos afectadas son las almacenadas en vidrio y cerámica y las más afectadas son las almacenadas en PP y PET. El comportamiento de la actividad invertasa en el tiempo sin influencia de la iluminación es lineal con coeficientes de correlación de 0,80, 0,79, 0,94 y 0,90 para vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente.

Figura 55. Evolución de la actividad invertasa con iluminación

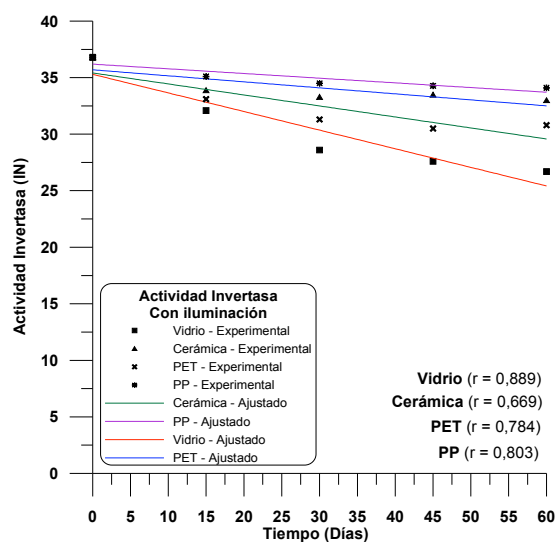
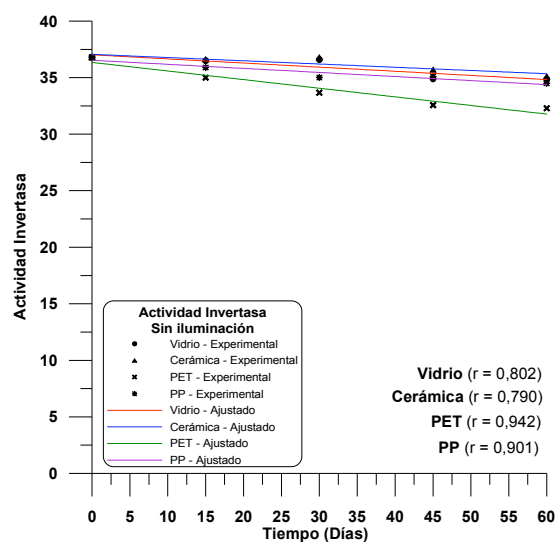


Figura 56. Evolución de la actividad invertasa sin iluminación



5.3.7. Contenido de fenoles totales

En las Tablas 52 y 53 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de fenoles totales para cada uno de los materiales de envase, durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 52. Contenido de fenoles totales con iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	45,43 ± 0,43	42,43 ± 0,06	38,50 ± 0,12	32,54 ± 0,65	29,89 ± 0,90
Cerámica	45,43 ± 0,43	43,10 ± 0,03	40,09 ± 0,03	36,04 ± 0,03	32,58 ± 0,03
PET	45,43 ± 0,43	43,27 ± 0,03	41,97 ± 0,03	37,00 ± 0,03	33,99 ± 0,03
PP	45,43 ± 0,43	44,59 ± 0,03	42,46 ± 0,06	40,11 ± 0,06	38,50 ± 0,57

Tabla 53. Contenido de fenoles totales sin iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	45,43 ± 0,43	42,99 ± 0,03	40,14 ± 0,03	38,48 ± 0,03	35,31 ± 0,58
Cerámica	45,43 ± 0,43	43,32 ± 0,10	37,91 ± 0,03	35,81 ± 0,06	32,00 ± 0,06
PET	45,43 ± 0,43	43,16 ± 0,09	39,50 ± 0,06	36,20 ± 0,03	34,02 ± 0,35
PP	45,43 ± 0,43	44,59 ± 0,23	42,45 ± 0,03	40,11 ± 0,09	38,49 ± 0,09

El contenido de fenoles totales tienen un comportamiento lineal descendente en el tiempo de almacenamiento, hay diferencias entre las muestras almacenadas con y sin iluminación (Figuras 57 y 58).

En las muestras almacenadas con iluminación el material más afectado es el vidrio y el menos afectado es el PP, el PET y la cerámica tienen un comportamiento intermedio. El ajuste del contenido de fenoles totales y tiempo es lineal con coeficientes de correlación de 0,98, 0,99, 0,95 y 0,98 para vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente.

Figura 57. Evolución del contenido de fenoles totales con iluminación

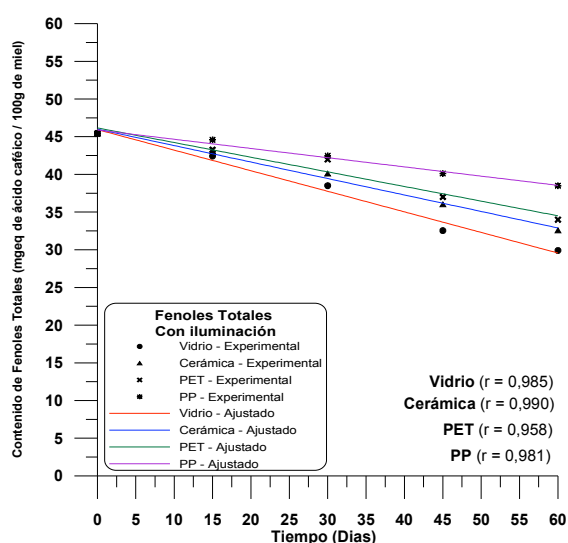
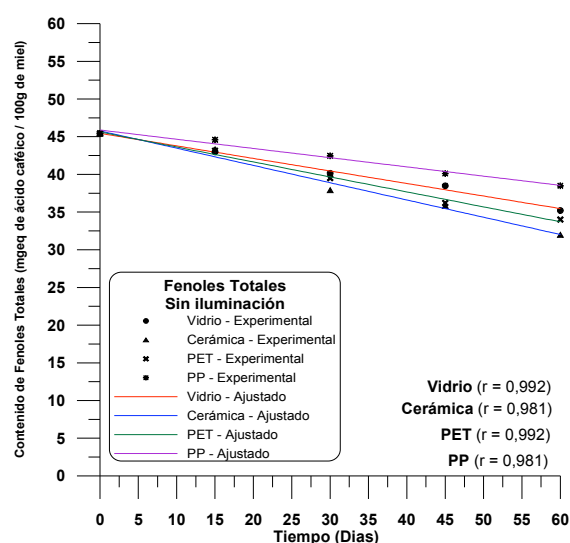


Figura 58. Evolución del contenido de fenoles totales sin iluminación



Las muestras almacenadas sin iluminación durante el almacenamiento tienen menores cambios (13, 43 mg de ácido caféico/ 100 g de miel), pero los materiales influyen de manera diferente. Las muestras almacenadas en cerámica son las que más variación tienen y las muestras almacenadas en PP las que menores variaciones presentan. Su comportamiento en el tiempo es lineal con coeficientes de correlación de 0,99, 0,98, 0,99 y 0,98 para vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente.

5.3.8. Contenido de flavonoides totales

En las Tablas 54 y 55 se consolidan las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de flavonoides totales para cada uno de los materiales de envase, durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 54. Contenido de flavonoides totales con iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,06 ± 0,33	3,66 ± 0,12	3,23 ± 0,13	2,96 ± 0,09	2,35 ± 0,22
Cerámica	4,06 ± 0,33	4,05 ± 0,09	4,05 ± 0,09	3,85 ± 0,13	3,71 ± 0,09
PET	4,06 ± 0,33	3,86 ± 0,13	3,28 ± 0,13	3,20 ± 0,13	2,74 ± 0,50
PP	4,06 ± 0,33	3,96 ± 0,13	3,89 ± 0,0	3,67 ± 0,13	3,49 ± 0,13

Tabla 55. Contenido de flavonoides totales sin iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	4,06 ± 0,33	3,99 ± 0,13	3,75 ± 0,22	3,71 ± 0,25	3,60 ± 0,13
Cerámica	4,06 ± 0,33	3,80 ± 0,13	3,66 ± 0,13	3,50 ± 0,00	3,30 ± 0,13
PET	4,06 ± 0,33	3,87 ± 0,13	3,63 ± 0,13	3,59 ± 0,30	3,35 ± 0,22
PP	4,06 ± 0,33	3,68 ± 0,44	3,35 ± 0,13	3,16 ± 0,13	2,89 ± 0,40

El contenido de flavonoides totales en las muestras de miel analizadas, tienen mayores variaciones en las muestras influenciadas por la iluminación (Figura 59), que las muestras sin iluminación (Figura 60), observándose diferencias entre el comportamiento de los materiales de envase. El vidrio y el PP sufren mayores variaciones que las muestras envasadas en cerámica y PP

El comportamiento de los flavonoides totales con y sin iluminación tiene un ajuste lineal con el tiempo de almacenamiento. Los coeficientes de correlación para las muestras con iluminación son de 0,98, 0,80, 0,96 y 0,95 y para las muestras almacenadas sin iluminación son de 0,94, 0,99, 0,97 y 0,98 para los materiales vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente.

Figura 59. Evolución del contenido de flavonoides totales con iluminación

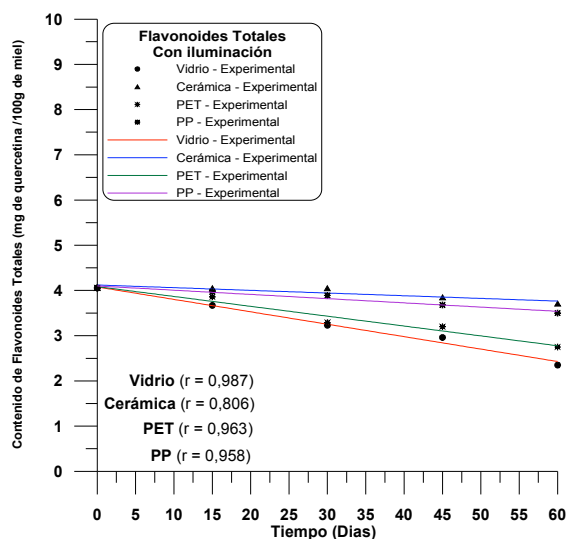
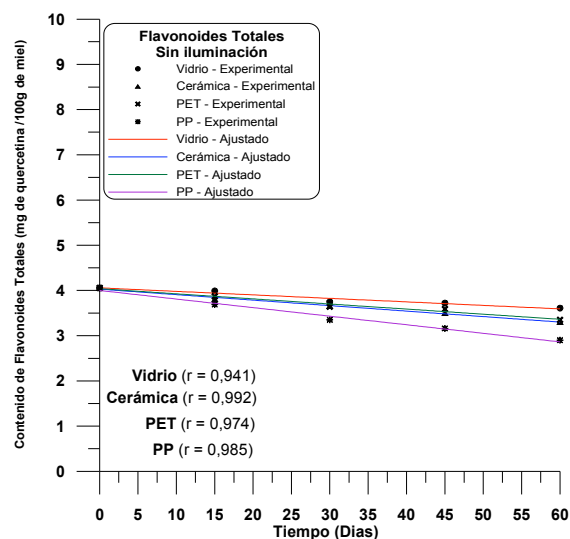


Figura 60. Evolución del contenido de flavonoides totales sin iluminación



5.3.9. Actividad antioxidante

En las Tablas 56 y 57 se muestran las medias con su correspondiente desviación estándar del contenido de flavonoides totales para cada uno de los materiales de envase, durante cada uno de los tiempos de análisis con y sin iluminación.

Tabla 56. Actividad antioxidante con iluminación

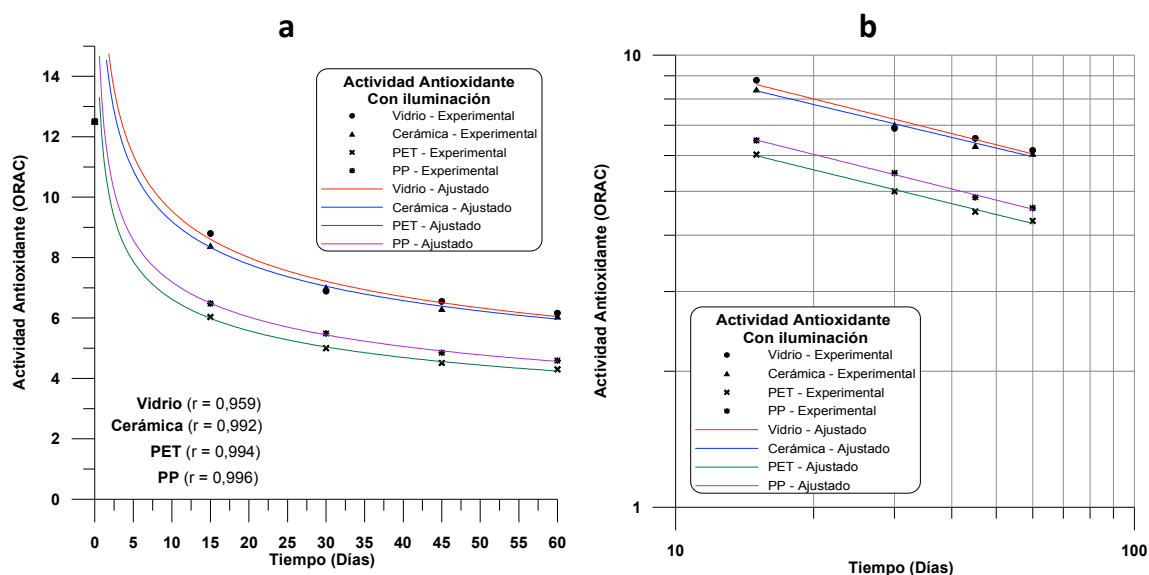
Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	12,49 ± 0,48	7,65 ± 0,42	6,66 ± 0,71	5,58 ± 0,30	5,22 ± 0,31
Cerámica	12,49 ± 0,48	8,39 ± 0,14	7,01 ± 0,18	6,30 ± 0,11	6,15 ± 0,18
PET	12,49 ± 0,48	6,03 ± 0,22	5,00 ± 0,03	4,51 ± 0,14	4,30 ± 0,09
PP	12,49 ± 0,48	6,47 ± 0,27	5,48 ± 0,15	4,85 ± 0,31	4,59 ± 0,25

Tabla 57. Actividad antioxidante sin iluminación

Material de envase	Tiempo (Días)				
	0	15	30	45	60
Vidrio	12,49 ± 0,48	6,86 ± 0,33	6,21 ± 0,58	5,88 ± 0,06	5,44 ± 0,33
Cerámica	12,49 ± 0,48	8,79 ± 0,62	7,28 ± 0,38	6,81 ± 0,55	6,25 ± 0,06
PET	12,49 ± 0,48	6,09 ± 0,07	5,70 ± 0,23	5,49 ± 0,15	5,18 ± 0,26
PP	12,49 ± 0,48	5,47 ± 0,06	5,24 ± 0,10	5,06 ± 0,06	4,79 ± 0,16

En las Figuras 61 y 62 se observan diferencias entre las muestras expuestas a la iluminación y las muestras no expuestas a iluminación. En las muestras con iluminación los materiales más afectados son el PP y el PET y los menos afectados la cerámica y el vidrio.

Figura 61. Evolución de la actividad antioxidante con iluminación

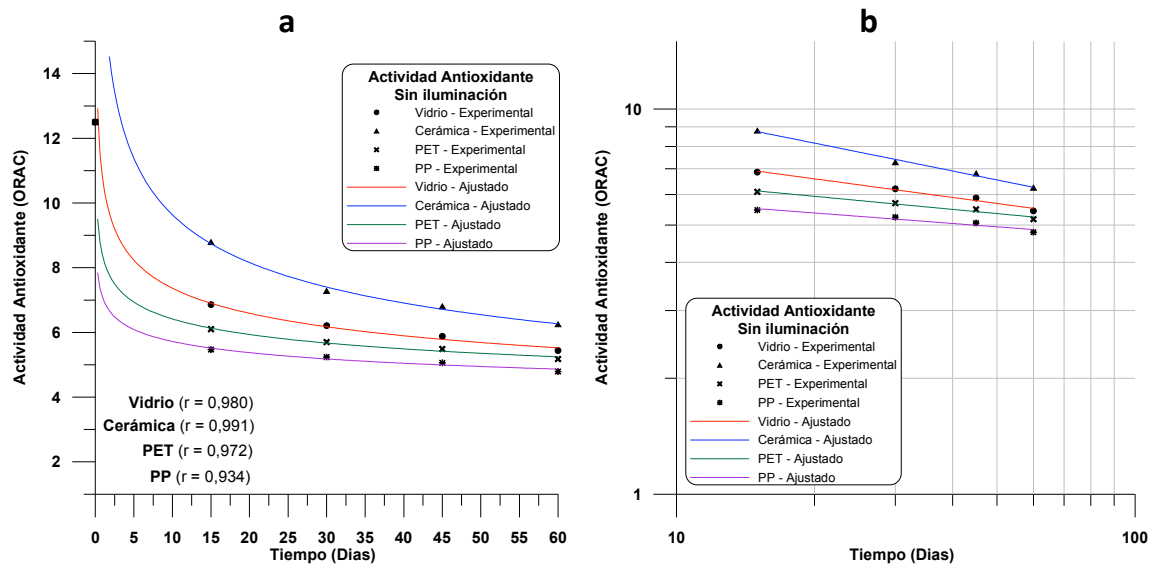


En la gráfica 61b se puede decir que la actividad antioxidante y el tiempo tienen una relación lineal con coeficiente de correlación de 0,90, 0,92, 0,88 y 0,98 para el vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente.

En la figura 61b, las variaciones son casi iguales para todas las gráficas porque sus pendientes son iguales, es decir, son paralelas, cuando las líneas se superponen significa que la magnitud de cambio es mayor (la magnitud del cambio es mayor), pero la dinámica de los procesos es la misma. La velocidad en el cambio es la misma. Solo hay una variación pequeña en la actividad antioxidante en donde el vidrio varía un poco respecto a la cerámica, el vidrio tiene una velocidad mayor que la cerámica en el proceso, los otros son paralelos.

En las Figuras 62b se puede decir que la actividad antioxidante y el tiempo tienen una relación lineal con coeficiente de correlación de 0,98, 0,99, 0,97 y 0,93 para el vidrio, cerámica, PET y PP, respectivamente. La variación por unidad de tiempo para la cerámica es mayor que para el vidrio, PET y PP.

Figura 62. Evolución de la actividad antioxidante sin iluminación



Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Primera

El diseño experimental planteado con tres factores: materiales de envase, condiciones de almacenamiento y tiempo, ha permitido evaluar simultáneamente los cambios físico-químicos y biológicos que afectan a la calidad de la miel bajo las condiciones experimentales.

Segunda

El contenido en hidroximetilfurfural (HMF), la medida de color, la actividad de los enzimas diastasa e invertasa, el contenido total de compuestos fenólicos y de flavonoides y actividad antioxidante, son parámetros de calidad que sufrieron variaciones por influencia de los materiales de envase durante el almacenamiento en las condiciones ensayadas.

Tercera

La acidez libre, láctónica y total no se ven influenciadas por el material de envase en ninguna de las condiciones ensayadas. Las variaciones presentadas son debido a la influencia del tiempo de almacenamiento y a la interacción de los factores Envases*Tiempo.

Cuarta

Todos los parámetros bioactivos (actividad diastasa, actividad invertasa, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante) se ven afectados significativamente por la influencia los materiales de envase, tiempo e interacción Envases*Tiempo en todos los niveles ensayados.

Quinta

Las muestras envasadas en cerámica son las que menos cambios sufren en el almacenamiento a 45 ± 1 °C, en líneas generales, mientras que las almacenadas en materiales plásticos, principalmente polipropileno (PP), son las que mayores variaciones sufrieron.

Sexta

De las condiciones de almacenamiento establecidas en el experimento, la temperatura de 45 ± 1 °C, seguido de la iluminación a 20 ± 5 °C y finalmente no iluminación a 20 ± 5 °C, fueron los niveles de mayor a menor incidencia sobre las muestras, excepto para el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante, en los que la temperatura e iluminación ejercen un efecto similar.

Séptima

Las muestras sometidas a 45 ± 1 °C sufren una evolución exponencial ascendente en cuanto al contenido de HMF, mientras que la actividad enzimática tiene una tendencia descendente con alto coeficiente de correlación entre los enzimas diastasa e invertasa.

Octava

El contenido de de fenoles totales y flavonoides totales muestran una evolución lineal descendente para todas las condiciones de almacenamiento ensayadas.

Resumen

7. RESUMEN

En este trabajo se ha evaluado la calidad de la miel por medio de parámetros físico-químicos y biológicos, bajo tres condiciones de almacenamiento (temperatura a 45 ± 1 °C, con y sin iluminación a 20 ± 5 °C), cuatro materiales de envase (vidrio, cerámica, tereftalato de polietileno (PET) y polipropileno (PP)) y en diferentes periodos de tiempo (a los 0, 15, 30, 45 y 60 días).

Posteriormente se ha determinado la influencia de cada uno de los factores y niveles establecidos en el diseño experimental sobre los parámetros físico-químicos (HMF, color, pH, acidez), actividad enzimática (actividad diastasa e Invertasa) y compuestos bioactivos (fenoles totales y flavonoides totales).

Se ha observado que los materiales de envase tienen influencia sobre los parámetros color, pH, actividad diastasa, actividad invertasa, fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante a 45 ± 1 °C. En líneas generales el material que mayor influencia tiene sobre los parámetros analíticos es el PP y el que menos la cerámica.

Para las muestras almacenadas con iluminación a 20 ± 5 °C, los parámetros afectados por los materiales de envase son HMF, actividad diastasa, actividad invertasa, fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante, siendo el vidrio el que mayor influencia ejerce y el PP el que menos.

Finalmente, en las muestras almacenadas sin iluminación a 20 ± 5 °C, los parámetros afectados por los materiales de envase son actividad diastasa, actividad invertasa, fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante. El

material que mayor influencia tiene sobre los parámetros analíticos es el PP y los que menos el vidrio y la cerámica.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22(9), 1041-1047.

Aldcorn, D. L., Wandler, E., & Sporns, P. (1985). Diastase (a- and b-amylase) and a-glucosidase (sucrose) activity in western Canadian honeys. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18, 268-270.

Anónimo (2007). Libro Blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural. Segunda Parte – Subsectores Ganaderos, Capítulo 19. Sector Apícola. [En línea]. *Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (Abril 2007)*, Disponible en Web: <http://www.libroblancoagricultura.com/publicacion/tomo2.asp>.

Antony, S. M., Han, I. Y., Rieck, J. R., & Dawson, P. L. (2000). Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3985-3989.

Bath, P., & Singh, N. (2000). A research note chemical changes in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey during storage. *Journal of Food Quality*, 23, 443 - 451.

Beretta, G., Grabata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Meffe, F. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric / fluorimetric assays and chemometrics. *Analitica Chimica ACTA*, 533, 185 - 191.

- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822-828.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Maria Piera Piacentini, Albertini, M. C., & Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 217 - 222.
- Bogdanov, S. (1989). Determination of pinocembrin in honey by using HPLC. *Journal of Apicultural Research*, 28, 55 - 57.
- Bogdanov, S. (1993). Liquefaction of honey. *APIACTA*, XXVIII, 4-10.
- Bogdanov, S. (2002). *Harmonised methods of the International Honey Commission*.
- Bogdanov, S., Charrière, J.-D., Imdorf, A., Kilchenmann, V., & Fluir, P. (2002). Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. *Apidologie*, 33, 399-409.
- Boletín Oficial del País Vasco (1993). Label vasca de Calidad Alimentaria de la miel. N° 207 ZK, 28 de octubre, Departamento de Agricultura y Pesca. Vitoria.
- Cao, G., HM, A., & Cutler, R. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 14, 303-311.

- Cao, G., Verdon, C., Wu, A., Wang, H., & Prior, R. (1995). Automated assay of oxygen-radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem*, *41*, 1738 - 1744.
- Cao, W., Chen, W., & Song, J. (2005). Antioxidant activities and total phenolic contents of ten different types of Chinese honey-especially buckwheat honey. *Food Science, China*, *26*(1), 48-51.
- Cavia, M. (2002). Estudio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida. *Universidad de Burgos - Facultad de Ciencias, Tesis Doctoral*.
- Cavia, M. M., Alvarez, C., Huidobro, J. F., Fernandez-Muino, M. A., & Sancho, M. T. (2008). Evolution of hydroxymethylfurfural content of honeys from different climates: influence of induced granulation. *International journal of food sciences and nutrition*, *59*(1), 88-94.
- Cavia, M. M., Fernández-Muiño, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F., & Sancho, M. T. (2007). Evolution of acidity of honeys from continental climates: influence of induced granulation. *Food Chemistry*, *100*(4), 1728-1733.
- CIE (1986). Colorimetry. *2nd Ed Publication CIE, Vienna - Austria*, *15*(2).
- Coles, R., Dowell, D. M., & Kirwan, M. (2004). *Manual de envasado de alimentos y bebidas*. Madrid (España): AMV Ediciones.

COM (2008). Comisión de las Comunidades Europeas. LIBRO VERDE sobre la calidad de los productos agrícolas: normas de comercialización requisitos de producción y regímenes de calidad. *Bruselas 15 10 2008. COM (2008) 641 final.*

Consentino, S., Tuberoso, C., Pisiano, B., Cherchi, A., Spanedda, L., & Palmas, F. (1996). Influenza di differenti modalità di conservazione sulla qualità del miele. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, 25(3), 253 - 260.

Crane, E. (1975). *Honey: a comprehensive survey*. London: Ed. Heinemann.

Crane, E. (1990). *The traditional hive products: honey and beeswax*. Oxford: bees and Beekeeping. Science, practice and world resources.

Cheftel, J., & Cheftel, H. (1980). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos (Volumen I)*. Zaragoza - España.

Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., & Engeseth, A. (2000). Honey from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48.

Cherchi, A., Porcu, M., Spanedda, L., & Tuberoso, C. I. G. (1997). Influence of ageing on the quality of honey. *Industria Conserve*, 72(3), 266-271.

Dadant, C. (1975). *La colmena y la abeja melífera*. Montevideo (Uruguay): Ed Hemisferio.

- De la Fuente, E., Sanz, M., Martínez-Castro, I., Sanz, J., & Ruiz-Matute, A. (2007). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105, 84 - 93.
- Estupiñan, S., Sanjuan, E., Millan, R., & González-Cortes, A. (1998a). Parámetros de calidad de la miel: I. Microbiología, características fisico-químicas y envejecimiento: revisión. *Alimentaria*, Octubre, 89 - 94.
- Estupiñan, S., Sanjuan, E., Millan, R., & González-Cortes, A. (1998b). Parámetros de calidad de la miel: II. Composición Química. Revisión. *Alimentaria*, Noviembre, 117 - 122.
- Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E., & Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85, 305 - 313.
- Fattori, S. (2004). La miel: propiedades, composición y análisis fisico-químico. *Apimondia*.
- Fayle, S., & Gerrard, J. (2005). La reacción de maillard. Zaragoza - España. Editorial Acribia.
- Fellows, P. (2007). *Tecnología del Procesado de los alimentos: principios y práctica*. Zaragoza (España): Editorial Acribia.
- Fenema, O. (2000). Química de los alimentos. *Editorial Acribia*, 1139 - 1141.
- Ferreres, F., Juan, T., Pérez-Arquillué, C., Herrera, A., García-Vigera, C., & Tomás-Barberán, F. (1998). Evaluation of pollen as a source of Kaempferol in

- rosemary honey. *Journal of the science of food and agriculture*, 77, 506 - 510.
- Frías, I., & Hardisson, A. (1992). Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel. I. Humedad, acidez e índice de formol, hidroximetilfurfural e índice de diastasas. *Alimentaria*, Mayo, 71 - 74.
- Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3050-3055.
- Gheldof, N., Xiao-Hong, W., & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5870-5877.
- Gheldof, N., Xiao-Hong, W., & Engeseth, N. J. (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1500 - 15005.
- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Carretero, A. S.-, & Fernández-Gutierrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Gómez, A. (2004). Miel de España y Portugal: conocimiento y cata. *Montagud Editores S.A. Barcelona (España)*, 75- 76.

- Gonnet, M. (1965). Les modifications de la composition chimique des miels au cours de la conservation. *Ann Abeille*(8), 129 - 140.
- Gutiérrez, M. G., Rodríguez, A., & Vit, P. (2008). Miel de abejas: una fuente de antioxidantes. *Fuerza Farmacéutica*, 1, 39-44.
- Hadorn, H., & Zürcher., K. (1962). Zur bestimmung der succharase - aktivitat in hoing. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg*, 53(1), 6 - 28.
- Hadorn, H., & Zürcher., K. (1966). Eine verbesserte polarimetrische methode zur saccharasezahlbestimmung in hoing. *Lebensm Rdsch*, 62, 195 - 201.
- Horn, H. (1996). Intensive Practical Course of Honey Analysis. *Landesanslalt für Bienenkunde., Universität Hohenheim - Stuttgart (Germany)*.
- Horn, H., & Boehm, D. (2004). The relationship between the yield, moisture, proline and the enzyme activities invertase and diastase in honey. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 100(3), 88-92.
- Horn, H., & Hammes, W. P. (2002). The influence of temperature on honey quality parameters. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 98(10), 366-372.
- Huidobro, J., Santana, F., Sánchez, M., Sancho, M., & Simal-Lozano, J. (1995). Diastase, invertase and β -glucosidase activities honey from north-west Spain. *Journal of Apicultural Research*, 34, 39-44.

Huidobro, J., & Simal, J. (1985). Parámetros de calidad de la miel VIII: Comentarios a los resultados encontrados en muestras comerciales. *Offarm*, 4(2), 69 - 73.

Huidobro, J. F., & Simal, J. (1984). Determinación del color y la turbidez en las mieles. *Anales de Bromatología*, 36(2), 225 - 245.

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (2002). La miel de Madrid. *Comunidad de Madrid: Consejería de Economía e Innovación Tecnológica*.

Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología (1978). Contribución a la Caracterización Química de la Jalea Real y a su Detección en Mezclas con Miel. *Boletín Interno N°21., Argentina*.

Ivanov, T. (1978). Study of invertase, acid and alkaline phosphatase and esterase activities in bee honey. *Zhivotnovud Nauki*, 15(3), 103 - 112.

Jean-Prost, P. (1981). *Apicultura*. Madrid (España): Ediciones Minda-Prensa.

Jéanne, F. (1993). Le miel. Eléments d'analyses. *Bul. Tech Apic*, 84, 167 - 170.

Jiménez, M., Mateo, J., Huerta, T., & Mateo, R. (1994). Influence in the storage conditions on some phycochemical and micological parameters of honey. *Journal of the science of food and agriculture*, 64(1), 67-74.

Juan, T. (1991). Análisis de azúcares por cromatografía de gases en mieles de Zaragoza. *Universidad de Zaragoza - Facultad de Veterinaria, Tesina*.

- Juan, T. (2001). Identificación y cuantificación de flavonoides en mieles españolas de diferentes orígenes botánicos y geográficos. *Universidad de Zaragoza - Facultad de Veterinaria, Tesis Doctoral*.
- Juan, T., Conchello, P., Tello, M., Pérez, C., & Herrera, A. (1992). Rotación específica y espectro glucídico de mieles de Zaragoza. *Alimentaria, Mayo*, 75-78.
- Juszczak, L., Soch, R., Rożnowski, J., Fortuna, T., & Nalepka, K. (2009). Physicochemical properties and quality parameters of herbhoney. *Food Chemistry, 113*, 538–542.
- Kahoun, D., Rezkova, S., Veskrnova, K., Kralovsky, J., & Holcapek, M. (2008). Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A, 1202*(1), 19-33.
- Kalabova, K., Vorlova, L., Borkovcova, I., Smutna, M., & Vecerek, V. (2003). Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech Journal of Animal Science, 48*(12), 551-557.
- Kaur Bath, P., & Singh, N. (2001). Effect of microwave heating on hydroxymethylfurfural formation and browning in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Journal of Food Science and Technology, India, 38*(4), 366-368.

Kenjeric, D., Mandic, M. L., Primorac, L., Bubalo, D., & Perl, A. (2007). Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia. *Food Chemistry*, 102(3), 683-690.

Krauze, A., & Krauze, J. (1991). Changes in chemical composition of stored honeydew honeys. *Acta Polonica*, 17(2), 119 - 126.

López, A. (2005). La Miel. *Origen, Enero - Febrero*.

Louveaux, J. (1985). Le Miel. *Cah Nutr. Dite*, XX(1), 55 - 70.

Louveaux, J., Maurizio, A., & Vohwohl, G. (1978). Internactional Comission for Bee Botany of IUBS. *Bee World*, 59, 139 - 157.

Luz-Sanz, M., Dolores del Castillo, M., Corzo, N., & Orlano, A. (2003). 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4278-4283.

Martínez-Valverde, I., María Jesús, P., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta.[En línea]. *ALAN*, 50 N° 1, Disponible en Web [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000100001&lng=es&nrm=iso].

Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Visual and instrumental coloe evaluation in red wines. *Food Science Technology International*, 7(5), 439 - 444.

- Matissek, R., Schnepel, F., & Steiner, G. (1998). *Análisis de los alimentos: Fundamentos - Métodos - Aplicaciones*. Zaragoza (España): Editorial Acribia.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2007). Programa Nacional de medidas de ayuda a la apicultura en España 2008 - 2010. *Dirección General del Ganadería. Sudirección Genral de porcino, avicultura y otras producciones ganaderas*.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2007). Programa Nacional de medidas de ayuda a la apicultura en España 2008 - 2010. *Dirección General del Ganadería. Sudirección Genral de porcino, avicultura y otras producciones ganaderas*.
- Montes, A. (1996). *Bromatología II*. Editorial Universitaria, Buenos Aires.
- Mostafá, A., Ahmed, A., & Mahmoud, M. (1982). Studies of Libyan honeys. *Journal of Food Quality*, 4, 185 - 201.
- Negueruela, A. I., & Pérez-Arquillué, C. (2000). Color measurement of rosemary honey in the solid state by reflectance spectroscopy with black background. *Journal of AOAC International*, 83(3), 669-674.

Orden APA 3209/2002, d. d. d. Por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen Protegida «Miel de Granada» y de su Consejo Regulador. *BOE n° 301 de 17 de Diciembre de 2002.*

Orden APA/2186/2004, d. d. j. Por la que se ratifica el Reglamento de la Indicación Geográfica Protegida «Miel de Galicia » y de su Consejo Regulador. *BOE n° 161 de 5 de Julio de 2004.*

Orden de 1 de octubre de 1997 Por la que se reconoce la denominación específica Miel de Galicia y se nombra su Consejo Regulador Provisional. *DOG, 15-10-1997.*

Orden de 5 de octubre de 2002 Por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen Miel de Granada y de su Consejo Regulador. *BOJA 129 de 5 de noviembre de 2002.*

Orden de 10 de febrero de 2004 Por la que se modifica el Reglamento de indicación geográfica protegida Miel de Galicia y de su consejo regulador, aprobado por la orden de esta Consejería el 19 de febrero de 2003. *DOG, 27-2-2004.*

Orden de 12 de Junio de 1986 Orden de la presidencia de gobierno por la que se aprueba los métodos oficiales de análisis para la miel. *BOE, número 145, del 18 de junio de 1986.*

Orden de 19 de febrero de 2003 Por la que se aprueba el Reglamento de indicación geográfica protegida Miel de Galicia y de su consejo regulador *DOG, 3-3-2003.*

- Ortiz, A., Fernández, M. C., & Muñoz, E. (1996). Principales características de la Miel de La Alcarria. *Servicio de Investigación y Tecnología Agraria*.
- Oszmianski, J., & Lee, C. (1990). Inhibition of polyphenoloxidase activity and browning by honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1892 - 1895.
- Pereyra, A., Burin, L., & Buera, M. (1999). Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, 32, 185 - 191.
- Pérez, C. (2002). La calidad de la miel. *Simposio País Vasco*.
- Pérez, C. (2005). La miel. *Origen: La revista del sabor rural*, 7, 34 - 39.
- Persano-Oddo, L., Piazza, M., & Pulcino, P. (1999). Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30, 57 - 65.
- Persano-Oddo, L., Piazza, M., Sabatini, A., & Accorti, M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*(26), 453 - 465.
- Persano-Oddo, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*(35), S38 - S81.
- Piana, G., Ricciardelli-D'albore, G., & Isola, A. (1989). *La miel: alimento de conservación natural*. Madrid (Spain).

Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). *Antioxidantes de los alimentos*. Zaragoza (España): Editorial Acribia.

Portal de Europa (2008). Panorama de las Actividades de la Unión Europea en Agricultura. [En línea]. *Distintivos de calidad de alimentos (Octubre 2008)*, Disponible en Web: http://ec.europa.eu/agriculture/food/index_es.htm.

Primo, E. (1997). *Química de los alimentos*. Madrid - España.

Real Decreto 891/2006 Normas técnico - sanitarias aplicables a los objetos de cerámica para uso alimentario. *BOE n° 174 de 22 de Julio de 2006*.

Real Decreto 1049/2003 Norma de calidad relativa a la miel. *BOE n° 186 de 5 de Agosto de 2003*.

Reglamento (CE) n° 868/2007 de la Comisión de 23 de julio de 2007 Por el que se inscribe una denominación en el registro de denominaciones de origen protegidas y de indicaciones geográficas protegidas [Miel de Galicia o Mel de Galicia (IGP)]. *DOUE. L 192/11 de 24.7.2007*.

Reglamento (CE) n° 1107/96 de la Comisión de 12 de junio de 1996 Relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 17 del Reglamento (CEE) n° 2081/92 del Consejo. *DOUE. n° L 148 de 21.6.1996*.

Reglamento (CE) n° 510/2006 de 20 de marzo de 2006 Sobre la sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de

origen de los productos agrícolas y alimenticios. *DOUE. n° L 93/12 de 31.3.2006.*

Reglamento (CE) n° 886/2005 de la Comisión de 10 de junio de 2005 Por el que se completa el anexo del Reglamento (CE) n° 2400/96 en lo que respecta al registro de una denominación en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas (Miel de Granada) - (DOP). *DOUE. n° L 148 de 11.06.2005.*

Romagosa, I. (2005). *Métodos Estadísticos en Experimentación Agraria. Universidad de Lérida (Cataluña - España).*

Romero, A. (2006). Caracterización del estado nutritivo y el contenido de extractos orgánicos y compuestos fenólicos en olivos de la variedad empeltre. *Universidad de Zaragoza - Facultad de Veterinaria, Tesis Doctoral.*

Sahinler, N. (2007). Effects of heating and storage on hydroxy methylfurfural and diastase activity of different Turkish honeys. *Journal of Apicultural Research, 46(1), 34-39.*

Sáinz, C., & Gómez, C. (2000). *Mieles españolas.* Madrid (España): Ediciones Minda-Prensa.

Salvachúa, J. C., Marchamalo, & Robles, E. (2005). Recolección, obtención y procesado artesanal de la miel. *Alimentación, Equipos y Tecnología, Marzo, 93 - 100.*

- Sánchez, M. P. (1999). Evolución de la actividad de las principales enzimas de la miel "Producto Galego de Calidade - Mel de Galicia". *Universidad de Santiago de Compostela - Facultad de Farmacia, Tesis Doctoral*.
- Sánchez, M. P., Huidobro, J. F., Mato, I., Muniategui, S., & Sancho, M. T. (2001). Evolution of invertase activity in honey over two years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 416 - 422.
- Sancho, M. T., Muniategui, S., Huidobro, J. F., & Lozano, J. S. (1992). Aging honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 134 - 138.
- Sancho, M. T., Muniategui, S., Huidobro, J. F., & Simal, J. (1991 a). Mieles del País Vasco I: pH y tipos de Acidez. *Anales de Bromatología*, XLIII(1), 77 - 86.
- Sepúlveda, J. (1986). *Apicultura*. Barcelona (España): Editorial Aedos.
- Serra, J., & Gómez, A. (1986). Determinación de la miel adulterada. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 4, 143.
- Serrano, S., Espejo, R., Villarejo, M., & Jodral, M. (2007). Diastase and invertase activities in Adalusian honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 76 - 79.
- Singh, N., & Kuar Bath, P. (1997). Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chemistry*, 58(1-2).

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. . *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- The National Honey Board (2002). Honey - Health and Therapeutic Qualities. [En línea]. (Junio 2007), Disponible en Web: www.honeystix.com/HoneyStix/compendium.pdf.
- Thrasylvoulou, A. T. (1986). The use of HMF and Diastasa as criteria of quality of Greek Honey. *Journal of Apicultural Research*, 25(3), 186 - 195.
- Tomás-Barberán, F., Ferreres, F. A., Ortiz, A., & Fernández, M. C. (1994). Estudio sobre el contenido de flavonoides de las Mieles de la Alcarria.
- Tomás-Barberán, F., Martos, I., Ferreres, F., Branka S., R., & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the science of food and agriculture*, 81(5), 485-496.
- Tosi, E., Ciappini, M., Rè, E., & Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77, 71 - 74.
- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., & Ré, E. (2008). Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*, 106, 883 - 887.
- Tosi, E., Ortega, M., & Martinet, R. (2000). Determinación Espectrofotométrica de la Glucosa Oxidasa en miel. *Alimentaria*, 312, 97 - 99.

Turhan, I., Tetlk, N., Karhan, M., Gurel, F., & Tavukcuoglu, H. R. (2008). Quality of honeys influenced by thermal treatment. *Lwt-Food Science and Technology*, 41(8), 1396-1399.

USDA (2008). National Nutrient Database for Standard Reference. [En línea]. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>, Disponible en Web: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.

Uthurry, C., Bartolomé, B., & Cordovés, C. G. (2007). Los compuestos polifenólicos en productos apícolas y su función antioxidante. *Vida Apícola*, 145, 9 - 15.

Vázquez, C., DeCos, A., & López, C. (2005). Alimentación y Nutrición. *Díaz De Santos 2 Edición (España)*, 115 - 117.

Villamiel, M., Castillo, D. D., Corzo, N., & Olano, A. (2001). Presence of furosine in honeys. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 81, 790 - 793.

Visquert, M., Escriche, I., Andres, A., & Fito, P. (2004). Cambios en parámetros de calidad de la miel ocasionados por los procesos térmicos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, Marzo.

Vit, P., & Pulcini, P. (1996). Diastase and invertase activities in Meliponini and Trigonini honeys from Venezuela. *Journal of Apicultural Research*, 35(2), 57 - 62.

Wade, R. (1993). *Química Orgánica*. México: Editorial Prentice - Hall. México D.F.

- Wang, X. H., Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2004). Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*, 69(2), FCT96-FCT101.
- Wehling, M., Vonder Ohe, W., & Von der Ohe, K. (2003). Natural Content of Formic and Oxalic Acids in Honeys. *APIACTA*, 38, 257.
- White, J., & Siciliano, J. (1980). Hydroxymethylfurfural and honey adulteration. *Journal Association Official Analyst Chemistry*, 63, 7 - 10.
- White, J., & Subers, M. (1963). Studies on Honey Inhibine. 2 A Chemical Assay. *Journal Apicultural Research*, 2(2), 93-100.
- White, J., & White, J. (1975). *Composition of Honey*. Londres: In E. Crane (Ed Heinemann), *Honey: a comprehensive survey*.
- White, J., & White, J. (1979 a). "Composición y propiedades de la miel". En: *La Apicultura en los Estados Unidos*. Editorial Limusa. México.
- White, J., White, J., Kushnir, I., & Subers, M. (1964). Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technology*, 18(4), 153 - 166.
- White, J. W. (1992). Quality Evaluation of Honey Role HMF and Diastase Assays. *American Bee Journal*, 792 - 794.

White, W. J., Jr. (1969). Moisture in Honey: Review of Chemical and Physical Methods *Journal of Official Association Agricultural Chemists*, Vol.52, N°4, 729-737.

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86(2), 169-177.

SOFTWARE

MINITAB Inc. 2007. *Software de administración de procesos: Minitab Quality Companion™*. Minitab Categories. Versión 15.1.3 EEUU. Pagina Web (en línea). Disponible en <http://www.minitab.com>

Anexo

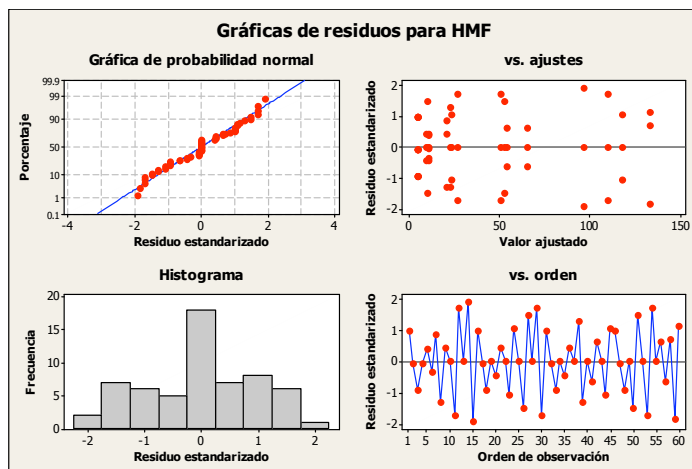
9. ANEXO - RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

9.1. Almacenamiento de muestras a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Análisis de varianza para HMF, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1030.9	1030.9	343.6	2.67	0.095
Tiempo	4	98679.5	98679.5	24669.9	191.93	0.000
Envases*Tiempo	12	1542.4	1542.4	128.5	393.90	0.000
Error	40	13.1	13.1	0.3		
Total	59	101265.9				

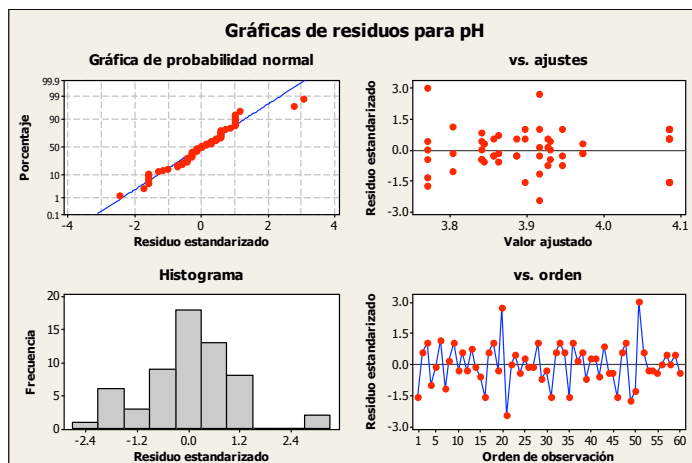
S = 0.571231 R-cuad. = 99.99% R-cuad.(ajustado) = 99.98%



Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	0.084780	0.084780	0.028260	6.31	0.008
Tiempo	4	0.463643	0.463643	0.115911	25.87	0.000
Envases*Tiempo	12	0.053770	0.053770	0.004481	5.71	0.000
Error	40	0.031400	0.031400	0.000785		
Total	59	0.633593				

S = 0.0280179 R-cuad. = 95.04% R-cuad.(ajustado) = 92.69%

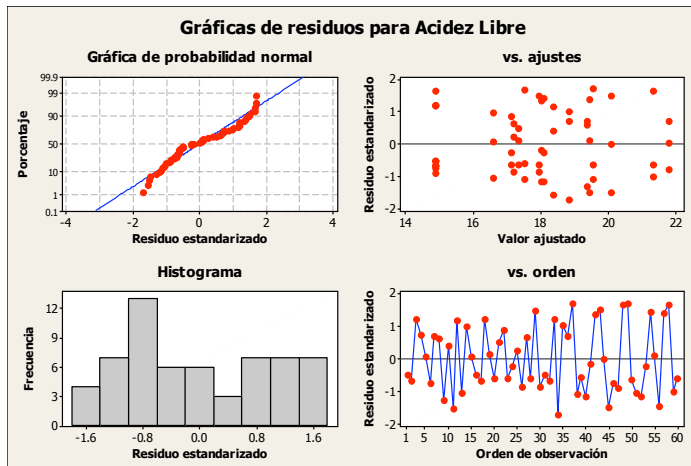


Anexo – Resultados del Análisis Estadístico

Análisis de varianza para Acidez Libre, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	25.157	25.157	8.386	1.58	0.245
Tiempo	4	151.710	151.710	37.927	7.16	0.003
Envases*Tiempo	12	63.598	63.598	5.300	8.11	0.000
Error	40	26.154	26.154	0.654		
Total	59	266.619				

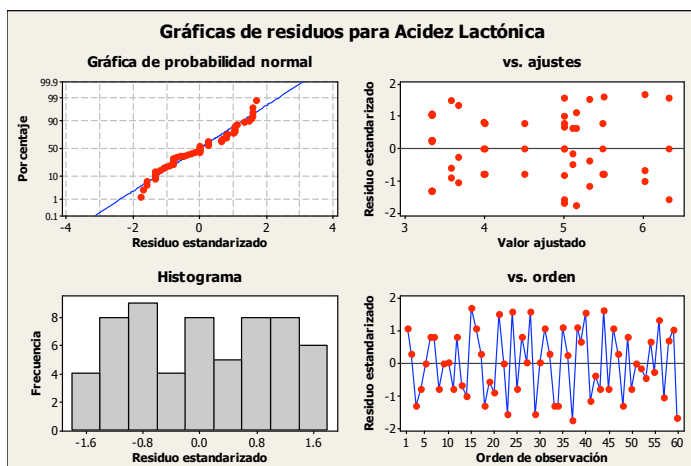
S = 0.808610 R-cuad. = 90.19% R-cuad.(ajustado) = 85.53%



Análisis de varianza para Acidez Lactónica, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	2.2009	2.2009	0.7336	0.99	0.431
Tiempo	4	45.4745	45.4745	11.3686	15.32	0.000
Envases*Tiempo	12	8.9047	8.9047	0.7421	1.27	0.272
Error	40	23.3240	23.3240	0.5831		
Total	59	79.9041				

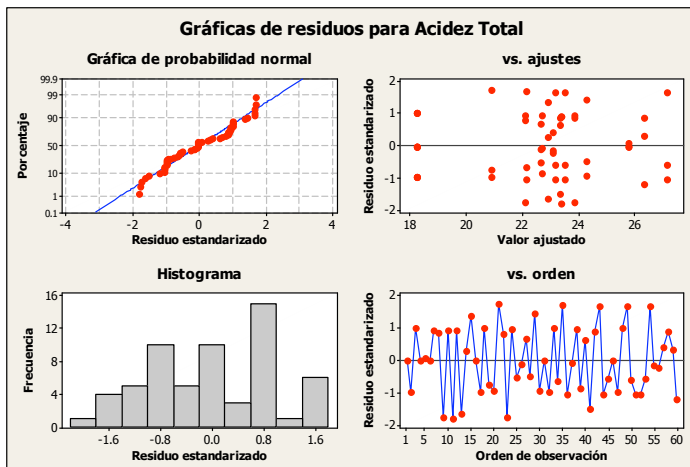
S = 0.763610 R-cuad. = 70.81% R-cuad.(ajustado) = 56.94%



Análisis de varianza para Acidez Total, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	15.636	15.636	5.212	0.98	0.436
Tiempo	4	318.636	318.636	79.659	14.93	0.000
Envases*Tiempo	12	64.040	64.040	5.337	9.05	0.000
Error	40	23.579	23.579	0.589		
Total	59	421.891				

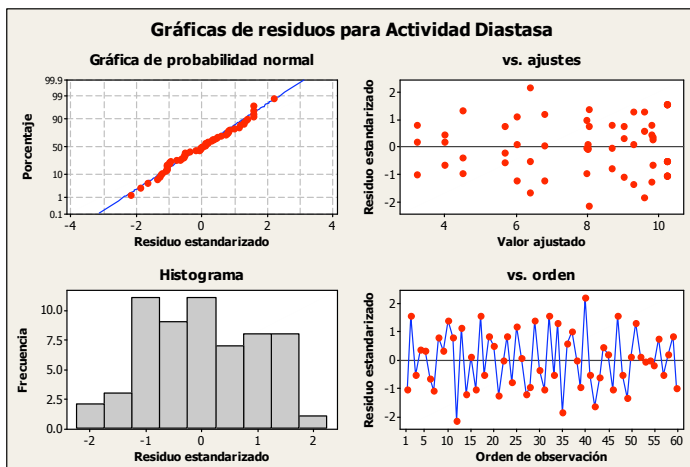
S = 0.767778 R-cuad. = 94.41% R-cuad.(ajustado) = 91.76%



Análisis de varianza para Actividad Diastasa, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	14.961	14.961	4.987	6.27	0.008
Tiempo	4	268.179	268.179	67.045	84.29	0.000
Envases*Tiempo	12	9.544	9.544	0.795	6.51	0.000
Error	40	4.891	4.891	0.122		
Total	59	297.574				

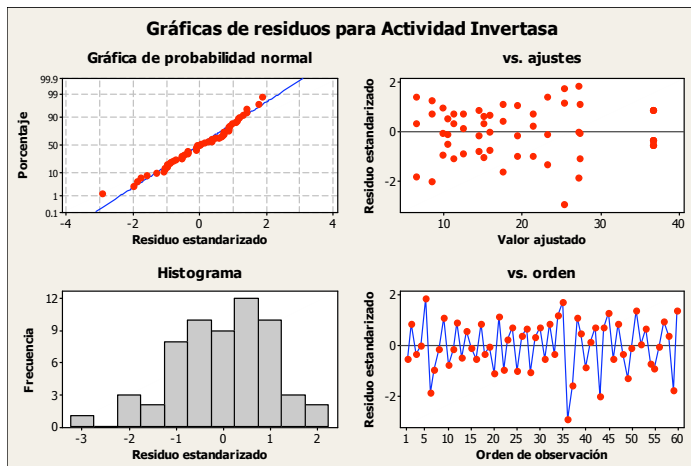
S = 0.349667 R-cuad. = 98.36% R-cuad.(ajustado) = 97.58%



Análisis de varianza para Actividad Invertasa, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	137.49	137.49	45.83	14.26	0.000
Tiempo	4	5861.84	5861.84	1465.46	455.98	0.000
Envases*Tiempo	12	38.57	38.57	3.21	189.46	0.000
Error	40	0.68	0.68	0.02		
Total	59	6038.57				

S = 0.130243 R-cuad. = 99.99% R-cuad.(ajustado) = 99.98%

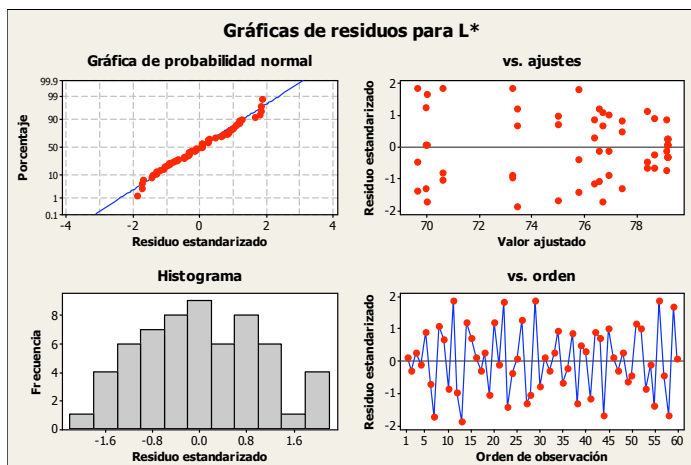


Coordenadas de color

Análisis de varianza para L*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	83.692	83.692	27.897	4.46	0.025
Tiempo	4	518.234	518.234	129.559	20.72	0.000
Envases*Tiempo	12	75.025	75.025	6.252	12.36	0.000
Error	40	20.232	20.232	0.506		
Total	59	697.185				

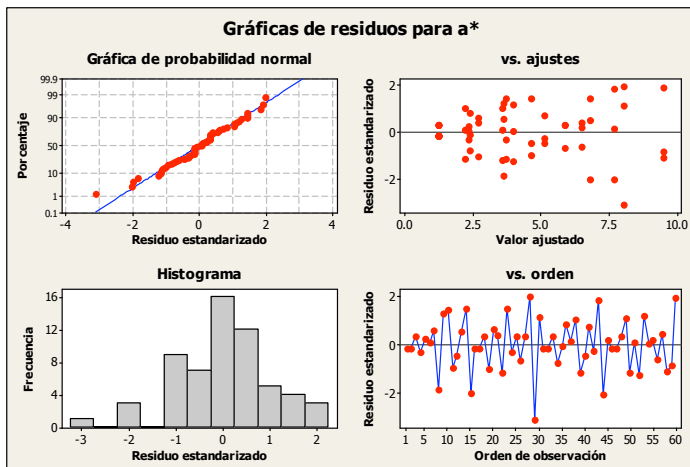
S = 0.711202 R-cuad. = 97.10% R-cuad.(ajustado) = 95.72%



Análisis de varianza para a*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	7.740	7.740	2.580	2.95	0.076
Tiempo	4	345.158	345.158	86.289	98.53	0.000
Envases*Tiempo	12	10.509	10.509	0.876	10.62	0.000
Error	40	3.298	3.298	0.082		
Total	59	366.705				

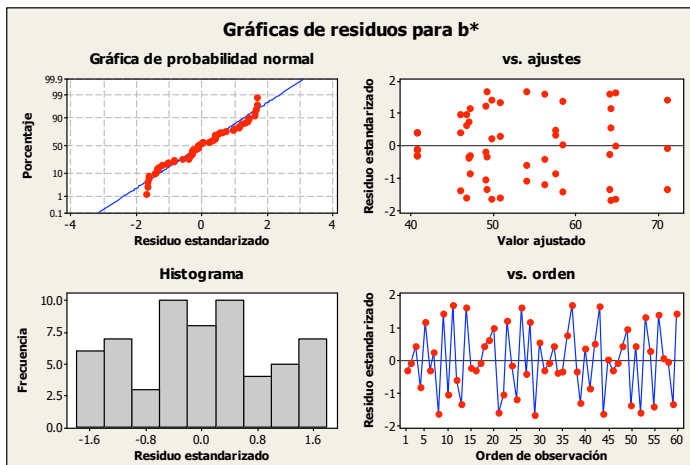
S = 0.287147 R-cuad. = 99.10% R-cuad.(ajustado) = 98.67%



Análisis de varianza para b*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	46.73	46.73	15.58	1.88	0.186
Tiempo	4	4609.31	4609.31	1152.33	139.32	0.000
Envases*Tiempo	12	99.26	99.26	8.27	14.92	0.000
Error	40	22.18	22.18	0.55		
Total	59	4777.48				

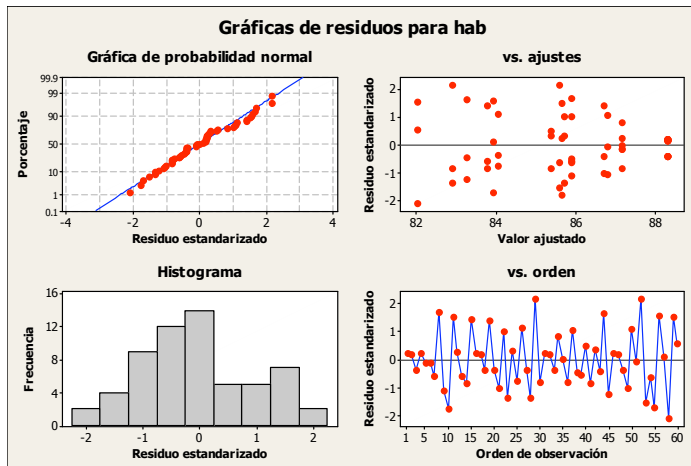
S = 0.744665 R-cuad. = 99.54% R-cuad.(ajustado) = 99.32%



Análisis de varianza para h_{ab}^* , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	6.848	6.848	2.283	4.50	0.025
Tiempo	4	201.196	201.196	50.299	99.24	0.000
Envases*Tiempo	12	6.082	6.082	0.507	5.67	0.000
Error	40	3.577	3.577	0.089		
Total	59	217.703				

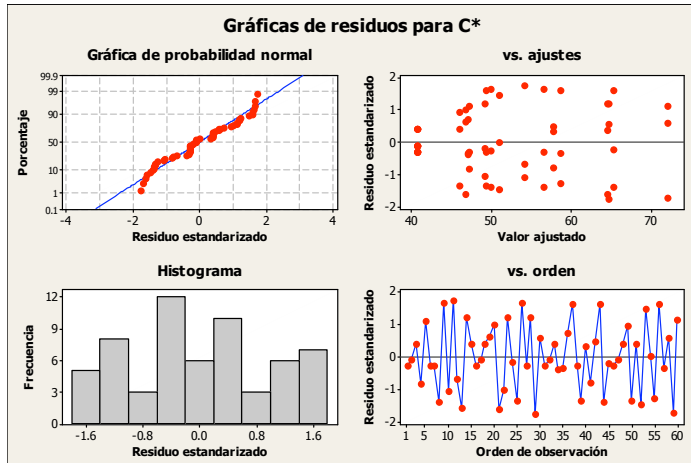
S = 0.299035 R-cuad. = 98.36% R-cuad.(ajustado) = 97.58%



Análisis de varianza para C^* , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	52.62	52.62	17.54	1.89	0.186
Tiempo	4	4814.86	4814.86	1203.71	129.40	0.000
Envases*Tiempo	12	111.62	111.62	9.30	15.47	0.000
Error	40	24.05	24.05	0.60		
Total	59	5003.15				

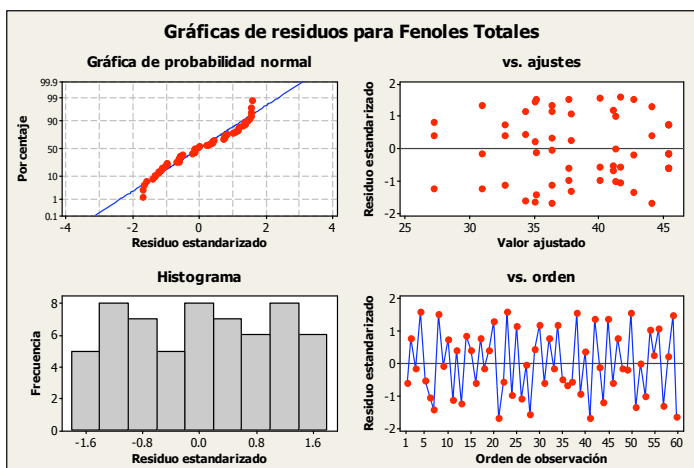
S = 0.775348 R-cuad. = 99.52% R-cuad.(ajustado) = 99.29%



Análisis de varianza para Fenoles Totales, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	151.864	151.864	50.621	6.79	0.006
Tiempo	4	1375.844	1375.844	343.961	46.14	0.000
Envases*Tiempo	12	89.465	89.465	7.455	12.62	0.000
Error	40	23.633	23.633	0.591		
Total	59	1640.805				

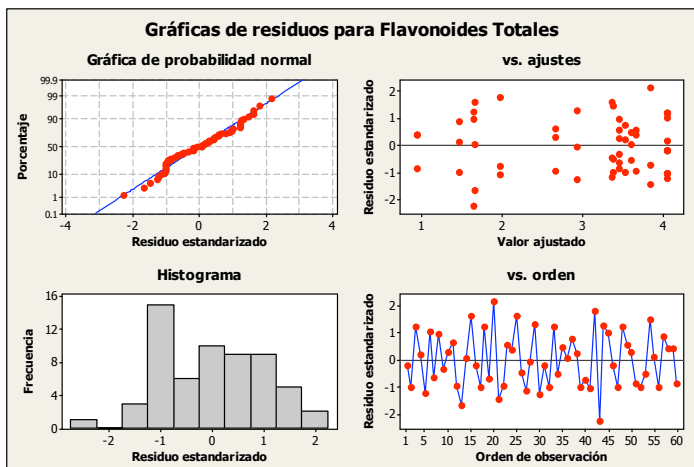
S = 0.768647 R-cuad. = 98.56% R-cuad.(ajustado) = 97.88%



Análisis de varianza para Flavonoides Totales, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	6.7008	6.7008	2.2336	4.11	0.032
Tiempo	4	44.9810	44.9810	11.2453	20.68	0.000
Envases*Tiempo	12	6.5262	6.5262	0.5439	4.35	0.000
Error	40	5.0043	5.0043	0.1251		
Total	59	63.2124				

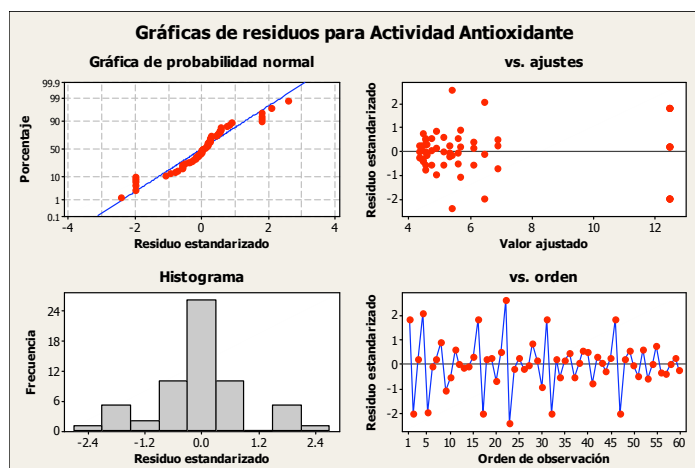
S = 0.353707 R-cuad. = 92.08% R-cuad.(ajustado) = 88.32%



Análisis de varianza para Actividad Antioxidante, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	5.077	5.077	1.692	8.22	0.003
Tiempo	4	536.114	536.114	134.029	650.59	0.000
Envases*Tiempo	12	2.472	2.472	0.206	2.17	0.033
Error	40	3.796	3.796	0.095		
Total	59	547.459				

S = 0.308048 R-cuad. = 99.31% R-cuad.(ajustado) = 98.98%

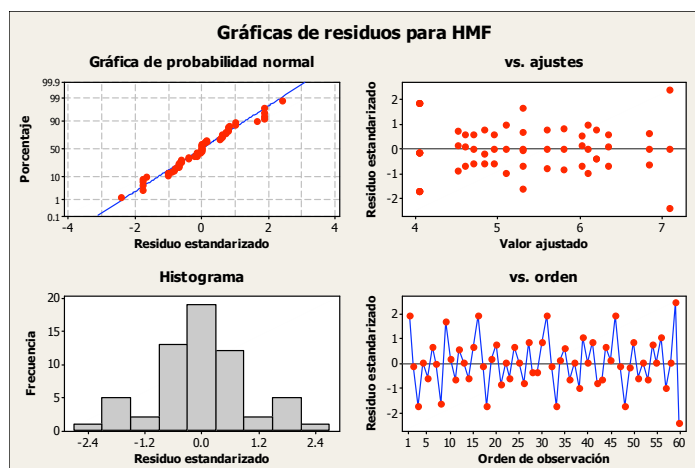


9.2. Almacenamiento con iluminación

Análisis de varianza para HMF, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1.5960	1.5960	0.5320	7.23	0.005
Tiempo	4	49.4261	49.4261	12.3565	167.90	0.000
Envases*Tiempo	12	0.8831	0.8831	0.0736	0.81	0.643
Error	40	3.6552	3.6552	0.0914		
Total	59	55.5605				

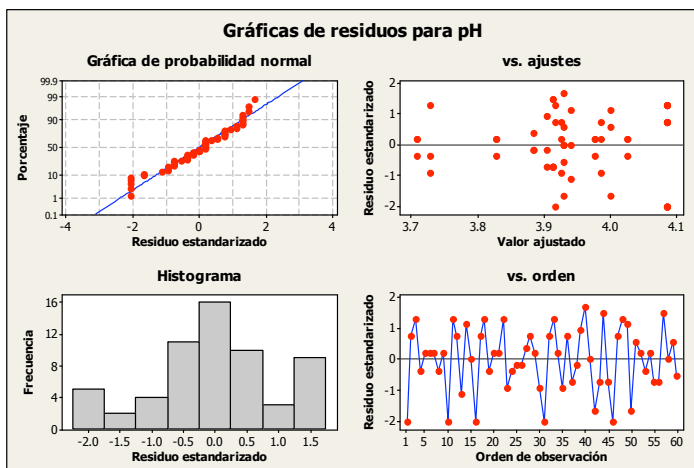
S = 0.302291 R-cuad. = 93.42% R-cuad.(ajustado) = 90.30%



Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	0.022227	0.022227	0.007409	1.43	0.282
Tiempo	4	0.576473	0.576473	0.144118	27.89	0.000
Envases*Tiempo	12	0.062007	0.062007	0.005167	10.73	0.000
Error	40	0.019267	0.019267	0.000482		
Total	59	0.679973				

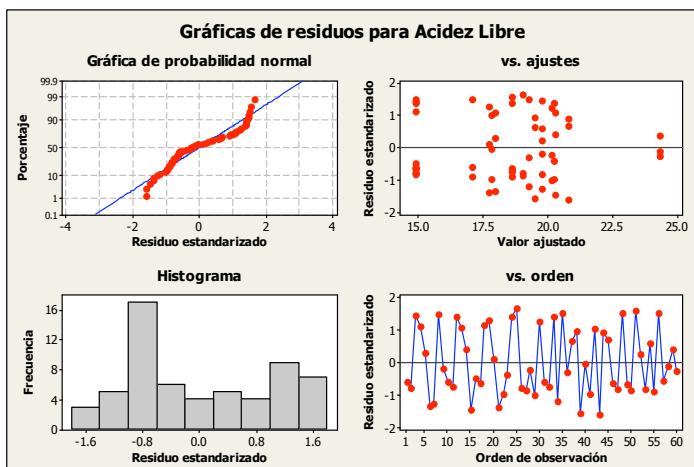
S = 0.0219469 R-cuad. = 97.17% R-cuad.(ajustado) = 95.82%



Análisis de varianza para Acidez Libre, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	3.682	3.682	1.227	0.34	0.799
Tiempo	4	278.533	278.533	69.633	19.08	0.000
Envases*Tiempo	12	43.799	43.799	3.650	5.03	0.000
Error	40	29.048	29.048	0.726		
Total	59	355.061				

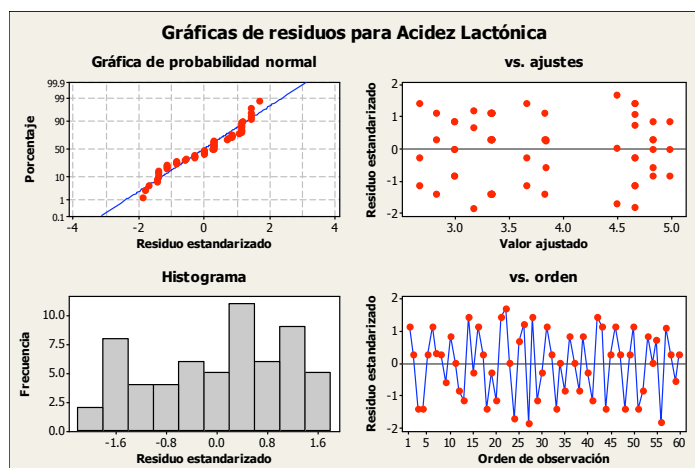
S = 0.852179 R-cuad. = 91.82% R-cuad.(ajustado) = 87.93%



Análisis de varianza para Acidez Lactónica, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	3.4185	3.4185	1.1395	1.01	0.424
Tiempo	4	16.9851	16.9851	4.2463	3.75	0.034
Envases*Tiempo	12	13.6059	13.6059	1.1338	2.19	0.031
Error	40	20.6705	20.6705	0.5168		
Total	59	54.6800				

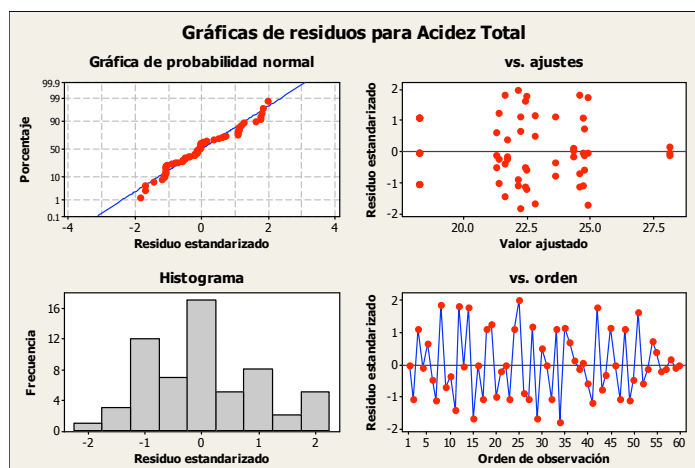
S = 0.718863 R-cuad. = 62.20% R-cuad.(ajustado) = 44.24%



Análisis de varianza para Acidez Total, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	12.451	12.451	4.150	1.17	0.363
Tiempo	4	347.025	347.025	86.756	24.39	0.000
Envases*Tiempo	12	42.693	42.693	3.558	7.30	0.000
Error	40	19.501	19.501	0.488		
Total	59	421.670				

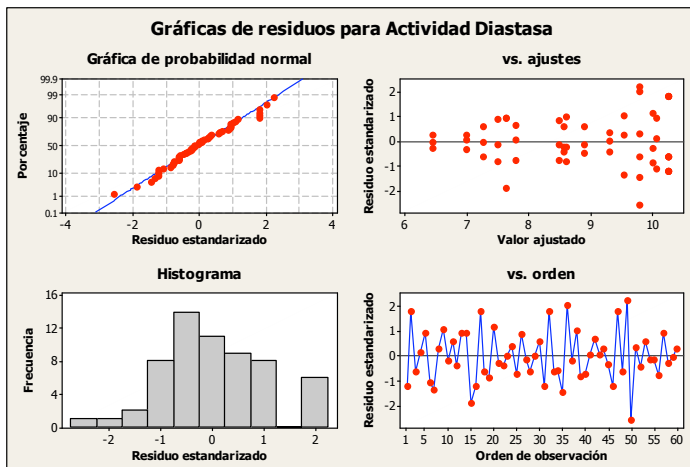
S = 0.698231 R-cuad. = 95.38% R-cuad.(ajustado) = 93.18%



Análisis de varianza para Actividad Diastasa, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	4.0599	4.0599	1.3533	6.80	0.006
Tiempo	4	83.1415	83.1415	20.7854	104.40	0.000
Envases*Tiempo	12	2.3890	2.3890	0.1991	2.18	0.032
Error	40	3.6455	3.6455	0.0911		
Total	59	93.2359				

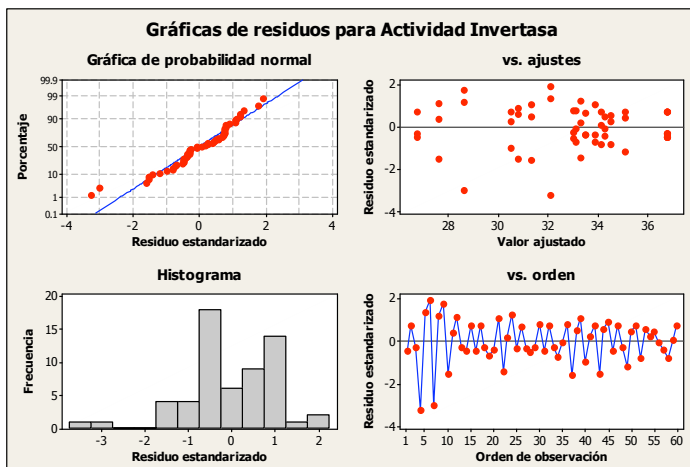
S = 0.301889 R-cuad. = 96.09% R-cuad.(ajustado) = 94.23%



Análisis de varianza para Actividad Invertasa, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	183.876	183.876	61.292	10.43	0.001
Tiempo	4	259.700	259.700	64.925	11.05	0.001
Envases*Tiempo	12	70.528	70.528	5.877	256.75	0.000
Error	40	0.916	0.916	0.023		
Total	59	515.019				

S = 0.151300 R-cuad. = 99.82% R-cuad.(ajustado) = 99.74%

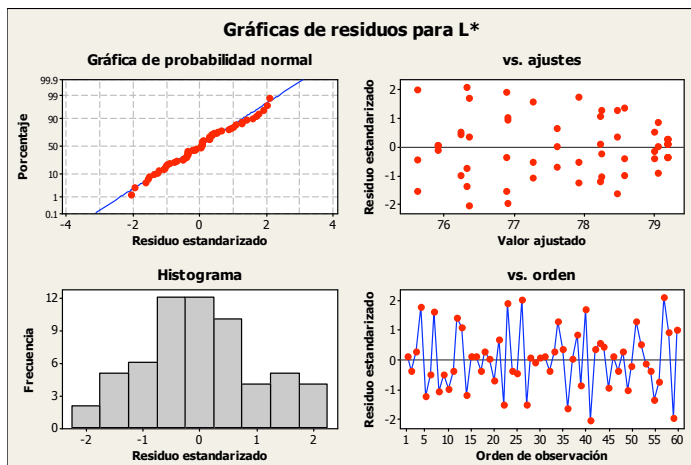


Coordenadas de color

Análisis de varianza para L*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	11.8802	11.8802	3.9601	1.86	0.190
Tiempo	4	51.1263	51.1263	12.7816	6.01	0.007
Envases*Tiempo	12	25.5272	25.5272	2.1273	5.32	0.000
Error	40	16.0086	16.0086	0.4002		
Total	59	104.5423				

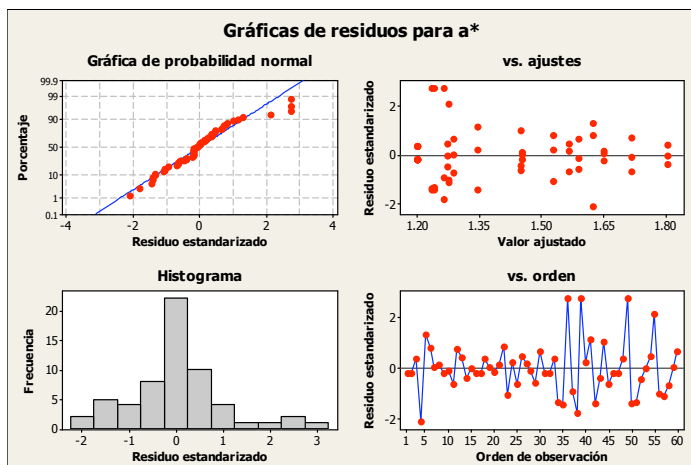
S = 0.632625 R-cuad. = 84.69% R-cuad.(ajustado) = 77.41%



Análisis de varianza para a*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1.14032	1.14032	0.38011	14.21	0.000
Tiempo	4	0.78696	0.78696	0.19674	7.36	0.003
Envases*Tiempo	12	0.32096	0.32096	0.02675	0.47	0.922
Error	40	2.29260	2.29260	0.05731		
Total	59	4.54084				

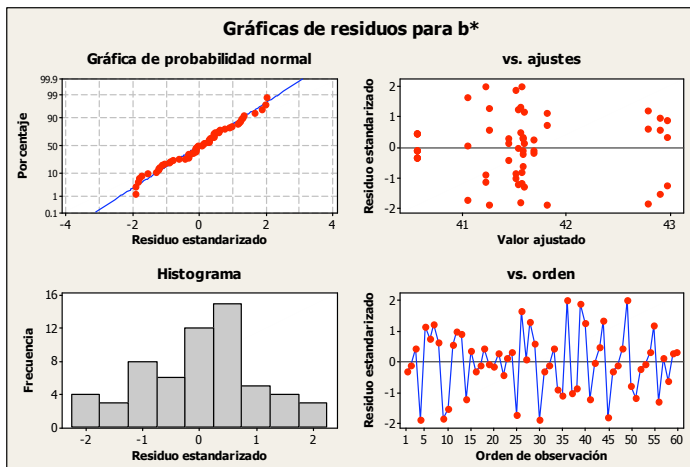
S = 0.239406 R-cuad. = 49.51% R-cuad.(ajustado) = 25.53%



Análisis de varianza para b^* , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	9.8561	9.8561	3.2854	7.24	0.005
Tiempo	4	14.4106	14.4106	3.6027	7.94	0.002
Envases*Tiempo	12	5.4451	5.4451	0.4538	0.93	0.527
Error	40	19.4965	19.4965	0.4874		
Total	59	49.2084				

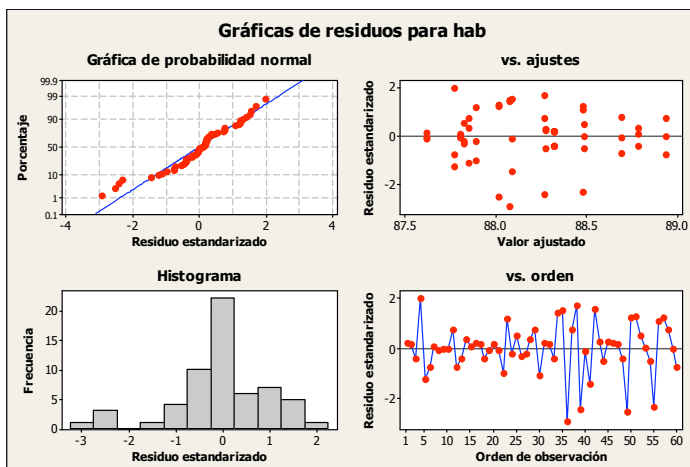
S = 0.698150 R-cuad. = 60.38% R-cuad.(ajustado) = 41.56%



Análisis de varianza para h_{ab}^* , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	2.35503	2.35503	0.78501	3.65	0.044
Tiempo	4	2.46162	2.46162	0.61540	2.86	0.071
Envases*Tiempo	12	2.57894	2.57894	0.21491	2.37	0.021
Error	40	3.63233	3.63233	0.09081		
Total	59	11.02793				

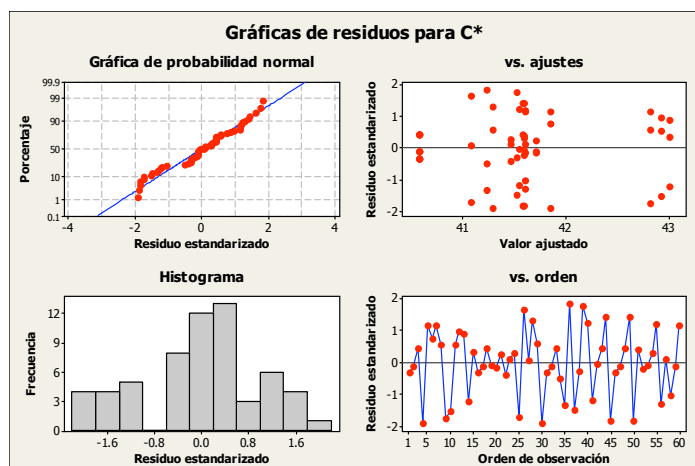
S = 0.301344 R-cuad. = 67.06% R-cuad.(ajustado) = 51.42%



Análisis de varianza para C*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	10.0577	10.0577	3.3526	7.35	0.005
Tiempo	4	14.6402	14.6402	3.6601	8.02	0.002
Envases*Tiempo	12	5.4768	5.4768	0.4564	0.90	0.550
Error	40	20.1725	20.1725	0.5043		
Total	59	50.3471				

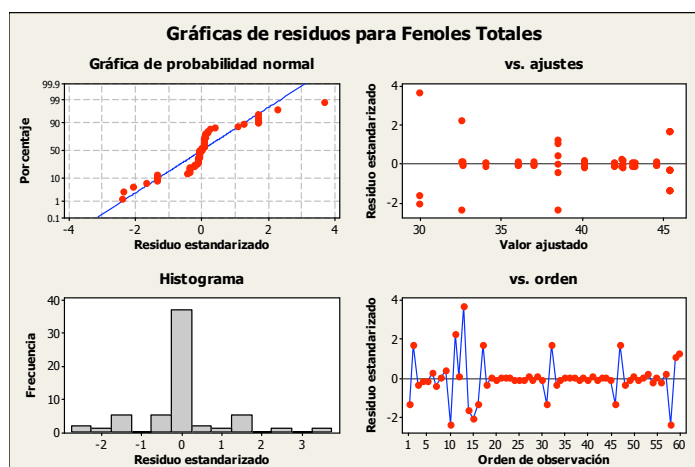
S = 0.710149 R-cuad. = 59.93% R-cuad.(ajustado) = 40.90%



Análisis de varianza para Fenoles Totales, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	155.113	155.113	51.704	7.22	0.005
Tiempo	4	1118.580	1118.580	279.645	39.04	0.000
Envases*Tiempo	12	85.961	85.961	7.163	61.28	0.000
Error	40	4.676	4.676	0.117		
Total	59	1364.330				

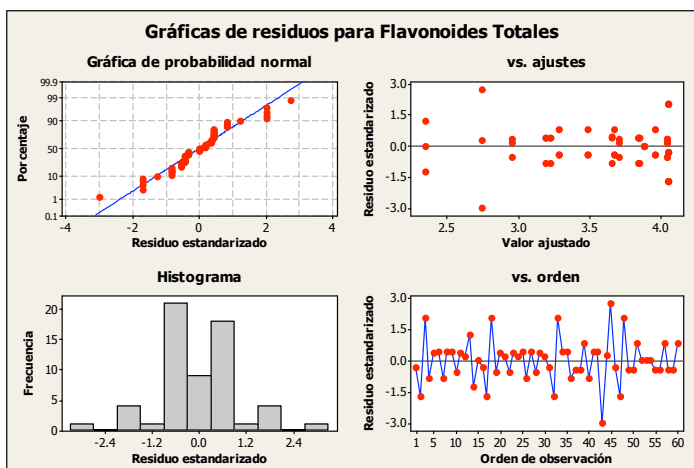
S = 0.341889 R-cuad. = 99.66% R-cuad.(ajustado) = 99.49%



Análisis de varianza para Flavonoides Totales, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	4.71687	4.71687	1.57229	8.30	0.003
Tiempo	4	7.19278	7.19278	1.79820	9.49	0.001
Envases*Tiempo	12	2.27351	2.27351	0.18946	4.19	0.000
Error	40	1.80687	1.80687	0.04517		
Total	59	15.99003				

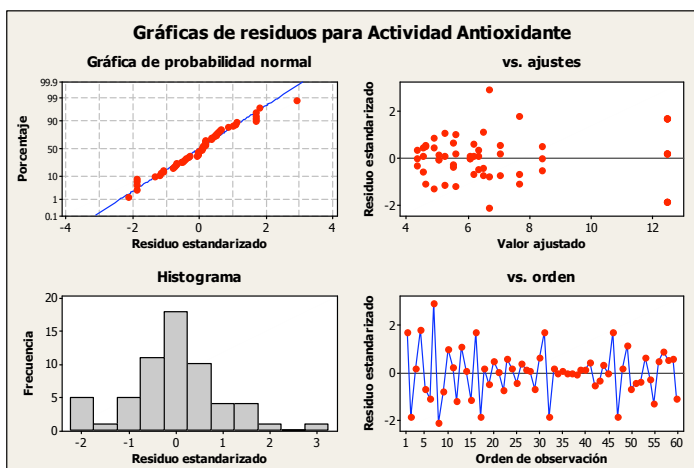
S = 0.212536 R-cuad. = 88.70% R-cuad.(ajustado) = 83.33%



Análisis de varianza para Actividad Antioxidante, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	23.570	23.570	7.857	13.89	0.000
Tiempo	4	450.119	450.119	112.530	199.00	0.000
Envases*Tiempo	12	6.786	6.786	0.565	5.19	0.000
Error	40	4.359	4.359	0.109		
Total	59	484.834				

S = 0.330124 R-cuad. = 99.10% R-cuad.(ajustado) = 98.67%

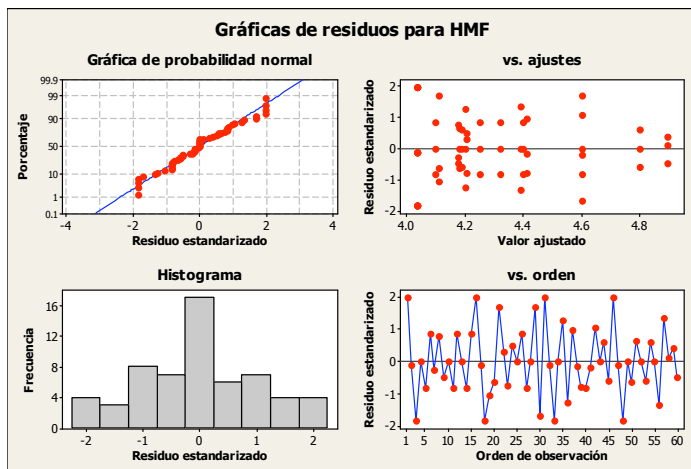


9.3. Almacenamiento sin iluminación

Análisis de varianza para HMF, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	0.40830	0.40830	0.13610	4.43	0.026
Tiempo	4	2.94869	2.94869	0.73717	23.98	0.000
Envases*Tiempo	12	0.36889	0.36889	0.03074	0.37	0.967
Error	40	3.34173	3.34173	0.08354		
Total	59	7.06762				

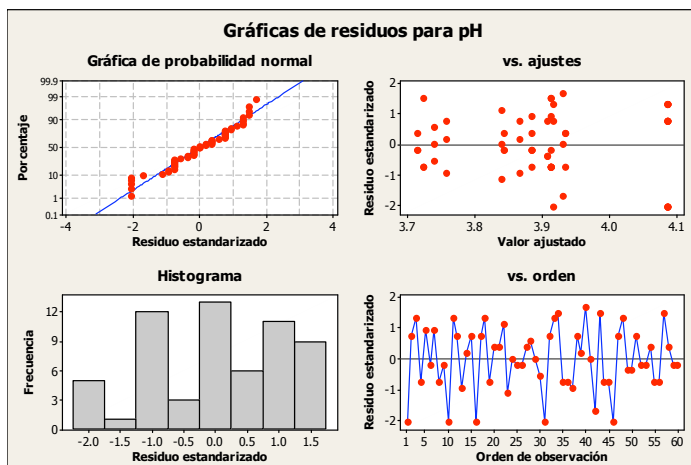
S = 0.289039 R-cuad. = 52.72% R-cuad.(ajustado) = 30.26%



Análisis de varianza para pH, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	0.003058	0.003058	0.001019	1.41	0.287
Tiempo	4	0.776960	0.776960	0.194240	268.95	0.000
Envases*Tiempo	12	0.008667	0.008667	0.000722	1.53	0.155
Error	40	0.018933	0.018933	0.000473		
Total	59	0.807618				

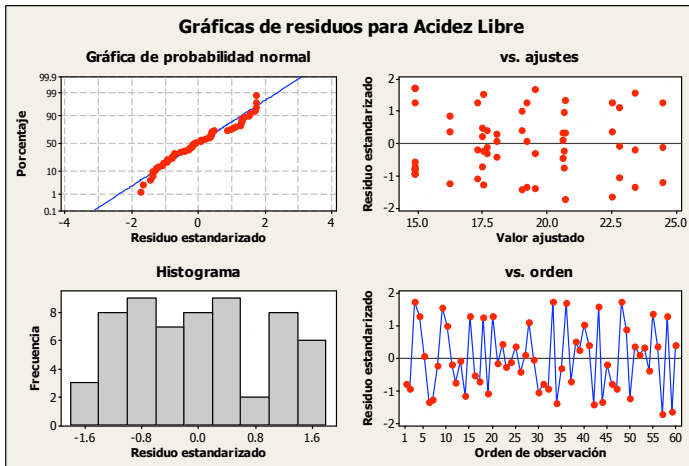
S = 0.0217562 R-cuad. = 97.66% R-cuad.(ajustado) = 96.54%



Análisis de varianza para Acidez Libre, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	6.395	6.395	2.132	0.88	0.478
Tiempo	4	470.394	470.394	117.599	48.59	0.000
Envases*Tiempo	12	29.045	29.045	2.420	4.08	0.000
Error	40	23.756	23.756	0.594		
Total	59	529.590				

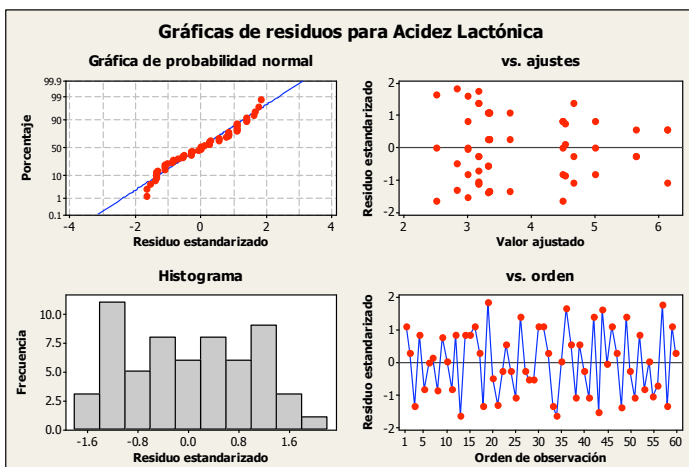
S = 0.770647 R-cuad. = 95.51% R-cuad.(ajustado) = 93.38%



Análisis de varianza para Acidez Lactónica, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	2.5140	2.5140	0.8380	0.60	0.627
Tiempo	4	37.7964	37.7964	9.4491	6.77	0.004
Envases*Tiempo	12	16.7526	16.7526	1.3961	2.57	0.013
Error	40	21.7399	21.7399	0.5435		
Total	59	78.8029				

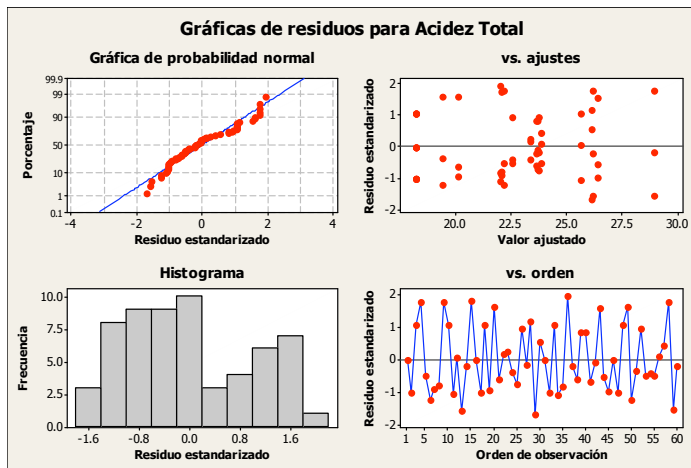
S = 0.737222 R-cuad. = 72.41% R-cuad.(ajustado) = 59.31%



Análisis de varianza para Acidez Total, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	16.500	16.500	5.500	2.16	0.146
Tiempo	4	518.986	518.986	129.746	50.99	0.000
Envases*Tiempo	12	30.535	30.535	2.545	4.91	0.000
Error	40	20.711	20.711	0.518		
Total	59	586.731				

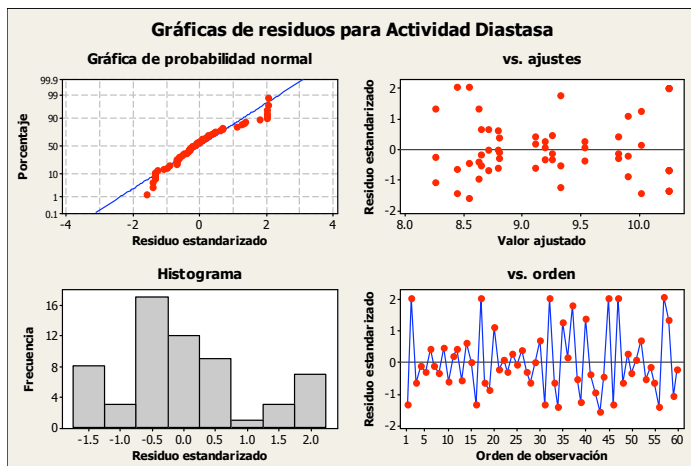
S = 0.719561 R-cuad. = 96.47% R-cuad.(ajustado) = 94.79%



Análisis de varianza para Actividad Diastasa, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1.5737	1.5737	0.5246	6.95	0.006
Tiempo	4	24.8674	24.8674	6.2168	82.33	0.000
Envases*Tiempo	12	0.9061	0.9061	0.0755	1.01	0.457
Error	40	2.9878	2.9878	0.0747		
Total	59	30.3350				

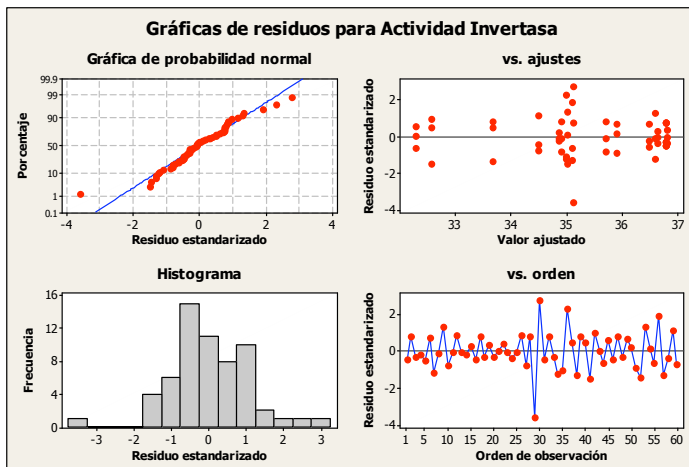
S = 0.273304 R-cuad. = 90.15% R-cuad.(ajustado) = 85.47%



Análisis de varianza para Actividad Invertasa, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	40.6722	40.6722	13.5574	10.43	0.001
Tiempo	4	53.8481	53.8481	13.4620	10.36	0.001
Envases*Tiempo	12	15.5983	15.5983	1.2999	59.03	0.000
Error	40	0.8808	0.8808	0.0220		
Total	59	110.9995				

S = 0.148391 R-cuad. = 99.21% R-cuad.(ajustado) = 98.83%

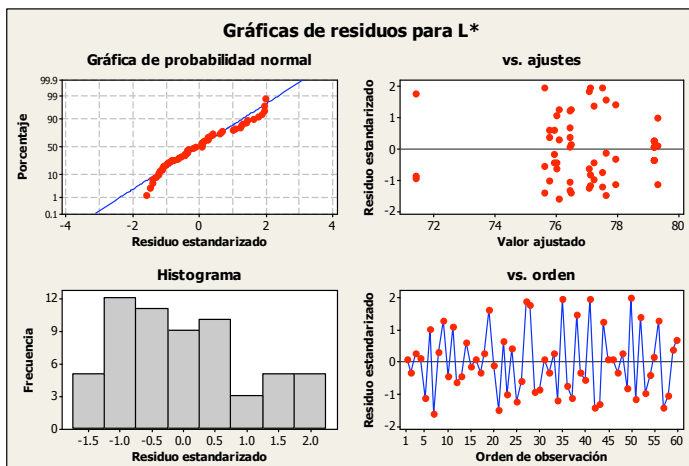


Coordenadas de Color

Análisis de varianza para L*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	13.776	13.776	4.592	0.89	0.474
Tiempo	4	120.704	120.704	30.176	5.86	0.008
Envases*Tiempo	12	61.831	61.831	5.153	11.48	0.000
Error	40	17.951	17.951	0.449		
Total	59	214.262				

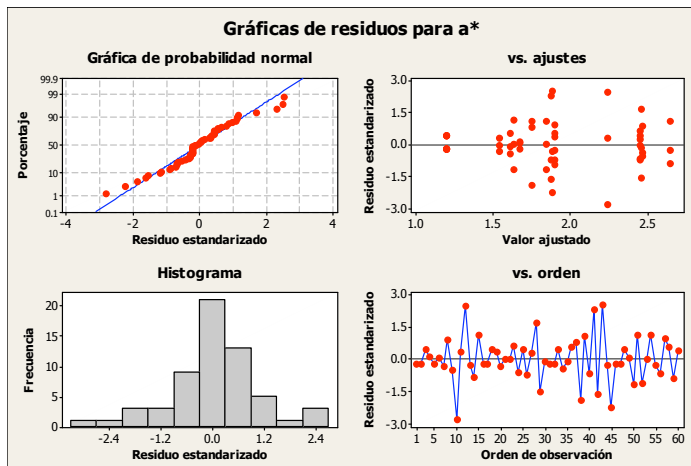
S = 0.669899 R-cuad. = 91.62% R-cuad.(ajustado) = 87.64%



Análisis de varianza para a*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1.90966	1.90966	0.63655	5.00	0.018
Tiempo	4	9.23966	9.23966	2.30991	18.13	0.000
Envases*Tiempo	12	1.52917	1.52917	0.12743	2.93	0.005
Error	40	1.73953	1.73953	0.04349		
Total	59	14.41802				

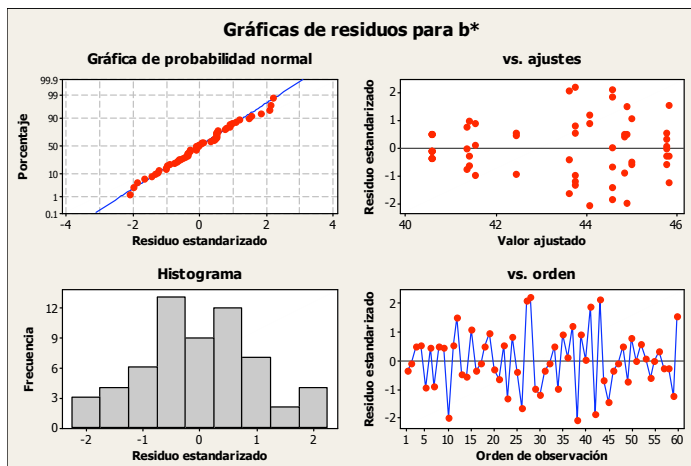
S = 0.208539 R-cuad. = 87.94% R-cuad.(ajustado) = 82.20%



Análisis de varianza para b*, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	13.472	13.472	4.491	5.26	0.015
Tiempo	4	193.576	193.576	48.394	56.69	0.000
Envases*Tiempo	12	10.243	10.243	0.854	2.26	0.027
Error	40	15.124	15.124	0.378		
Total	59	232.415				

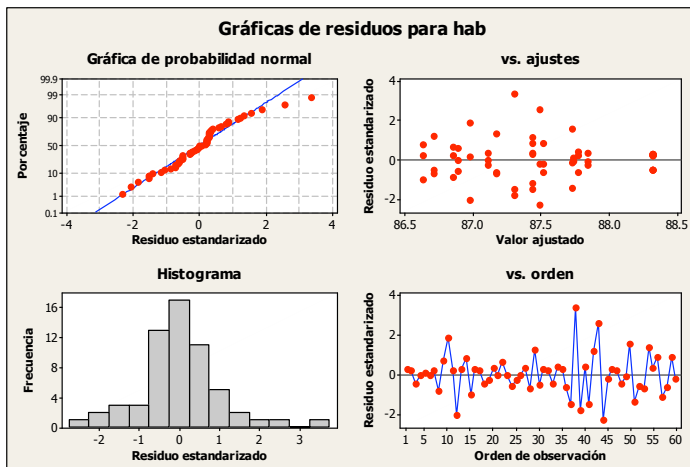
S = 0.614900 R-cuad. = 93.49% R-cuad.(ajustado) = 90.40%



Análisis de varianza para h_{ab}^* , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1.49126	1.49126	0.49709	3.88	0.038
Tiempo	4	14.22308	14.22308	3.55577	27.73	0.000
Envases*Tiempo	12	1.53865	1.53865	0.12822	2.24	0.028
Error	40	2.29307	2.29307	0.05733		
Total	59	19.54606				

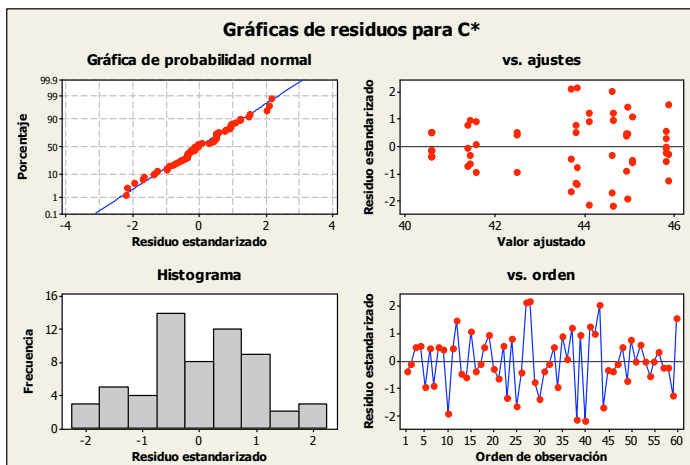
S = 0.239430 R-cuad. = 88.27% R-cuad.(ajustado) = 82.70%



Análisis de varianza para C^* , utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	13.232	13.232	4.411	5.28	0.015
Tiempo	4	196.588	196.588	49.147	58.87	0.000
Envases*Tiempo	12	10.019	10.019	0.835	2.16	0.034
Error	40	15.450	15.450	0.386		
Total	59	235.289				

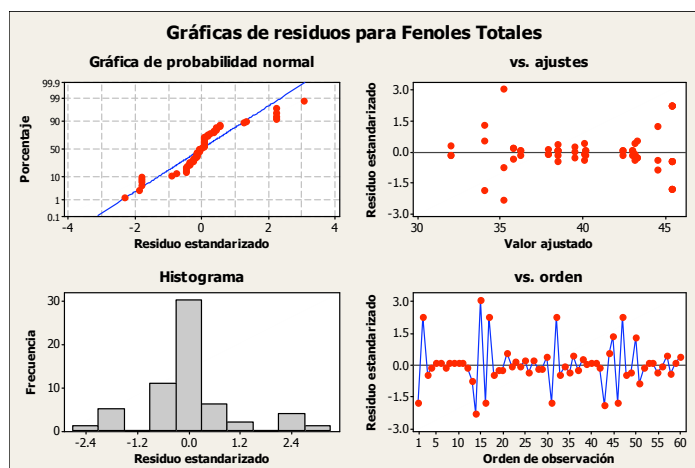
S = 0.621489 R-cuad. = 93.43% R-cuad.(ajustado) = 90.31%



Análisis de varianza para Fenoles Totales, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	91.133	91.133	30.378	7.46	0.004
Tiempo	4	870.799	870.799	217.700	53.44	0.000
Envases*Tiempo	12	48.881	48.881	4.073	61.88	0.000
Error	40	2.633	2.633	0.066		
Total	59	1013.447				

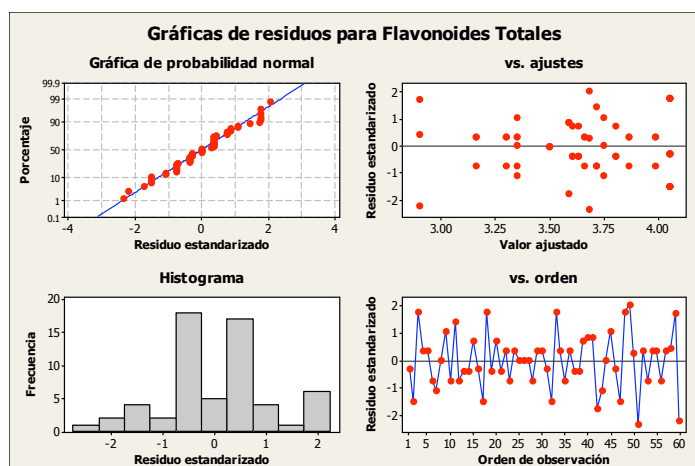
S = 0.256561 R-cuad. = 99.74% R-cuad.(ajustado) = 99.62%



Análisis de varianza para Flavonoides Totales, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	1.22067	1.22067	0.40689	10.16	0.001
Tiempo	4	4.33922	4.33922	1.08481	27.09	0.000
Envases*Tiempo	12	0.48051	0.48051	0.04004	0.68	0.756
Error	40	2.34187	2.34187	0.05855		
Total	59	8.38227				

S = 0.241964 R-cuad. = 72.06% R-cuad.(ajustado) = 58.79%



Análisis de varianza para Actividad Antioxidante, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
Envases	3	24.333	24.333	8.111	10.04	0.001
Tiempo	4	412.960	412.960	103.240	127.82	0.000
Envases*Tiempo	12	9.693	9.693	0.808	6.45	0.000
Error	40	5.010	5.010	0.125		
Total	59	451.996				

S = 0.353902 R-cuad. = 98.89% R-cuad.(ajustado) = 98.37%

