

75588

BETTIN TAPIA, ENRIQUE ANDRÉS

Identificación y caracterización de fósforos y azúcares en la dieta equina

2016 **75588**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para optar al grado de Magister
en Inocuidad y Calidad de Alimentos

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDEOS Y ÁCIDOS
FENÓLICOS EN MIELES ARGENTINAS.**

Ing. Andrés Enrique Bettin Tapia

Director: Dr. Juan Miguel Marioli

Codirector: Dra. Marcela Moressi

2016

7588

M:
Credit:
T. 1069

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDOS
FENÓLICOS EN MIELES ARGENTINAS.**



Ing. Andrés Enrique Bettin Tapia



Dr. Juan Miguel Marioli
Director



Dra. Marcela Moressi
Codirector



Mgter. Laura RUFFINATTO



Dr. Fernando J. ARÉVALO



Dr. Claudio CEBALLOS

AGRADECIMIENTOS:

Agradecer primero a Dios, por todas las cosas bellas, buenas y maravillosas que me ha regalado en todos estos años de vida, por permitirme conocer personas especiales y ver el mundo.

A mi familia, mi esposa Elizabeth, quien ha batallado a mi lado en estos últimos 10 años y me ha regalado mis dos hermosos tesoros, mis hijas, María Celeste y Julietha, las cuales son la miel que endulza mi vida.

A mis padres, Emilia y Olimpo, y a mi hermano Juan Pablo, por apoyarme siempre y estar a mi lado en los momentos alegres y tristes.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme ser parte de tan prestigiosa Institución.

Al Dr. Juan Miguel Marioli y la Dra. Marcela Moressi, por brindarme su apoyo y conocimientos e impulsar esta tesis.

Agradecimiento especial a los diferentes organismos e instituciones, por donar las muestras de miel, que fueron objeto de este estudio, especialmente a la oficina del Programa para el Desarrollo Apícola de la Secretaría de Extensión y Desarrollo de la Universidad Nacional de Río Cuarto, la Asociación cooperativa del Proyecto de Apoyo a Egresados de Comunidades Aborígenes (PROAPE) y a la Asociación Civil Miel Patagonia Sur Argentina (APAVIRCH).

*“He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña,
sin saber que la verdadera felicidad
está en la forma de subir la escarpada”*

Gabriel García Márquez

INDICE

INDICE	iii
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
	Página
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1. La miel en la historia.	1
1.2. La miel.	2
1.3. Como se produce la miel.	3
1.3.1. Composición química y parámetros de calidad.	3
<i>Flavonoides</i>	6
1.4. Las sustancias fenólicas.	8
1.4.1. Ruta biosintética.	8
1.5. Antecedentes de análisis de flavonoides en miel.	12
CAPITULO 2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo general.	15
2.2. Objetivos específicos.	15
CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Solventes y reactivos.	16
3.2. Muestras de Miel.	16
3.3. Análisis fisicoquímicos.	18
3.3.1. Determinación de pH: IRAM 15938	18
3.3.2. Determinación de la Humedad: IRAM 15931	19
3.3.3. Determinación de la Acidez Libre: IRAM 15933	20
3.3.4. Determinación de Cenizas: IRAM 15932	21
3.3.5. Determinación del Color Lovibond 2000: IRAM 15941-1	21

5.3.6. Determinación del contenido de Hidroximetilfulfural: IRAM 15937-2	22
3.4. Análisis cromatográfico.	24
3.4.1. Condiciones cromatográficas.	24
3.4.2. Métodos de extracción de los analitos de interés.	24
3.4.3. Cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos.	27
 CAPITULO 4. RESULTADOS	
4.1. Análisis fisicoquímicos.	28
4.1.1. Determinación de color.	28
4.1.2. Determinación de pH.	29
4.1.3. Determinación de humedad.	30
4.1.4. Determinación de acidez.	31
4.1.5. Determinación de cenizas.	32
4.1.6. Determinación de HMF.	33
4.2. Identificación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos.	34
4.2.1. Obtención de curvas de calibración.	34
4.2.2. Curvas de calibración.	38
4.2.3. Cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos en las muestras de miel.	44
 CAPITULO 5. DISCUSIÓN.	
5.1. Parámetros fisicoquímicos.	47
5.2. Presencia de flavonoides y ácidos fenólicos.	49
 CAPITULO 6. CONCLUSIÓN.	53
 CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA.	54
 ANEXOS.	

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	La recolección de miel, Cueva de la Araña.	1
2	Estructura química básica de los flavonoides y de las diferentes subfamilias.	7
3	Ruta del ácido siquímico.	9
4	Ruta Biosintética ácido cinámico.	10
5	Ruta Biosintética para derivados del ácido cinámico.	11
6	Flujograma de la extracción de compuestos fenólicos.	26
7	Color de Muestras de Miel Analizadas.	28
8	Promedio de pH de las muestras de mieles analizadas.	29
9	Promedio de humedad de las muestras de mieles analizadas.	30
10	Promedio de acidez de las muestras de mieles analizadas.	31
11	Promedio de determinación de cenizas en muestras de mieles analizadas.	32
12	Promedio de determinación de HMF en muestras de mieles analizadas.	33
13	Cromatograma muestra de patrón ácido caféico analizada por HPLC.	34
14	Cromatograma muestra de patrones de ácidos fenólicos analizadas por HPLC.	35
15	Cromatograma muestra de patrones de flavonoides analizados por HPLC.	36
16	Curva de calibración Canferol.	38
17	Curva de calibración Naringenina.	38
18	Curva de calibración Isoquercetina.	39
19	Curva de calibración Ácido Vanílico.	39
20	Curva de calibración Ácido Siríngico.	40
21	Curva de calibración Ácido Caféico.	40
22	Curva de calibración Ácido Cinámico.	41
23	Curva de calibración Ácido p-Cumárico.	41
24	Curva de calibración Ácido Metoxibenzoico.	42
25	Curva de calibración Ácido Hidroxibenzoico.	42
26	Cromatograma de la muestra ABF 2 de Formosa, con éter sulfúrico.	44
27	Cromatograma de la muestra ABF 2 de Formosa, con acetato de etilo.	45

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Codificación de muestras de miel analizadas.	17
2	Tabla Chataway para la determinación de la Humedad.	20
3	Análisis estadístico del parámetro color.	28
4	Análisis estadístico del parámetro pH.	29
5	Análisis estadístico del parámetro humedad.	30
6	Análisis estadístico del parámetro acidez.	31
7	Análisis estadístico del parámetro cenizas.	32
8	Análisis estadístico del parámetro HMF.	33
9	Tiempos de retención de los patrones vs rangos de tiempo de muestras analizadas.	37
10	Resultados de regresión de las curvas de calibración.	43
11	Cantidad de flavonoide y ácidos fenólicos presentes en las muestras.	46
12	Comparación de medias de parámetros fisicoquímicos.	47
13	Flavonoides y ácidos fenólicos, según el origen geográfico.	49

RESUMEN

Se identificaron y cuantificaron los flavonoides y ácidos fenólicos en mieles de diferentes regiones de Argentina, tales como, Rio Cuarto, La Carlota, Formosa, Chaco y Chucul, no sin antes determinar los parámetros fisicoquímicos de estas mieles, con el fin de verificar la calidad de las mismas.

Se utilizaron las normas IRAM para la determinación de los parámetros fisicoquímicos de color, pH, humedad, acidez, HMF y cenizas, evidenciando cumplimiento a todas estas y confirmando la alta calidad que tiene las mieles argentinas, en base al uso de estos estándares fisicoquímicos.

Se propone ampliar los estudios en base a establecer parámetros que permitan la identificación y posterior referencia de control respecto a los componentes presentes en las mieles argentinas de distintas procedencias. Para ello, fue necesario estandarizar un método de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), que permitiera la identificación de múltiples sustancias fenólicas, por lo anterior, se analizaron dos muestras, una con éter sulfúrico y la otra con acetato de etilo, con el fin de ampliar el número de sustancias a identificar, por consiguiente, se lograron identificar los flavonoides Naringenina, Quercetina y Canferol, y los ácidos fenólicos Caféico, Cinámico, Hidroxibenzoico, Metoxibenzoico, p-Cumárico y Siringico.

Las cuantificaciones se realizaron por interpolación en las curvas de calibración de los respectivos patrones, encontrando que la naringenina fue el flavonoide presente en la mayoría de las muestras, y en cantidades que van desde los 2,6 mg/kg de miel hasta los 24,31 mg/kg de miel. Por su parte, los ácidos fenólicos mayormente identificados fueron ácido cafeico, ácido hidroxibenzoico, ácido metoxibenzoico y ácido p-cumárico. El ácido p-cumárico fue el que se encontró en mayor cantidad arrojando resultados que van desde los 3,80 mg/kg de miel hasta los 11,80 mg/kg de miel, seguido del ácido hidroxibenzoico desde los 2,00 mg/kg de miel hasta los 17,10 mg/kg de miel y el ácido cafeico desde los 0,03 mg/kg de miel hasta los 12,05 mg/kg de miel.

PALABRAS CLAVES: HPLC, miel, Flavonoides, ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Flavonoids and phenolic acids were identified and quantified in honeys from different regions of Argentina, such as Rio Cuarto, La Carlota, Formosa, Chaco and Chucul. Some physicochemical parameters of these honeys were analyzed, in order to verify their quality.

IRAM procedures were used to determine of the following physicochemical parameters: color, pH, water content, acidity, HMF and ashes, demonstrating fulfillment of quality parameters and confirming the high quality of Argentine honeys, based on the use of these physicochemical standards.

It is proposed to extend the studies based on set parameters to identification and subsequent control reference, respect to the present's components in Argentine honeys from different sources. For that, a High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) method was standardized for the identification and quantization of multiple phenolic substances. Two liquid-liquid extractions were performed on each honey sample, one with ethyl ether and another with ethyl acetate, which allowed the preliminary fractionation of phenolic substances. The procedure allowed us to identify and quantify flavonoids such as naringenin, kaempferol and quercetin. Also, the following phenolic acids were identified and quantified: caffeic, cinnamic, hydroxybenzoic, methoxybenzoic, p-coumaric and syringic.

Quantifications were performed by interpolation on the calibration curves for each compound. The flavonoid naringenin was found in most of the samples, in amounts ranging from 2.6 mg/kg to 24.31 mg/kg of honey. Caffeic acid, hydroxybenzoic acid, methoxybenzoic acid and p-coumaric acid were the phenolic acids mostly found in the honey samples analyzed. p-coumaric acid was found in greater numbers yielding amounts ranging from 3.80 mg/kg up to 11.80 mg/kg of honey, followed by hydroxybenzoic acid from 2 mg/kg up to 17,10 mg/kg of honey and caffeic acid from 0.03 mg/kg to the 12.05 mg/kg of honey.

KEYWORDS: HPLC, honey, flavonoids, phenolics acids.



CAPITULO 1 - INTRODUCCION

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1. La Miel en la historia.

La apicultura, arte de criar abejas para cosechar la miel, data de tiempos antiguos. No se sabe a ciencia cierta desde qué época o edad empezó a implementarse esta técnica, pero los historiadores sitúan su florecimiento desde principios de la Edad de Bronce, cuando los fenicios -diestros marineros- alcanzaron la costa suroeste de la Península Ibérica y entraron en contacto con los tartesios, quienes ya desarrollaban esta labor. A partir de entonces, los fenicios, empezaron la comercialización de la miel con los babilonios, y estos a su vez con los romanos y los griegos, quienes la utilizaron como ingrediente básico en diversos productos como vino de miel, ova mellita (huevos con miel), entre otros, y como recurso para el pago de impuestos. Los egipcios, por su parte, la llamaban las lágrimas del Dios Ra, y según el papiro de Tebas, servía no solo para alimentar a sus hijos, sino también para preparar ofrendas faraónicas, tales como carne conservada en barriles de miel y cerveza de miel, entre otros. Igualmente la utilizaban como elemento fundamental de sus ritos funerarios y es muy probable que sirviera como sustancia preservativa en el proceso de embalsamamiento de cadáveres (1).

Se han encontrado pinturas que datan de 6.000 años a. c., en la Cueva de la Araña, en Bicorp (Valencia / España), donde se evidencia entre tantas labores, la recolección de la miel (Figura 1). (2)

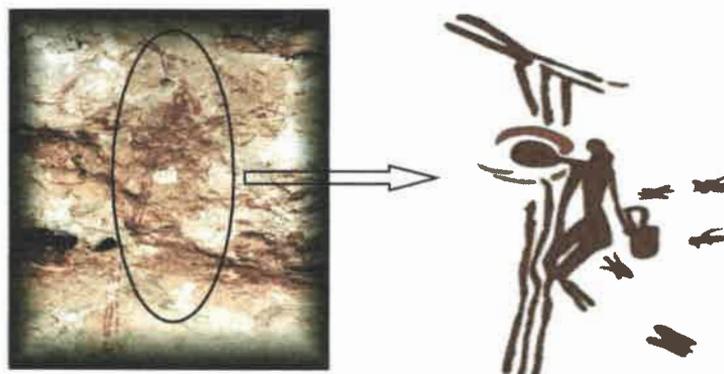


Figura 1. La recolección de miel, Cueva de la Araña, Bicorp (Valencia, España).



La historia de la Miel en América Latina se la debemos a los mayas, quienes elaboraban un producto llamado balché, el cual lo endulzaban con miel de abeja melipona (sin aguijón), que criaban, y contenía además, corteza del árbol balché y agua, utilizándolas para rituales religiosos.

Así pues, la miel fue durante mucho tiempo el elixir de la vida y único edulcorante utilizado por el hombre, antes de ser sustituido por los azúcares refinados manufacturados, como los de caña de azúcar.

En la actualidad la apicultura es una actividad de primer orden en países como China, México y Argentina, considerados los mayores exportadores de miel. Argentina, produce alrededor de 65.000 toneladas de miel por año y destina el 80% de la producción apícola a mercados internacionales de alto nivel, como lo son Alemania y Francia. Estados Unidos, como principal país mundial comprador de miel, tiene una relación comercial con Argentina de cerca de USD 500.00 (valor año 2013), mientras que Alemania es el segundo país comprador de miel con cerca de 88.000 toneladas al año, de las cuales Argentina provee cerca de 14.000 toneladas al año.(3)

1.2. La Miel.

Según El Código Alimentario Argentino se define a la miel como:

“Con la denominación de miel o miel de abeja, se entiende el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenándolo en paneles, donde madura hasta completar su formación” (4).

Según la Norma Técnica Colombiana NTC 1273, se define la miel como:

“La miel es una sustancia dulce natural producida por abejas obreras de diferentes especies a partir del néctar de las plantas, de las secreciones de las partes vivas de plantas o de las excreciones de insectos que succionan las partes vivas de las plantas, sustancia que las abejas recolectan, transforman



mediante la combinación de propias sustancias específicas, depositan, deshidratan, almacenan y dejan madurar al interior de la colonia” (5).

Las mieles de mielato son fabricadas a partir de secreciones presentes en las plantas (hojas) producidas por insectos que las atacan, extraen la savia y consumen solo las sales minerales y las proteínas, excretando los azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa). Las abejas recogen este excreto y lo acumulan de igual forma que la miel.

La miel de mielada, es la miel que procede principalmente de secreciones de partes vivas de las plantas diferentes a las flores.

1.3. Como se produce la miel:

Las abejas utilizan el néctar de las flores para producir la miel. El néctar recolectado por las abejas, es mezclado con la saliva de éstas, al pasar por la boca y antes de ser trasladado al buche. La saliva, contiene diversos ácidos, sales minerales, proteínas, y además una enzima, la invertasa, que convierte a la sacarosa del néctar, en glucosa y fructosa (ver ecuación 1). Las abejas al regresar con el buche lleno de néctar a su colmena, lo depositan en el panal o la pasa a alguna abeja obrera, que se encarga de la posterior transformación del néctar en miel. Una vez concluido todo este proceso, las celdas que contienen miel madura, es decir, que contiene menos del 19% de agua, son cerradas con un tapón de cera, por las abejas obreras, hasta su cosecha (6).



Ecuación 1

1.3.1. Composición química y parámetros de calidad.

La composición química de la miel va a depender de factores tales como, la composición del néctar, el clima, el suelo, el tipo de geo-referenciación botánica, el manejo apícola y el manejo de la cosecha. En el caso específico de la composición del néctar, éste va a depender principalmente de la especie de planta que lo produce.



La miel está formada principalmente por carbohidratos, fructosa (38%) y glucosa (31%), así como también maltosa (7,3%) y sacarosa (1,3%). También es una fuente de vitaminas, principalmente la A, E y K, así como también, las del grupo B, tiamina, niacina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina y biotina, además de ácido ascórbico o vitamina C; y minerales tales como fósforo, magnesio, calcio, hierro, sodio, cobre, calcio y potasio (7).

Los principales parámetros fisicoquímicos que caracterizan una miel son: el color, el aroma, el sabor, grado de cristalización, cuerpo y composición química (8). El color varía desde los tonos blancos hasta los pardos oscuros, existiendo mieles rojizas, amarillentas o verdosas, aunque predominan los tonos castaños-claros o ambarinos. El color oscuro no significa que sea de inferior calidad. Por el contrario, se sabe que cuanto más oscura es la miel, más rica es en fosfato de calcio y en hierro y, por lo tanto, más adecuada para satisfacer las necesidades de individuos en crecimiento, de los individuos anémicos y de los intelectuales sometidos a esfuerzos mentales. La miel de color claro es más rica en vitamina A. Las oscuras son más ricas en vitaminas B y C. El sabor de las mieles de color claro es más suave que las de color oscuro. El contenido de agua de las mieles influye en el sabor y cristalización, por consiguiente, es un factor de calidad importante. Los altos niveles de humedad en la miel permiten el desarrollo de levaduras y el establecimiento de procesos fermentativos, además, a mayor contenido de agua menor tendencia a cristalizarse (9).

Por su parte, la acidez de la miel se debe a la presencia de ácidos orgánicos libres, especialmente el ácido glucónico que proviene de la glucosa, y otros ácidos minoritarios. Estos ácidos orgánicos, influyen en las características fisicoquímicas y sensoriales y es considerado, también, un indicador de calidad de la miel. En Argentina, el límite superior o valor máximo permitido de acidez libre es de 40 meq de ácido/kg, sin embargo en otros países como Colombia se estipula 50 meq/kg.

El pH de la miel es generalmente inferior a 4 en las mieles de néctares, y superior a 5 en las mieles de mielato (promedio de pH 3,9). Las mieles con un pH bajo (3,2 – 3,6) se degradan más fácilmente.



La miel puede sufrir modificaciones químicas. Durante el envejecimiento o descomposición de los azúcares, se inicia la formación de hidroximetilfurfural (HMF), el cual es un aldehído cíclico formado por la degradación de los productos azucarados. Como consecuencia, se producen alteraciones de color, desarrollo de sabores y olores extraños, lo que quiere decir que el HMF va aumentando espontáneamente con el transcurso del tiempo.

Por su parte, la actividad de la enzima diastasa en la miel es un indicador de calidad, ya que la relación tiempo/temperatura en el calentamiento para disminuir la cristalización y la viscosidad, hacen que disminuya la actividad de la enzima y aumente el HMF, produciendo destrucción de algunos azúcares (envejecimiento de la miel) y modificando la frescura de la miel.

La medida de la conductividad eléctrica de la miel, al igual que el contenido de cenizas, orienta sobre las fuentes de origen botánico de la miel, mostrando valores diferentes, según se trate de mieles de flores o de mielada.(10)

Además, la miel presenta gran cantidad de aminoácidos libres, cuyo origen puede ser animal o vegetal; la prolina es el aminoácido libre más importante, se encuentra en mayor proporción constituyendo entre el 50 y el 85%. El contenido de este aminoácido es criterio de calidad en lo que respecta a la maduración y en algunos casos es patrón para determinar adulteraciones. El Codex Alimentarius mundial determina que las mieles genuinas deben contener un mínimo de 180 mg prolina/kg de miel, sin embargo, existen variaciones según el tipo de miel y la zona de producción. (11). Investigadores como *Bogdanov* (12), citan trabajos de otros investigadores, que recomiendan que para la caracterización de mieles uniflorares se tenga en cuenta el contenido de prolina, como parámetro de calidad para determinar su madurez, pero, también sirve para discriminar entre mieles de mielato y florales. Los aminoácidos incluyendo la prolina, junto con los alcoholes, ésteres, aldehídos, etc., juegan un papel importante en las propiedades organolépticas y a dar el aroma característico a cada tipo de miel en función de su origen.



En los últimos años, se han descrito una serie de compuestos que son de gran importancia como marcadores florales de las mieles: **los flavonoides y los ácidos fenólicos.**

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran distribuidos en diferentes alimentos tales como verduras, vino, frutas, granos, miel, entre otros. Se dividen en sub-categorías, entre las cuales se encuentran las antocianidinas, catequinas, glucosido-flavanonas y flavanonas, flavonas, flavonoles y glucosido-flavonoles (13).

La estructura química de los flavonoides se caracteriza por poseer un núcleo fenilpropanoide de 15 átomos de carbono, el cual consiste en dos anillos de benceno unidos a través del heterociclo pirano. Al ser modificado enzimáticamente por glicosilación, acilación o metilación el núcleo fenilpropanoide genera un escaso número de estructuras básicas del esqueleto fenilpropanoide a partir de las cuales se deriva la amplia gama de flavonoides entre los que se incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, isoflavonas y antocianinas (Figura 2).

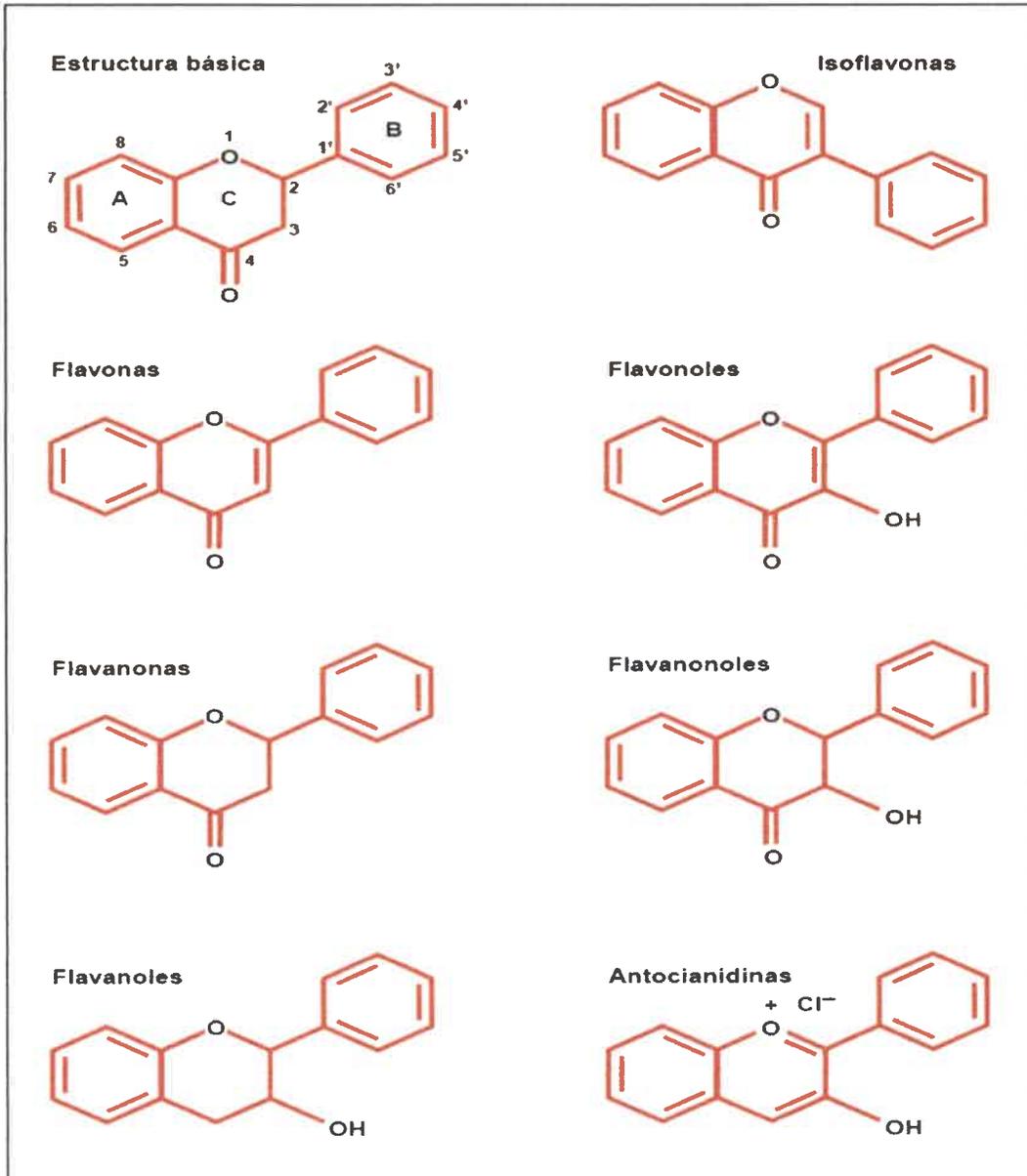


Figura 2. Estructura química básica de los flavonoides y de las diferentes subfamilias.

En varios estudios de flavonoides en mieles (16-19), se ha demostrado que estas tienen un notable perfil fenólico que son aportados por varios ácidos y ésteres orgánicos aromáticos y por la presencia de flavonoides. Por otra parte, el conocimiento de sus flavonoides y el contenido de los ácidos fenólicos en mieles de diversos climas, podría ser no solamente un marcador del origen floral sino también un indicador potencial de su calidad biológica.



Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias presentes en alimentos de origen vegetal. Por su parte, las sustancias polifenólicas, las cuales son conformadas por ácidos fenólicos y flavonoides, conforman una fuente de captación de radicales libres y de allí su importancia en la capacidad antioxidante.

La miel posee un alto contenido de estas sustancias. Por ende, se comporta como un alimento antioxidante y, a su vez, estas sustancias sirven para determinar el origen floral y su calidad biológica.

1.4. Las sustancias fenólicas

1.4.1. Ruta Biosintética.

En las plantas, los flavonoides son sintetizados a partir de flavanonas derivadas a su vez de chalconas provenientes de la ruta fenilpropanoide (14). La síntesis de las estructuras básicas de los esqueletos flavonoides recae sólo en 3 grupos de enzimas: oxigenasas dependientes del 2-oxo glutarato, citocromo P450hidroxilasas y reductasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico, esta última es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores.

La ruta del ácido siquímico (figura 3), es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. (15)

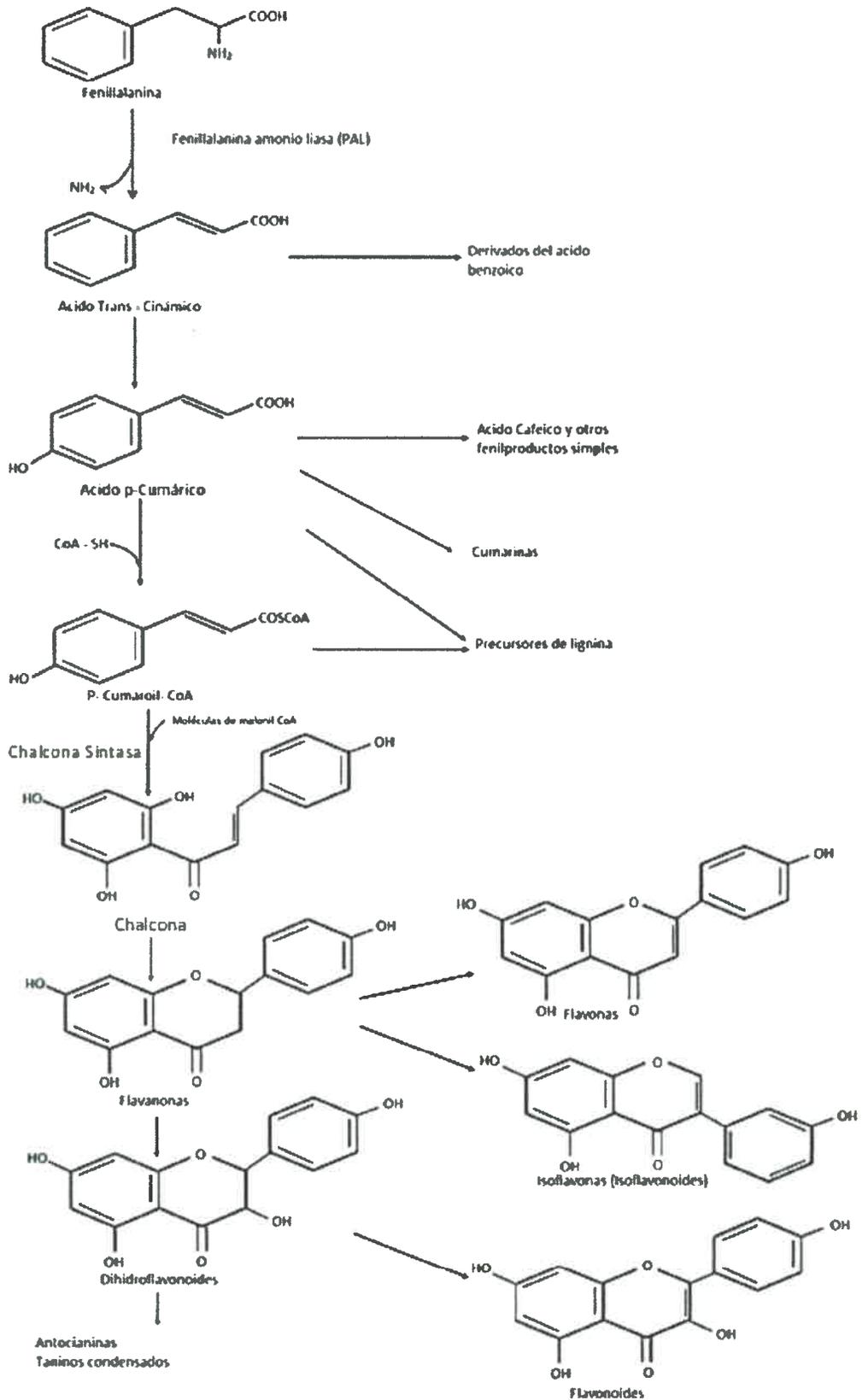


Figura 3. Ruta del ácido siquímico: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flavonas, isoflavonas y flavonoides.

El ácido cinámico se forma a partir de fenilalanina, por la acción de la enzima L-fenilalanina (PAL), que es capaz de catalizar la eliminación amoníaco (Figura 4). Los derivados del ácido cinámico como lo son el ácido hidroxicinámico (p-cumárico), ácido 3,4-dihidroxicinámico (cafeico), ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (ferúlico), ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (sináptico) y ácido p-metoxicinámico, se forman de los procesos de oxidación y/o reacciones de metilación (Figura 5).

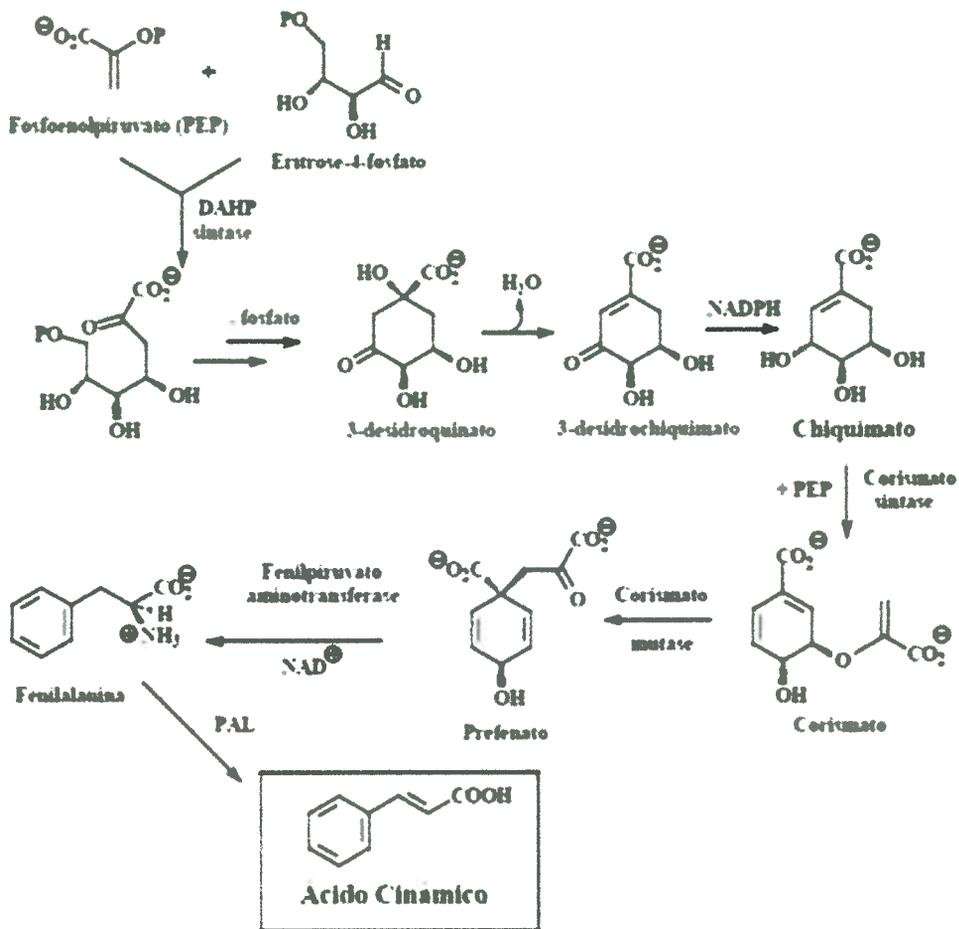


Figura 4. Ruta Biosintética Ácido cinámico. (14)

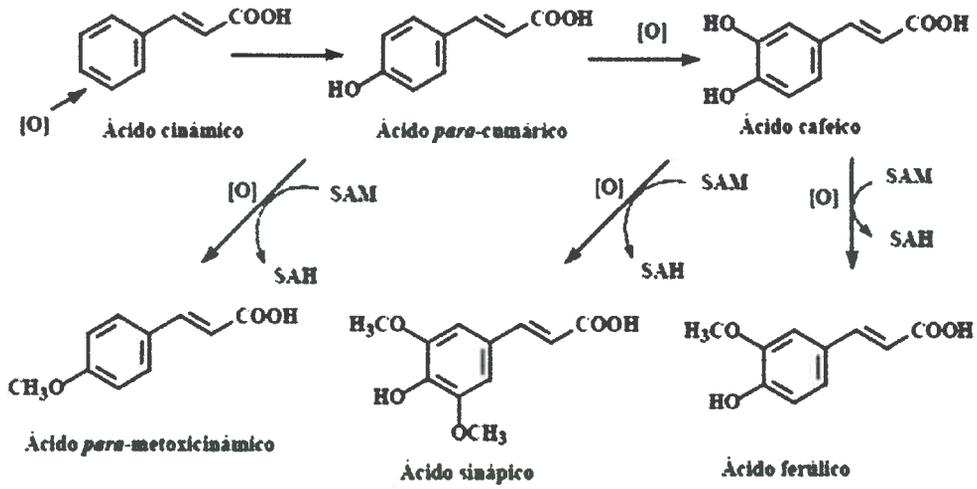


Figura 5. Ruta Biosintetica para derivados del Ácido cinámico. (14)



1.5. ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE FLAVONOIDES EN MIEL

Para determinar estos compuestos, generalmente se han realizado estudios utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia (según sus siglas en inglés HPLC - High Performance Liquid Chromatography), que es un método de separación física basada en la distribución de los componentes entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil.

Daigle y Conkerton (16) realizaron una revisión del análisis de flavonoides en 1983, utilizando HPLC, con detector de arreglo de diodos. En estos estudios las columnas utilizadas fueron casi exclusivamente en fase inversa (RP) con medidas desde 100 a 300 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno; y el sistema de elución fue binario utilizando una solución acuosa acidificada como disolvente polar, y un disolvente orgánico menos polar tal como el metanol o el acetonitrilo.

Tomas-Barberan (17), estudió a través de la cromatografía líquida de alta eficacia, los perfiles de flavonoides como marcadores para el origen botánico en 52 muestras de mieles monoflorales europeas, concluyendo que los compuestos fenólicos pueden ser marcadores útiles para el origen floral de algunos tipos de miel, como por ejemplo la Hesperetina, el cual fue confirmado como un marcador para mieles de cítricos.

Por su parte, Yao, L. (18), analizó nueve mieles monoflorales de eucalipto de Australia, relacionándolas con su origen botánico, obteniendo que el contenido promedio de flavonoides varió entre 1,90 mg/100 g de miel para miel de *Eucalyptus globoidia* a 8,15 mg/100 g para miel de hoja estrecha de *Eucalyptus crebra*, lo que significó que existieron diferencias cuantitativas entre las diferentes mieles de eucalipto. El estudio de perfil de las muestras analizadas presentó compuestos tales como tricetina, quercetina, luteolina, miricetina y canferol, que son sugeridos como marcadores florales para mieles de eucalipto, concluyendo que el perfil de flavonoides es común para todas las mieles de eucalipto, con independencia de su origen geográfico.

Ceksteryte (19), analizó la composición de flavonoides en mieles de lituania, a través HPLC, identificando y cuantificando los siguientes flavonoides: vitexina, rutina,



hyperosida, quercitrina, quercetina, canferol, isorhamnetina, vitexina-o-rhamnosida. Los datos indicaron que en la miel de primavera y de verano, el contenido total de flavonoides fue 282,8 mg/100 g y 3019.2 mg/100 g respectivamente. Concluyeron que el resultado muestra diferencias estadísticamente significativas en el contenido cuantitativo de los flavonoides de mieles de primavera y verano. Por otra parte, el flavonoide hyperosida, puede servir como un marcador para el tipo de miel de sauce, que proviene de primavera y el flavonoide vitexina puede ser usado como marcador para la identificación de miel de semillas de alcaravea y limón.

Muñoz (20), estudió el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides e índice antioxidante de mieles chilenas, utilizando también HPLC, logrando identificar y cuantificar estos compuestos en 26 muestras de mieles del norte, centro y sur de Chile, y determinando la capacidad antioxidante de algunos compuestos. Los principales flavonoides detectados en este estudio, fueron: pinocembrina, pinobanksina, quercetina, canferol, crisina, galangina y otras dos flavanonas no identificadas. La pinobanksina y el kaempferol son compuestos típicamente identificados en mieles chilenas. Se encontró que los niveles de fenoles y flavonoides en mieles chilenas son relativamente altos con respecto a otras mieles.

Por su parte, Vit (21), caracterizó las mieles checas según su capacidad antioxidante, a través del contenido de compuestos fenólicos y su relación con el color de la miel. Analizó 50 muestras de miel divididas en: 22 mieles florales, 15 mieles de mielada y 13 mieles mixtas. El color de las mieles varió entre 22 y 120 mm según la escala de color que se mide con el colorímetro Pfund, el contenido de flavonoides varió entre 1,90 y 15,74 mg/100 g miel, y el contenido de polifenoles varió entre 47,39 y 265,49 mg/100 g miel, concluyendo que la actividad antioxidante fue directamente proporcional al color y al contenido de flavonoides y polifenoles presentes, además, se observó que existe correlación de los tres parámetros, respecto a la capacidad antioxidante de la miel.

Alabdeen Makawi (22), determinó el contenido de flavonoides en siete mieles de flores de diferentes orígenes botánicos de las distintas regiones de Sudan. Los flavonoides se determinaron mediante HPLC, Se identificaron principalmente: la quercetina, canferol, apigenina, hesperetina e isorhamnetina.



Pelachim (23), estudió el perfil de las sustancias fenólicas, utilizando HPLC, identificando los ácidos fenólicos y los flavonoides en 24 muestras de miel entre las cuales están, mieles silvestres, de eucalipto y de naranja, obtenidas de diferentes regiones del Brasil. En su estudio indicó que existe una gran variación de los perfiles de los compuestos fenólicos en los diversos tipos de miel estudiados, identificando flavonoides tales como: quercetina, morina, tricetina e isoquercetina, así como también ácidos fenólicos tales como: p-cumárico, vanílico, p-metoxi-benzoico, protocatecuico, p-hidroxi-benzoico, entre otros.

Dado que a la fecha no existen datos relacionados al contenido de este tipo de compuestos en mieles de Río Cuarto (Argentina) y debido que éste es uno de los principales países productores de miel, se consideró conveniente realizar estudios tendientes a profundizar los conocimientos que se tiene de las mieles procedentes de diferentes regiones del país, haciendo hincapié en su contenido de flavonoides y el empleo del perfil de los mismos para su diferenciación geográfica.

A close-up photograph of a golden liquid, likely honey or oil, being poured into a shallow, reflective dish. The liquid is captured in mid-pour, creating a dynamic, swirling pattern on the surface. The lighting is warm, highlighting the rich golden color and the metallic sheen of the dish.

CAPITULO 2 - OBJETIVOS



CAPITULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y cuantificar los distintos tipos de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en algunas mieles argentinas, utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia y así poder caracterizarlas en relación al contenido de los mismos.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar fisicoquímicamente las muestras.
- Definir y poner a punto la metodología de extracción de los ácidos fenólicos y flavonoides.
- Analizar el perfil cromatográfico de cada una de las muestras con el fin de identificar y cuantificar los ácidos fenólicos y flavonoides presentes.

A close-up photograph of a golden metal surface, possibly a piece of jewelry or a decorative object. A small, sharp, golden object is protruding from the surface, creating a focal point. The lighting is warm, highlighting the metallic texture and the sharp edges of the object.

***CAPITULO 3 – MATERIALES Y
METODOS***



CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Solventes y Reactivos

Los solventes utilizados fueron grado de pureza espectroscópico. El agua utilizada fue agua destilada y purificada a través del purificador Barnstead Easy Pure II.

Los patrones de los ácidos: cinámico, caféico, protocatecuico, p-cumárico, gálico, p-metoxibenzoico, p-hidroxibenzoico y vanílico, fueron donados por Regina Lucia Pelachim Lianda, de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, al igual que los flavonoides morina, canferol, rutina, isoquercetina y naringenina. El flavonoide quercetina fue obtenido de Merck (Darmstad, Alemania). Los patrones fueron preparados individualmente. Las soluciones fueron hechas al 1% en metanol (grado espectroscópico).

Las sustancias fenólicas fueron separadas por cromatografía en columna abierta, utilizando resina de Amberlita XAD – 2 (copolimero de estireno y divinilbenzeno, con poro 9 nm y partícula 0,3 – 1,2 mm), obtenido comercialmente en Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Los solventes y las muestras fueron filtradas previamente en membrana de nylon de 0,45 μm , antes de ser inyectadas en el HPLC.

La Eliminación de los solventes de los extractos obtenidos en la columna abierta y las ampollas, fue realizada en un rotavapor IKA RV 10 Digital, a temperatura de 40°C en el baño de agua y a presión reducida.

Cabe destacar que todos los análisis realizados se hicieron en el laboratorio de servicios de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

3.2. Muestras de Miel.

Las mieles estudiadas provienen de la:



- **Región pampa húmeda:** ciudad de Río Cuarto, y de las localidades de Chucul, Las Higueras y La Carlota, todas forman parte de la Provincia de Córdoba, y fueron concedidas por diferentes apicultores a través de la oficina del Programa para el Desarrollo Apícola de la Secretaria de Extensión y Desarrollo de la Universidad Nacional de Río Cuarto.
- **Región del norte grande argentino:** provincias de Chaco y Formosa. Las muestras de Formosa fueron donadas por la Asociación cooperativa del Proyecto de Apoyo a Egresados de Comunidades Aborígenes (PROAPE).
- **Patagonia:** específicamente de la provincia de Chubut, donadas por la Asociación Civil Miel Patagonia Sur Argentina (APAVIRCH).

El número total de muestras estudiadas fue treinta (30) (Tabla 1), las que se mantuvieron almacenadas a temperatura de 4 °C.

Tabla 1. Codificación de muestras de miel analizadas.

ORIGEN GEOGRAFICO	CODIFICACION DE LA MUESTRA	
Río Cuarto, Chucul y Las Higueras	ABR 1	ABR 5
	ABR 2	ABR 6
	ABR 3	ABR 7
	ABR 4	ABR 8
La Carlota	ABC 1	
	ABC 2	
	ABC 3	
Formosa	ABF 1	
	ABF 2	
	ABF 3	
	ABF 4	
Chubut	ABAP 1	ABAP 6
	ABAP 2	ABAP 7
	ABAP 3	ABAP 8
	ABAP 4	ABAP 9
	ABAP 5	
Chaco	ABCHA 1	ABCHA 4
	ABCHA 2	ABCHA 5
	ABCHA 3	ABCHA 6



3.3. Análisis Físicoquímicos.

Las diferentes pruebas físicoquímicas se realizaron según la normativa del Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (IRAM), para cada una de las siguientes pruebas:

- Determinación de pH: **IRAM 15938**
- Determinación de la Humedad: **IRAM 15931**
- Determinación de la Acidez Libre: **IRAM 15933**
- Determinación de Cenizas: **IRAM 15932**
- Determinación del Color Lovibond: **IRAM 15941-1**
- Determinación del contenido de Hidroximetilfulfural por el método del hidrogenosulfito de sodio según White: **IRAM 15937-2**

Preparación de la muestra:

- Las muestras líquidas se analizaron sin tratamiento adicional.
- Mieles total o parcialmente cristalizadas. Se colocó una cantidad pequeña en un recipiente y se calentó en un baño de agua que no sobrepasó los 60°C.
- Cuando se produjo la disolución de los cristales, se mezcló perfectamente y se enfrió rápidamente.
- Todas las muestras se homogenizaron suficientemente, mediante la agitación durante por lo menos 3 minutos, evitando la incorporación de aire.
- En el caso de mieles líquidas o cristalizadas con impurezas, se purificaron, quitando las impurezas de mayor tamaño, se agitaron a temperatura ambiente hasta que quedaron bien mezcladas y se pasaron por el tamiz, con la ayuda de una espátula.

3.3.1. Determinación de pH: IRAM 15938

El instrumental utilizado fue:

- pH-metro ORIÓN modelo 720A.

Se calibró el pH-metro antes de su empleo, con la ayuda de las soluciones reguladoras de pH 7 y pH 4.



El procedimiento empleado fue el siguiente:

- Se pesó 10 g de miel en un vaso de precipitado de 250 ml limpio y seco, y se disolvió con porciones de agua destilada hasta completar 100 ml.
- Luego se sumergió el electrodo en el líquido y se leyó el valor del pH.

3.3.2. Determinación de la Humedad: IRAM 15931

El contenido de humedad de la miel se determinó indirectamente, a través de los índices de refracción de la tabla Chataway (tabla 2).

El instrumental utilizado fue:

- Refractómetro Abbe. (ATAGO R-5000, Japón)

Procedimiento:

- Se colocó con una varilla de vidrio, limpia y seca, una gota de miel según la preparación anterior, entre los prismas limpios y secos del refractómetro.
- Luego se realizaron las lecturas a 20 °C de acuerdo con las instrucciones del aparato y se determinó mediante la tabla el contenido de humedad en gramos por cien gramos.
- Las determinaciones realizadas a temperatura que no fueron 20 °C, se convirtieron a esa temperatura utilizando las correcciones que se indican a continuación:

Para temperaturas mayores a 20 °C, al valor del índice de refracción leído en el refractómetro, se le añade 0,00023 por cada grado Celsius.

Para temperaturas menores a 20 °C, al valor del índice de refracción leído en el refractómetro, se le resta 0,00023 por cada grado Celsius.



Tabla 2. Tabla Chataway para la determinación de la Humedad.

Indice de Refracción 20°C	Contenido de Humedad (%)	Indice de Refracción 20°C	Contenido de Humedad (%)	Indice de Refracción 20°C	Contenido de Humedad (%)
1,5044	13.0	1,4940	17.0	1,4840	21.0
1,5038	13.2	1,4935	17.2	1,4835	21.2
1,5033	13.4	1,4930	17.4	1,4830	21.4
1,5028	13.6	1,4925	17.6	1,4825	21.6
1,5023	13.8	1,4920	17.8	1,4820	21.8
1,5018	14.0	1,4915	18.0	1,4815	22.0
1,5012	14.2	1,4910	18.2	1,4810	22.2
1,5007	14.4	1,4905	18.4	1,4805	22.4
1,5002	14.6	1,4900	18.6	1,4800	22.6
1,4997	14.8	1,4895	18.8	1,4795	22.8
1,4992	15.0	1,4890	19.0	1,4790	23.0
1,4987	15.2	1,4885	19.2	1,4785	23.2
1,4982	15.4	1,4880	19.4	1,4780	23.4
1,4976	15.6	1,4875	19.6	1,4775	23.6
1,4971	15.8	1,4870	19.8	1,4770	23.8
1,4966	16.0	1,4865	20.0	1,4765	24.0
1,4961	16.2	1,4860	20.2	1,4760	24.2
1,4956	16.4	1,4855	20.4	1,4755	24.4
1,4951	16.6	1,4850	20.6	1,4750	24.6
1,4946	16.8	1,4845	20.8	1,4745	24.8
				1,4740	25.0

3.3.3. Determinación de la Acidez Libre: IRAM 15933

Se basa en la neutralización de los componentes ácidos presentes en la miel.

Los reactivos utilizados fueron:

- Solución de Hidróxido de sodio, 0,1 N

El procedimiento empleado fue el siguiente:

- Se pesó 10 g de muestra en un vaso de precipitado limpio, seco y tarado y se disolvió con 75 ml de agua.
- Se valoró gota a gota con solución de hidróxido de sodio 0,1 N, hasta que el pH de la muestra estuviera en 8,5.

Cálculos:

$$A = \frac{V.N}{m} 1000$$



Siendo:

A, la acidez expresada en mili-equivalentes de ácido por kilogramo de miel;

V, el volumen de solución de hidróxido de sodio empleando en la valoración, en mililitros.

N, la normalidad de la solución de hidróxido de sodio;

m, la masa de la muestra en gramos.

3.3.4. Determinación de Cenizas. IRAM 15932.

Se realizó calcinando las muestras a 550°C, y pesada hasta peso constante.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

- Primero se tomó el peso del crisol vacío, se taro y se adicionaron 5 gr de miel con precisión de hasta 0,1 mg, y procedimos a calentar con el mechero, hasta que la muestra se ennegreció, teniendo cuidado con la formación de espuma.
- Posteriormente, introducimos la capsula en la mufla precalentada a 550°C, hasta alcanzar cenizas blancas o grisáceas.
- Dejamos secar en el desecador y tomamos el peso de la muestra.

Cálculos:

$$C = \frac{m1}{m} \times 100$$

Siendo:

m1= peso de la capsula más la muestra – peso capsula vacía)

m =masa de la muestra.

3.3.5. Determinación del Color Lovibond 2000: IRAM 15941-1

Se compararon visualmente las muestras de miel con patrones de vidrios coloreados, empleando un comparador comercial.

El instrumental utilizado fue:



- Comparador Lovibond 2000, en el Laboratorio de Servicios de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

- Se pesaron 15 gramos de miel y se vertieron luego en un tubo de ensayo, el cual se insertó en el compartimento del Lovibond.
- Se comparó con patrones de vidrio coloreados y numerados, los cuales se disponen en un disco rotatorio.

3.3.6. Determinación del contenido de Hidroximetilfulfural por el método del hidrogenosulfito de sodio según White: IRAM 15937-2

El hidroximetilfulfural (HMF), absorbe radiaciones a 284 nm y se determinó con el método detallado a continuación.

Los reactivos utilizados fueron:

- Reactivo clarificante Carrez I:

En un matraz aforado de 100 ml se colocó 15 gr de hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado, $K_4[Fe(CH_6)] \cdot 3H_2O$, se disolvió en agua para análisis y se completó hasta 100 ml.

- Reactivo clarificante Carrez II

En un matraz aforado de 100 ml se colocó 30 gr de acetato de cinc dihidratado $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, se disolvió en agua para análisis y se completó hasta 100 ml.

- Solución de metabisulfito de sodio

Se disolvió 0,1827 gr de metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$) en agua y se diluyó hasta 100 ml.

El instrumental utilizado fue:

- Espectrofotómetro UV

Espectrofotómetro UV-Visible Techne - Jenway modelo "6705" de haz dividido, intervalo de longitudes de onda: entre 190 nm y 1000 nm, con ancho de banda de 4 nm.



Preparación de la muestra:

Se pesó aproximadamente 5 gr de miel, con una certeza hasta el mg, en un vaso de precipitado de 50 ml y se disolvió con agua hasta completar 25 ml, las que se trasvasaron cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml. Luego se procedió a agregar 0,5 ml de reactivo clarificante Carrez I, se agitó hasta total disolución para homogenizar la muestra, se agregó 0,5 ml de reactivo Carrez II, se agito nuevamente y se completó con agua hasta el enrase. Luego se filtró a través de un papel filtro seco y se desecharon los primeros 10 ml del filtrado.

Determinación:

- Se prepararon dos tubos de ensayo: (M) y (R) (Muestra y Referencia). Se pipetearon 5 ml de la solución de miel clarificada en cada uno de los tubos.
- Se pipetearon 5 ml de agua en el tubo de ensayo de la muestra (M) y 5 ml de solución de metabisulfito de sodio en el tubo de ensayo de referencia (R), se agitó a cada tubo.
- Se determinaron las absorbancias de la muestra (M) y de la referencia (R) a 284 nm y 336 nm.

Cálculos:

El contenido de HMF en la miel (en mg/Kg) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación

$$HMF = \frac{(E284 - E336) \times 149,7 \times Mn \times Vm}{mE \times Vn}$$

$$HMF = \frac{(E284 - E336) \times 74,85 \times Vm}{mE}$$

Siendo:

E 284, la diferencia de absorbancia a 284 nm, medida con respecto al blanco;

E 336, la diferencia de absorbancia de fondo a 336 nm, medida con respecto al blanco;

Mn, Masa nominal de la muestra de miel, Mn = 5 gr

Vm, volumen de la solución de medición, en mililitros = 0,1 ml

mE, masa de la muestra de miel, en gramos

Vn, volumen nominal de la solución de medición, Vn = 10 ml.



NOTA: al calcularse el factor 149,7, se consideró que la masa molar del HMF es de 126 g/mol y el coeficiente de extinción molar a 284 nm es 16830.

3.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

3.4.1. Condiciones cromatográficas.

Los análisis fueron realizados mediante un equipo HPLC equipado con una bomba marca Waters e2695 con inyector automático, y un detector de arreglo de diodos, marca Waters 2998. Las muestras fueron disueltas en metanol y se inyectaron 10 μ l de cada una. La separación fue realizada en una columna de fase reversa Phenomenex Gemini-NX C-18 (100 x 2 mm de diámetro y 3 μ m de tamaño de partícula), utilizando como fase móvil agua:ácido acético (99:1 – solvente A) y metanol:acetonitrilo:ácido acético (89:10:1 – solvente B). La separación se efectuó con flujo constante de 0,2 ml / min⁻¹ y usando un gradiente de elución desde una composición inicial de 96% del solvente A y 4% del solvente B, hasta llegar a una composición final de 5% de solvente A y 95% de solvente B en 30 min, con retorno a la composición inicial en 32 minutos. El intervalo de longitudes de onda para el monitoreo de los cromatogramas fue entre 230 nm y 400 nm.

3.4.2. Método de extracción de los analitos de interés.

Los flavonoides y ácidos fenólicos, fueron extraídos según la metodología descrita por Tomas-Barberan, (17) y Pelachim (23), con modificaciones.

Procedimiento:

Se tomaron 50 gr de miel, la cual fue diluida en 250 ml de agua destilada, ajustada a pH 2 con ácido clorhídrico concentrado. Se agitó la muestra durante 5 minutos. La muestra fue filtrada, utilizando algodón para remover las partículas suspendidas (suciedades, partes de abejas, etc.). A este filtrado se le adiciono 75 gr de Amberlita XAD-2, se agitó nuevamente y seguidamente se empaquetó en una columna de vidrio (45 x 3,5 cm). Luego, la columna fue lavada primero con agua acidificada (pH 2) 100 ml, consecutivamente con 150 ml de agua destilada, con el fin de remover todos los azúcares y otros constituyentes polares de la miel. La fracción fenólica absorbida en la columna, fue eluída con 350 ml de metanol (grado HPLC). El eluato fue concentrado a presión reducida en un rotavapor. El extracto que queda en el balón, fue recogido en un frasco color ámbar y



llevado al freezer (-20 °C). La muestra congelada se liofilizó. Después de esta etapa, se reconstituyó el liofilizado con 10 ml de agua destilada y se procedió a sonicar la muestra, para acelerar la disolución de sólidos.

Posteriormente se dividió la muestra en partes iguales (5 ml). Los extractos metanólicos se adicionaron en dos ampollas respectivamente. En la ampolla 1, se extrajo con éter sulfúrico y en la ampolla 2, se extrajo con acetato de etilo. Estas extracciones se realizaron 5 veces con 10 ml del solvente cada vez (5 x 10 ml) para cada ampolla. A las fases orgánicas colectadas, se le adicionaron 2 gr de sulfato de sodio anhidro, para secar la posible humedad del extracto que pudiera haber quedado. La muestra se concentró, evaporando el solvente a 40 °C y presión reducida. El concentrado fue reconstituido en 4 ml de metanol (grado espectroscópico), filtrado a través de membrana de 0,45 µm y analizados por HPLC. En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo del procedimiento de extracción.

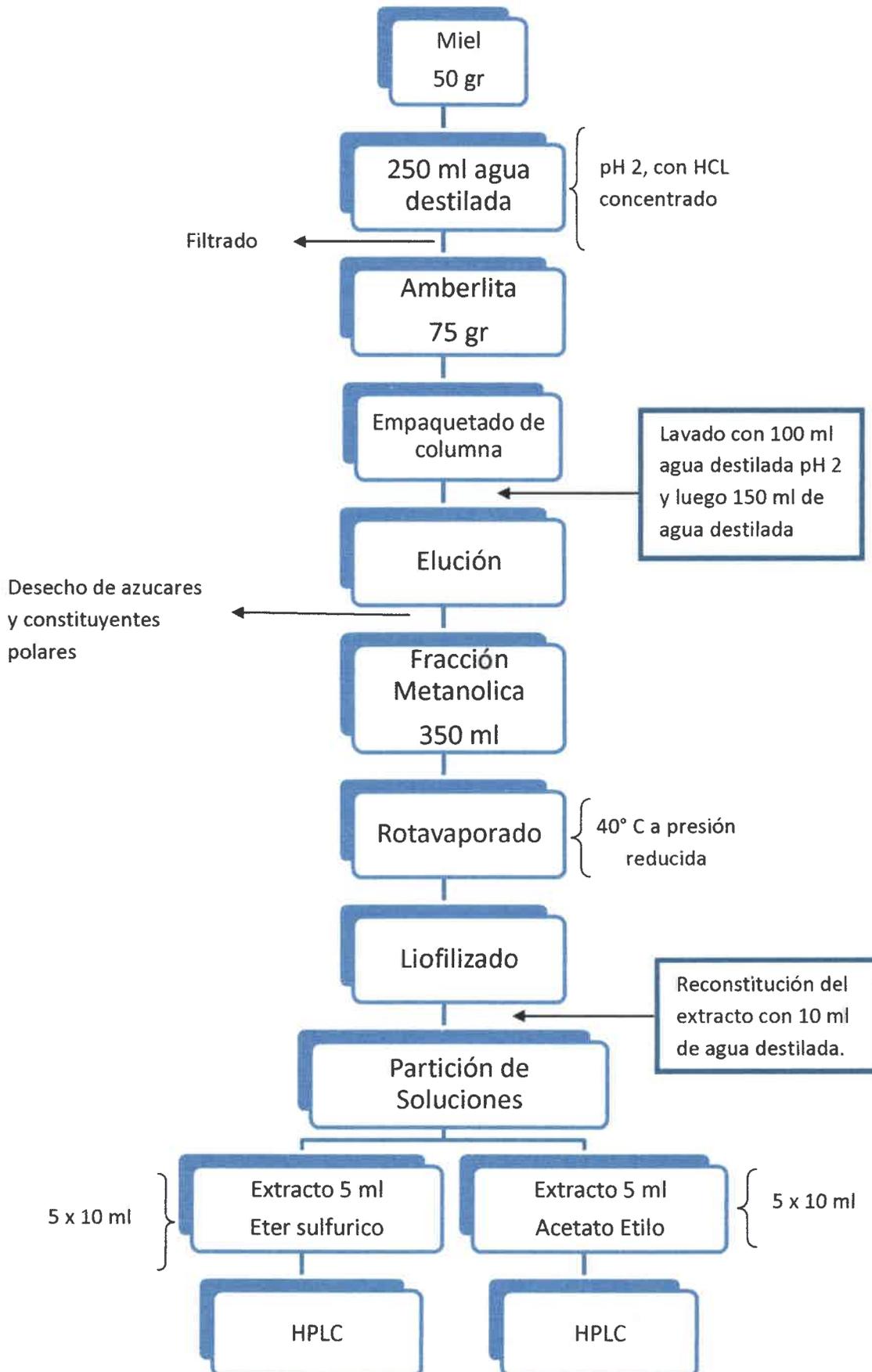


Figura 6. Flujograma extracción de compuestos fenólicos.



3.4.3. Cuantificación de Flavonoides y Ácidos Fenólicos

Las cuantificaciones se realizaron por interpolación en las curvas de calibración de los respectivos patrones. Las inyecciones fueron realizadas por triplicado y se promediaron las áreas para cada una de las concentraciones. Los datos fueron analizados utilizando el programa Origin 6 y los datos finales son expresados en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de miel. Las medidas de resumen fueron realizadas en InfoStat Versión 2011 I.

A close-up photograph of a golden liquid being poured from a thin stream into a shallow, reflective golden dish. The liquid creates ripples and a bright reflection on the surface of the dish. The background is a soft, out-of-focus light color.

CAPITULO 4 - RESULTADOS

CAPITULO 4. RESULTADOS.

4.1. Análisis Físicoquímicos.

4.1.1. Determinación de color.

Se procedió a determinar el color de todas las muestras de acuerdo al método mencionado en el punto 3.3.4. De los resultados obtenidos se evidenció que las muestras analizadas presentan diferencias en color, dependiendo de la zona de procedencia. De esta manera, las muestras procedentes de la zona de Río Cuarto y La Carlota fueron de color ámbar claro y/o blancas. Por su parte, las muestras de Chubut fueron de color blanco y extra blanco, en las muestras provenientes de Chaco predomina el color Ámbar claro, y en las muestras de Formosa el color Ámbar.

En la Figura 7, se muestran los colores respectivos a cada región y la tabla 3 muestra el análisis estadístico respectivo.



Figura 7. Color de Muestras de Miel Analizadas.

Región	N (n° de muestra)	Promedio	Desviación estándar
Río Cuarto	8	36,0	14,5
La Carlota	3	36,0	5,3
Formosa	4	112,5	2,9
Chubut	9	14,0	4,0
Chaco	5	67,0	10,4

Tabla 3. Análisis estadístico del parámetro color.

4.1.2. Determinación de pH.

En cuanto a la determinación del pH, la mayoría de las muestras presentan un comportamiento similar, encontrándose distribuida entre pH 3 y 4, lo que nos dice que todas las muestras son mieles procedentes de néctares o mezclas de mielatos, según lo indica la norma IRAM 15938. En la figura 8 se muestra el promedio en el valor de pH encontrado para cada una de las regiones en cuestión y la tabla 4 muestra el análisis estadístico.

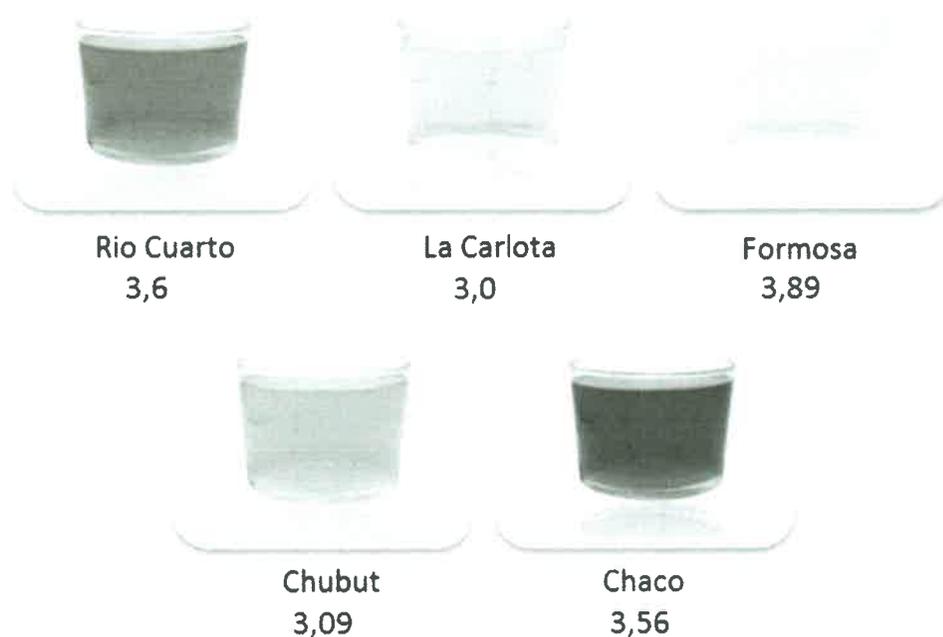


Figura 8. Promedio de pH muestras de miel analizadas.

Región	N (n° de muestra)	Promedio	Desviación estándar
Río Cuarto	8	3,60	0,30
La Carlota	3	3,00	0,20
Formosa	4	3,89	0,23
Chubut	9	3,09	0,11
Chaco	5	3,56	0,34

Tabla 4. Análisis estadístico del parámetro pH.

4.1.3. Determinación de humedad.

En cuanto a los valores de humedad encontrados, el 80% de las muestras cumple con los parámetros establecidos en el código alimentario argentino (4), el cual establece que el agua, determinada por refractometría, deberá tener un valor máximo del 18%. El otro 20% está por fuera de los parámetros establecidos, específicamente corresponde a las mieles provenientes de Chaco, estas mieles presentan mayor contenido de humedad. Este hecho puede deberse a que sean mieles que han sido cosechadas antes de tiempo (mieles verdes) o que sean provenientes de flores de brezo o trébol, cuyos contenidos acuosos pueden ser más altos.

En la Figura 9, se muestra el promedio para cada una de las regiones y en la tabla 5 el análisis estadístico.

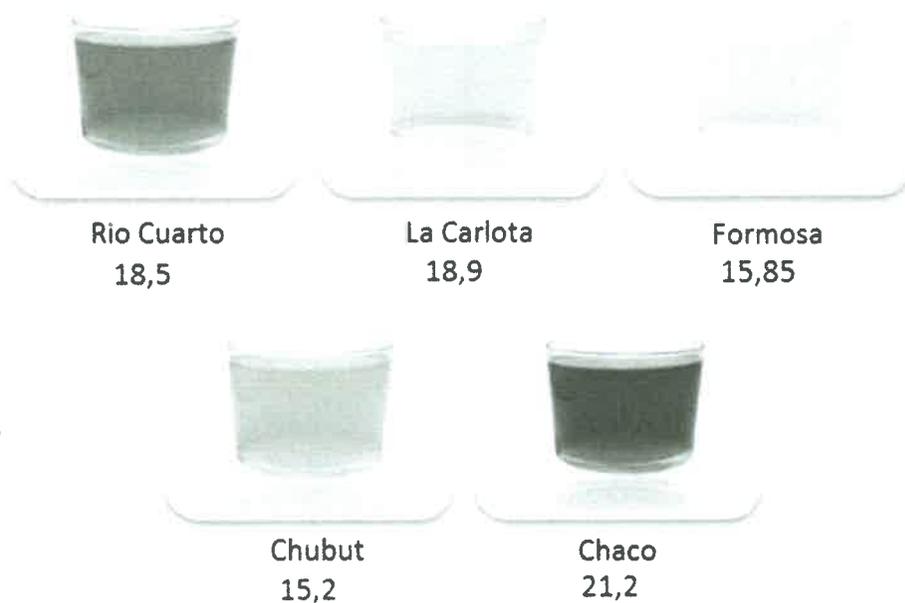


Figura 9. Promedio de humedad muestras de miel analizadas. Los datos están expresados en porcentaje.

Región	N (n° de muestra)	Promedio (%)	Desviación estándar
Río Cuarto	8	18,5	0,8
La Carlota	3	18,9	0,5
Formosa	4	15,8	1,6
Chubut	9	15,5	1,0
Chaco	5	21,2	1,8

Tabla 5. Análisis estadístico del parámetro humedad.

4.1.4. Determinación de acidez.

Los resultados obtenidos, mostraron que todas las muestras analizadas cumplen con lo establecido en el Código Alimentario Argentino (4), el que establece una acidez máxima de 40 meq/kg. En la figura 10 se muestra el promedio para cada una de las regiones en cuestión y en la tabla 6 el análisis estadístico.

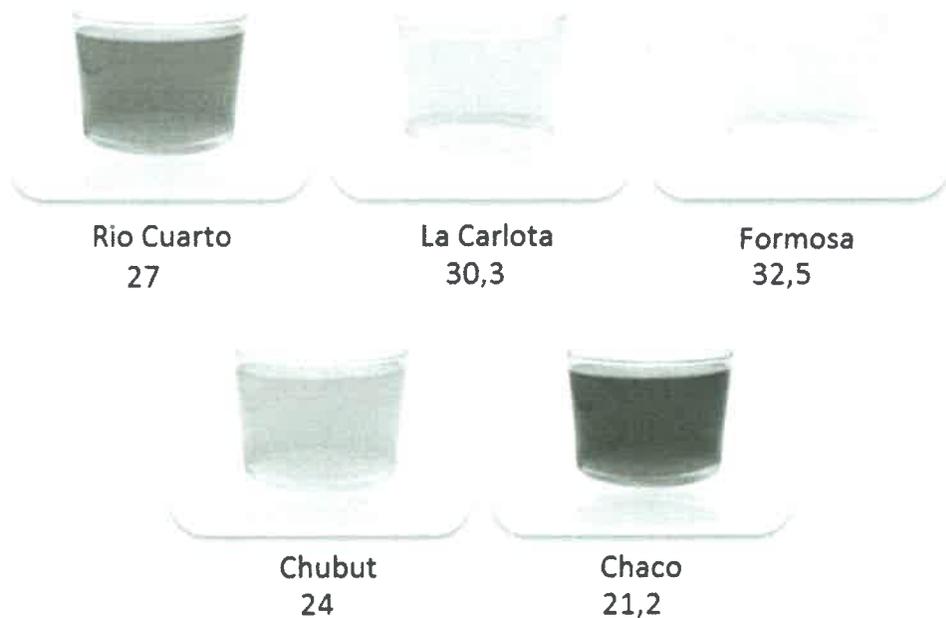


Figura 10. Promedio de acidez en las muestras de miel analizadas. Los datos están expresados en meq/Kg de miel.

Región	N (n° de muestra)	Promedio (meq/Kg de miel)	Desviación estándar
Río Cuarto	8	36,0	14,5
La Carlota	3	36,0	5,3
Formosa	4	112,5	2,9
Chubut	9	14,0	4,0
Chaco	5	67,0	10,4

Tabla 6. Análisis estadístico del parámetro acidez.

4.1.5. Determinación de cenizas.

En cuanto a los valores de cenizas obtenidos oscilaron entre 0,05% y 0,26% para todas las muestras indicando que cumplen con las especificaciones establecidas en el Código Alimentario Argentino (4), la cual establece que el porcentaje máximo de cenizas debe ser de 0,6%. En la figura 11 se muestra el contenido promedio de cenizas por cada región, observando que en todos los casos se encuentra por debajo del máximo establecido. En la tabla 7 se muestra el análisis estadístico respectivo.

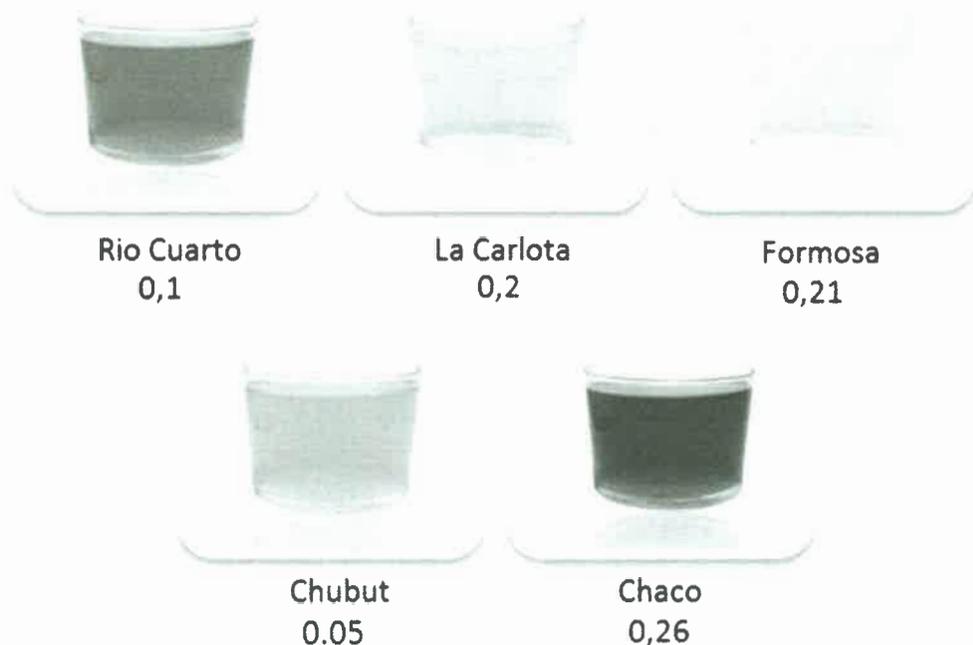


Figura 11. Promedio de determinación de cenizas en las muestras de miel analizadas. Los datos están expresados en porcentaje.

Región	N (n° de muestra)	Promedio (%)	Desviación estándar
Río Cuarto	8	0,10	0,01
La Carlota	3	0,20	0,01
Formosa	4	0,21	0,02
Chubut	9	0,05	0,02
Chaco	5	0,26	0,05

Tabla 7. Análisis estadístico del parámetro cenizas.

4.1.6. Determinación de HMF.

Los resultados arrojados en la determinación de HMF, muestran que en promedio se encuentran dentro de los límites establecidos (máximo de 40 mg/kg de miel). Solo dos (2) muestras provenientes de Río Cuarto exceden este límite, lo que indicaría que posiblemente fueron sobrecalentadas o simplemente eran muestras añejas y se perdió su frescura, realmente se desconoce la causa de su alto valor de HMF. En la figura 12 se muestra el promedio para cada una de las regiones en cuestión y en la tabla 8 el análisis estadístico.

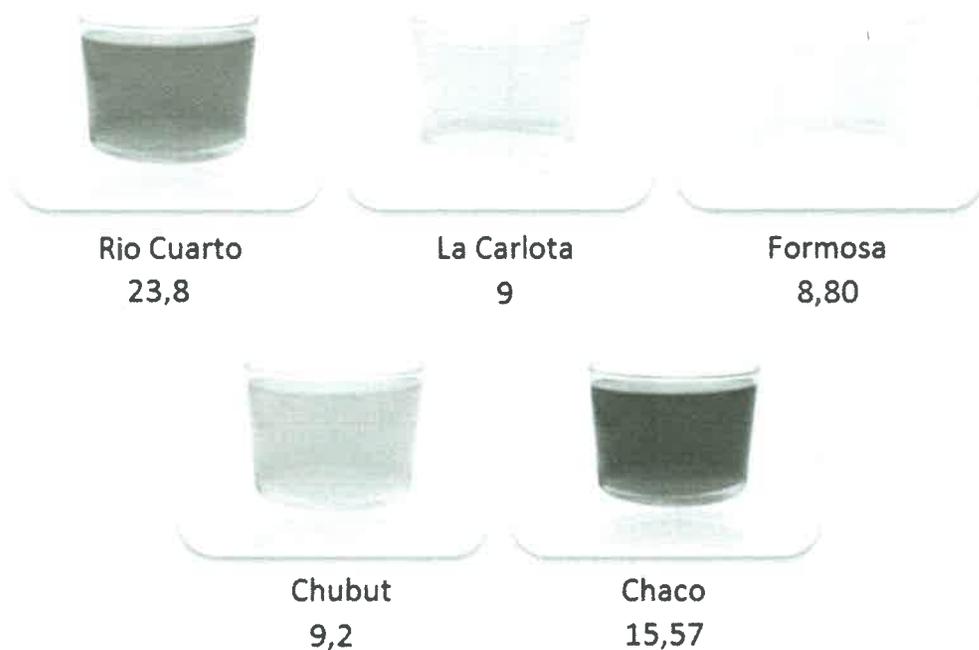


Figura 12. Promedio de la determinación de HMF en las muestras de miel analizadas. Los datos están expresados en mg/kg de miel.

Región	N (n° de muestra)	Promedio (mg/Kg de miel)	Desviación estándar
Río Cuarto	8	23,8	26,1
La Carlota	3	9,0	1,7
Formosa	4	8,8	3,9
Chubut	9	9,2	8,5
Chaco	5	15,6	6,7

Tabla 8. Análisis estadístico del parámetro HMF.

4.2. Identificación y Cuantificación de Flavonoides y Ácidos Fenólicos.

4.2.1. Obtención de curvas de calibración.

En primer lugar, se registraron los cromatogramas de cada patrón por separado para establecer su identificación y el tiempo de retención. Dado que el detector utilizado es de arreglo de diodos, se registró para cada patrón el respectivo espectro de absorción, el que se muestra junto al cromatograma. La identificación de los picos cromatográficos de las muestras de miel se comparó con los espectros de los patrones con un grado de certeza alto (>90%) aunque no definitivo. La Figura 13 muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma y el respectivo espectro de absorción obtenido con el detector para el ácido cafeico.

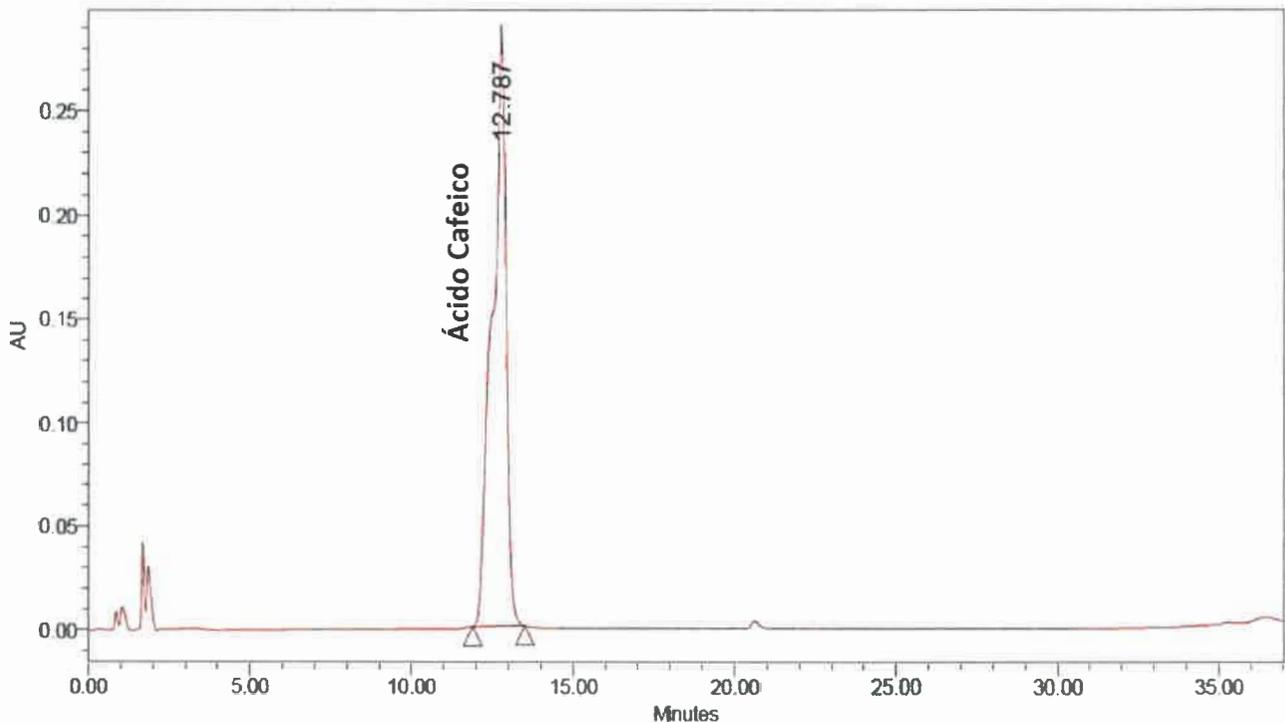
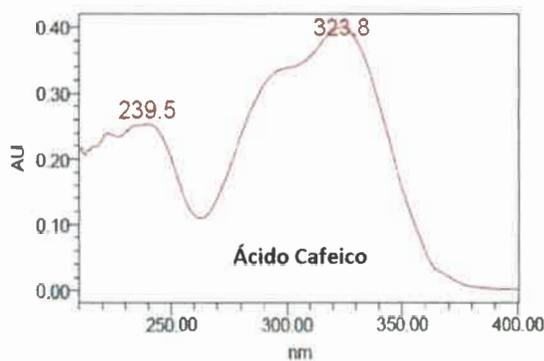


Figura 13. Cromatograma muestra de patrón ácido cafeico analizada por HPLC.

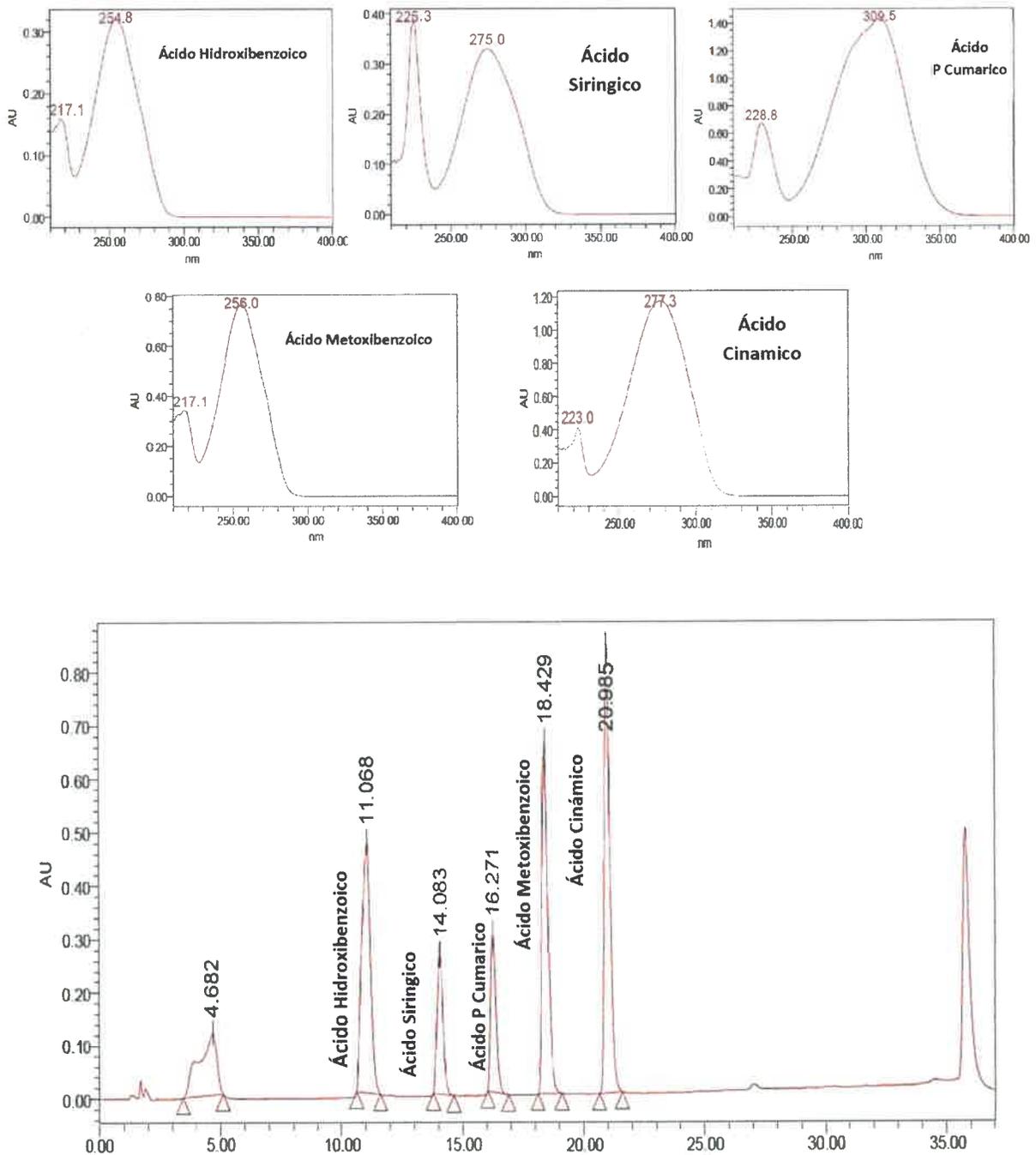


Figura 14. Cromatograma muestra de patrones de ácidos fenólicos analizadas por HPLC.

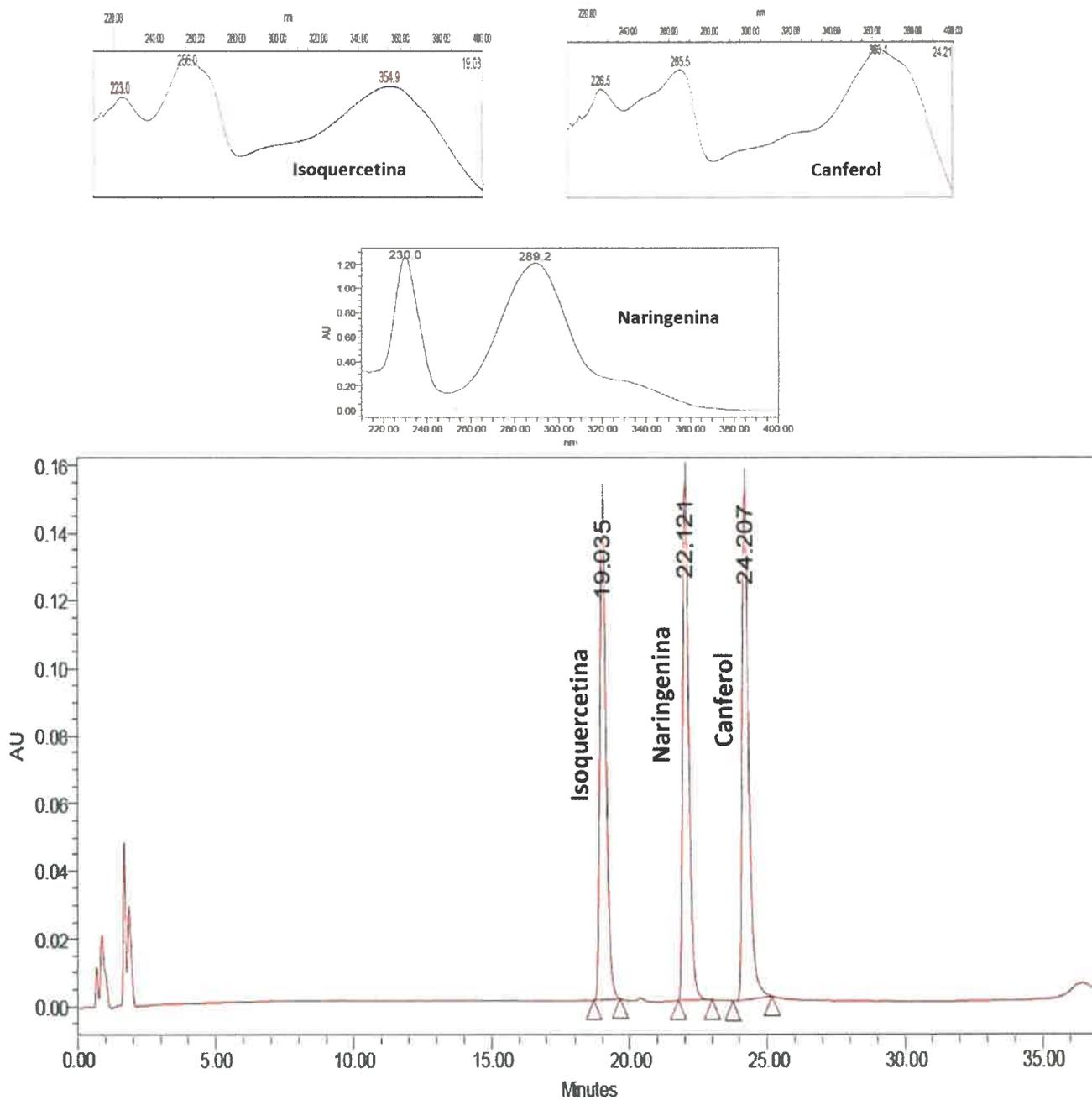


Figura 15. Cromatograma muestra de patrones de flavonoides analizados por HPLC.



La Tabla 9, muestra los tiempos de retención de los ácidos fenólicos, y de los flavonoides, correspondientes a la corrida de los patrones, como también de las muestras analizadas.

Tabla 9. Tiempos de retención de los patrones y rangos de tiempo de las muestras analizadas

FLAVONOIDE	Tiempo de Retención (tR) en Minutos (min) de los patrones	Rangos de Tiempo de Retención (tR) en Minutos (min) de las muestras analizadas
Naringenina	22,12	Entre 22,12 y 22,48
Isoquercetina	19,03	Entre 19,03 y 19,83
Canferol	24,20	Entre 23,97 y 24,39
ÁCIDO FENOLICO	Tiempo de Retención (tR) en Minutos de los patrones	Rangos de Tiempo de Retención (tR) en Minutos de las muestras analizadas
Ácido Cafeico	12,78	Entre 12,25 y 12,95
Ácido Cinámico	20,22	Entre 20,22 y 20,67
Ácido Hidroxibenzoico	9,58	Entre 9,53 y 10,66
Ácido Metoxibenzoico	17,45	Entre 17,45 y 18,16
Ácido p-Cumarico	16,46	Entre 14,84 y 15,63
Ácido Siringico	13,09	Entre 13,08 y 13,55

4.2.2. Curvas de calibración.

Posteriormente se procedió a obtener, para cada analito, la correspondiente curva de calibración, a partir de los patrones, lo que permitió realizar la cuantificación de los compuestos. Las figuras 16 a la 25, muestran los respectivos calibrados y la Tabla 10 el resumen de los parámetros de regresión.

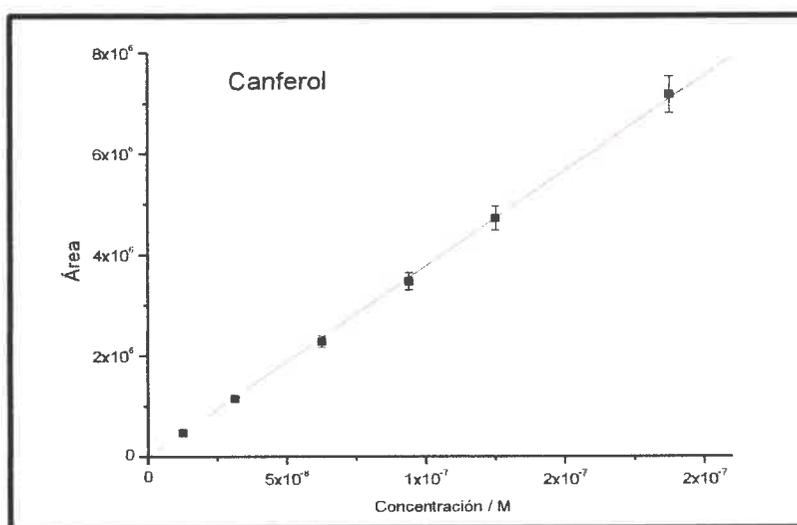


Figura 16. Curva de calibración Canferol.

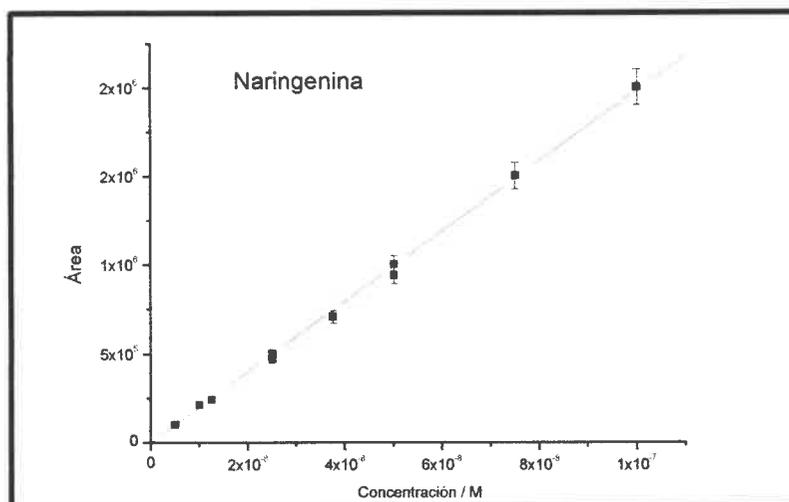


Figura 17. Curva de calibración Naringenina.

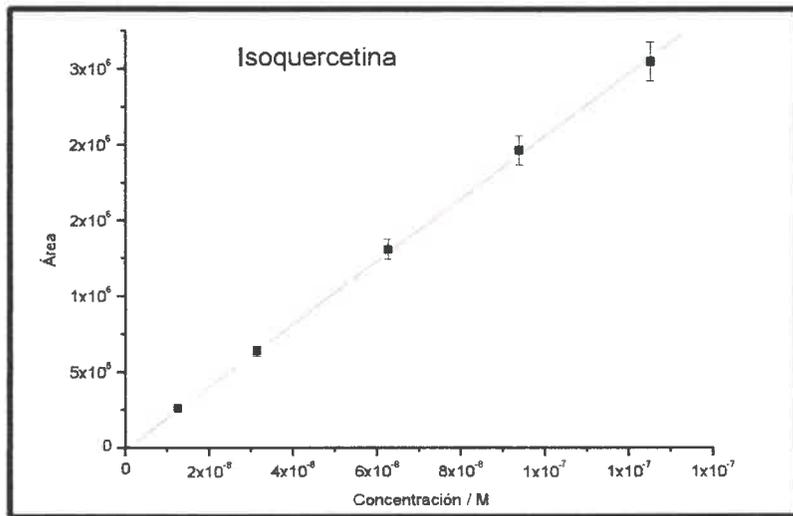


Figura 18. Curva de calibración Isoquercetina.

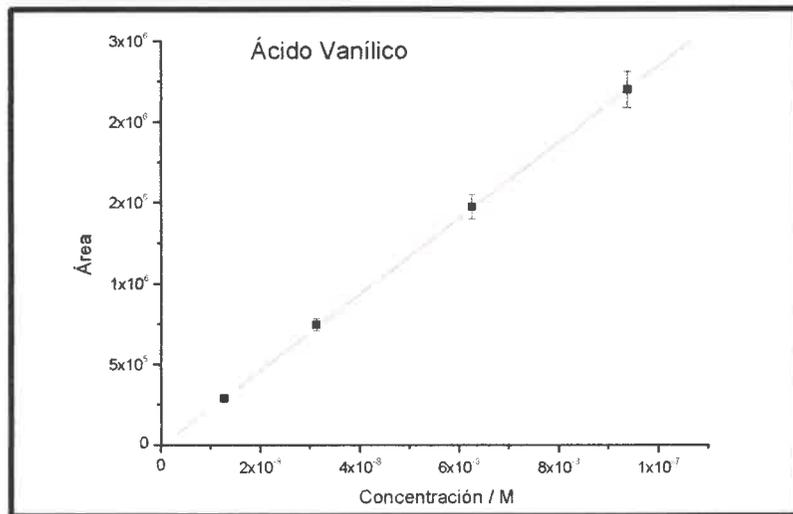


Figura 19. Curva de calibración Ácido Vanílico.

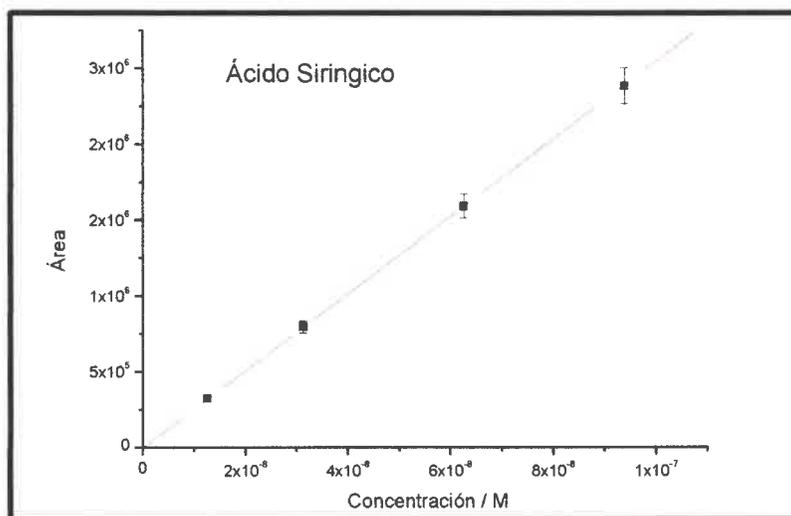


Figura 20. Curva de calibración Ácido Siringico.

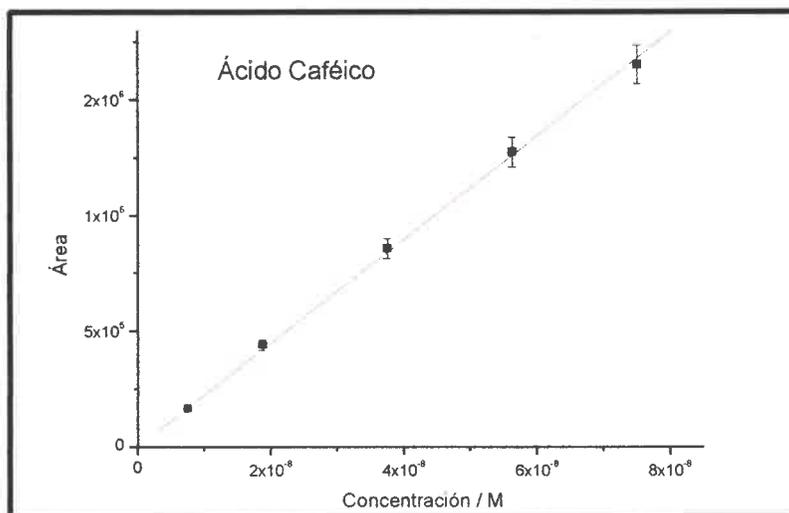


Figura 21. Curva de calibración Ácido Caféico.

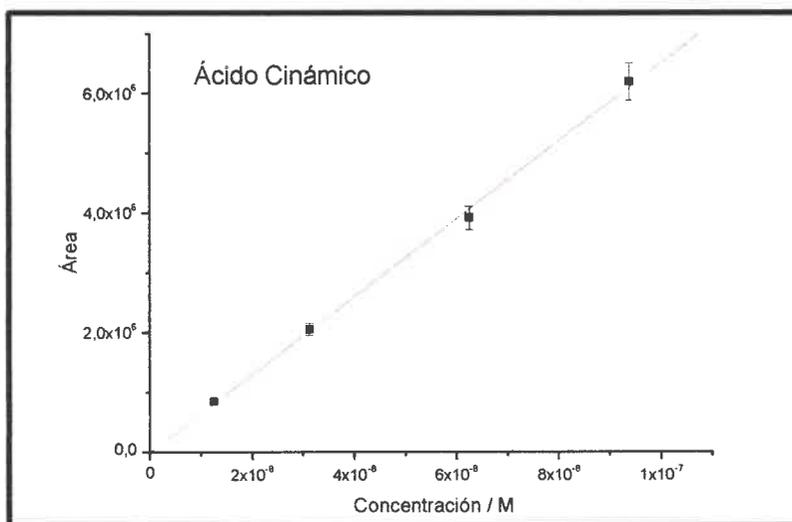


Figura 22. Curva de calibración Ácido Cinámico.

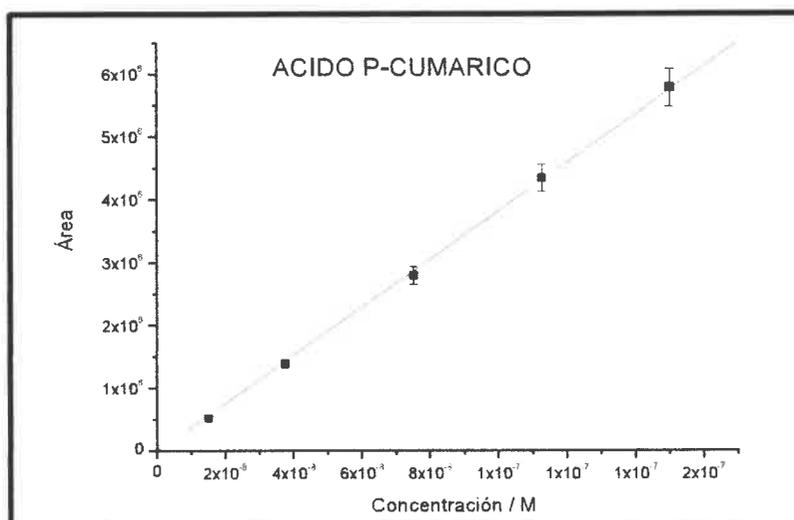


Figura 23. Curva de calibración Ácido P Cumarico.

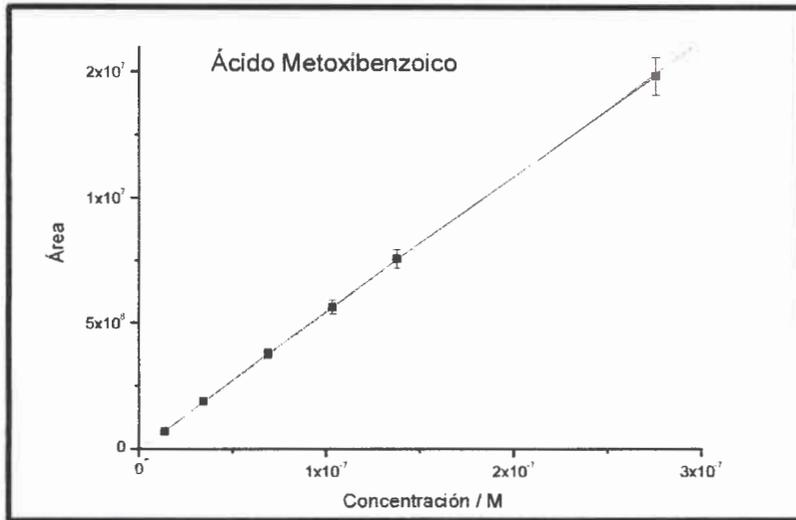


Figura 24. Curva de calibración Ácido Metoxibenzoico.

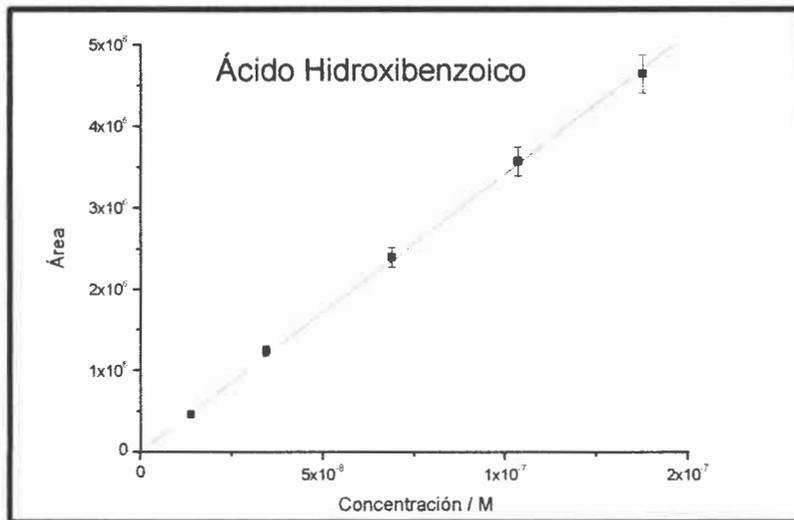


Figura 25. Curva de calibración Ácido Hidroxibenzoico.



Tabla 10. Resultados de regresión de las curvas de calibración. Número de repeticiones = 3

Flavonoide o Ácido Fenólico	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación
Ácido Caféico	2,20E+13	19253,19	0,99963
Ácido Cinámico	6,53E+13	-6119,20	0,99898
Ácido Hidroxibenzoico	3,37E+13	49538,19	0,99966
Ácido Metoxibenzoico	5,39E+13	54170,62	0,99991
Ácido p-Cumárico	3,90E+13	-76911,19	0,99989
Ácido Siríngico	2,54E+13	6936,47	1
Ácido Vanílico	2,35E+13	5234,15	0,99997
Canferol	3,84E+13	-61936,60	0,99979
Isoquercetina	2,05E+13	14929,95	0,99972
Naringenina	2,00E+13	-9501,95	0,99926

4.2.3. Cuantificación de Flavonoides y Ácidos Fenólicos en las Muestras de Miel.

Como se explicó anteriormente en el método de extracción, se analizaron dos extractos, uno con éter sulfúrico y el otro con acetato de etilo. La figura 26 muestra el cromatograma correspondiente a la muestra ABF 2 de Formosa del extracto de éter sulfúrico, en la cual se evidenciaron cuatro ácidos fenólicos (Hidroxibenzoico, P-cumarico, Metoxibenzoico y Cinámico), y el flavonoide Isoquercetina. Por su parte, la figura 27 muestra el cromatograma correspondiente al extracto de acetato de etilo, correspondiente a la misma muestra de miel. Se evidenciaron los mismos ácidos fenólicos, a excepción del ácido Metoxibenzoico, y además, la presencia del flavonoide Isoquercetina. Cabe destacar que también se muestran los respectivos espectros de absorción.

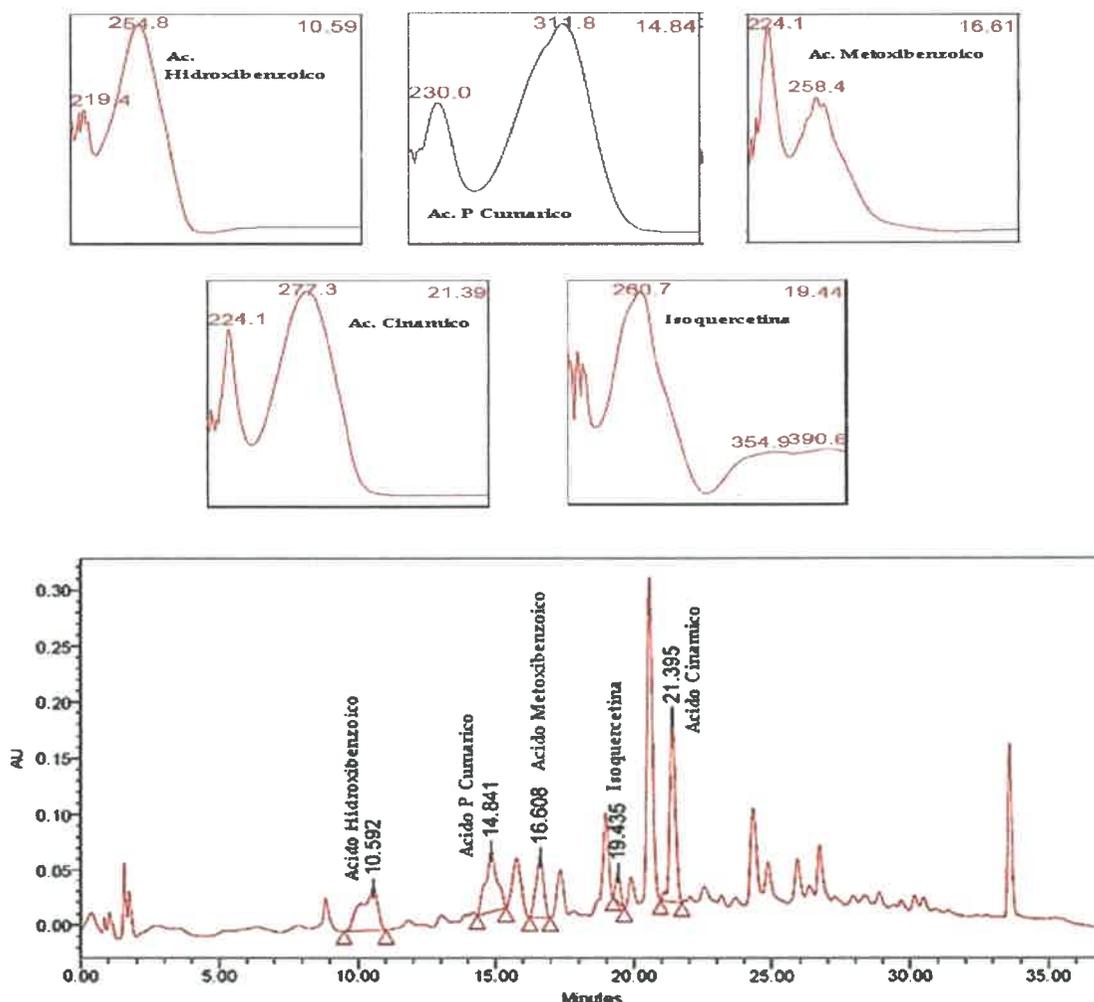


Figura 26. Cromatograma de la muestra ABF 2 de Formosa, con éter sulfúrico.

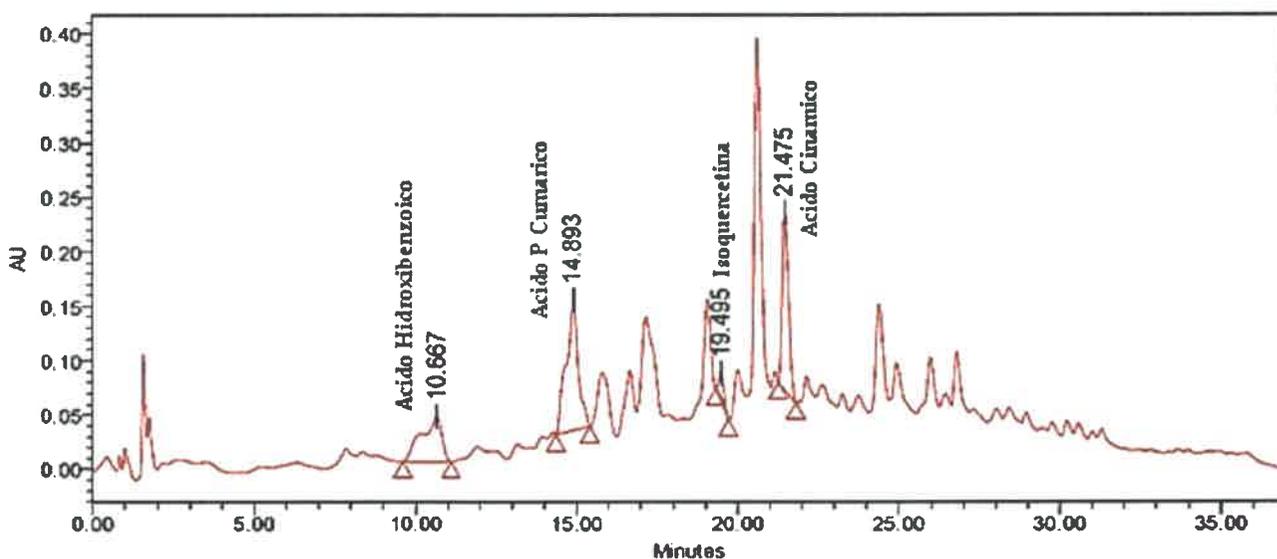
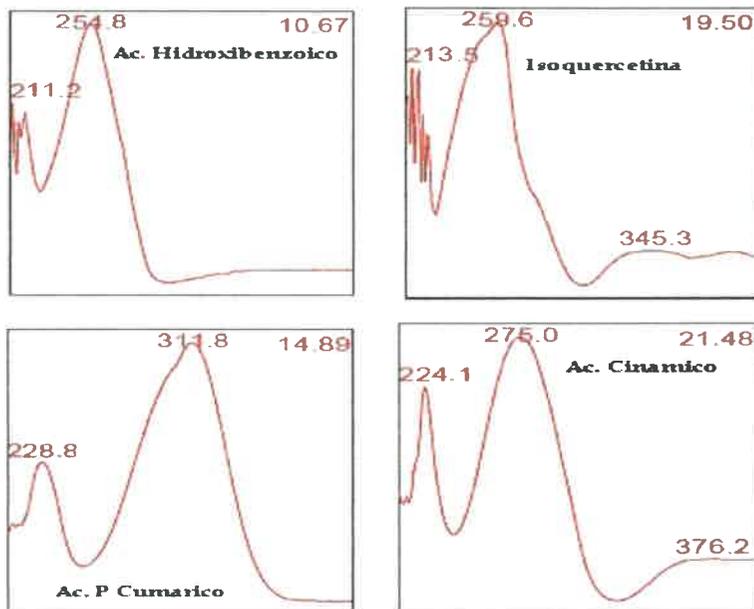


Figura 27. Cromatograma de la muestra ABF 2 de Formosa, con acetato de etilo.



A partir de los cromatogramas y las curvas de calibración, se cuantificó mostrando las cantidades de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en las muestras en la tabla 11. Los datos están expresados en mg/Kg de miel.

Tabla 11. Cantidad de flavonoide y ácidos fenólicos presentes en las muestras.

Muestras	Flavonoides (mg/Kg de miel)			Ácidos Fenólicos (mg/Kg de miel)						
	Canf.*	Naring*.	Isoquer.*	Ác. Cafei.*	Ác. Hidroxi*.	Ác. Metoxi.*	Ác. P-cumar.*	Ác. Vanil.*	Ác. Cinam.*	Ác. Sirin.*
ABR 1	1,82	13,45	ND*	2,54	2,25	ND	1,19	0,39	ND	ND
ABR 2	6,17	4,45	ND	0,19	6,09	2,74	ND	1,48	ND	0,15
ABR 3	2,62	4,85	ND	0,74	9,10	ND	ND	ND	0,36	ND
ABR 4	2,60	2,65	ND	0,03	7,71	0,04	ND	ND	ND	ND
ABR 5	10,96	24,31	ND	1,09	9,00	10,42	ND	ND	ND	2,61
ABR 6	0,19	10,79	ND	5,88	ND	0,04	5,07	ND	ND	ND
ABR 7	3,08	3,30	0,11	4,12	ND	ND	3,26	ND	ND	ND
ABC 1	9,20	5,37	ND	1,39	1,54	ND	7,01	0,14	0,11	ND
ABC 2	3,96	0,07	ND	0,11	3,30	ND	ND	ND	0,70	ND
ABC 3	2,53	ND	ND	3,74	ND	ND	1,70	ND	ND	ND
ABF 1	4,70	1,45	1,85	0,44	3,04	ND	11,87	ND	1,02	ND
ABF 2	ND	ND	1,56	ND	5,02	0,96	5,96	ND	3,71	ND
ABF 3	ND	ND	0,96	ND	4,94	0,45	8,17	ND	3,51	ND
ABF 4	ND	ND	0,76	ND	4,70	0,49	7,49	ND	1,00	ND
ABAP 1	10,21	6,90	2,96	12,05	ND	ND	6,77	ND	0,52	0,64
ABAP 2	9,32	6,57	2,89	7,32	ND	ND	6,52	ND	ND	0,57
ABAP 3	14,43	12,71	0,21	1,20	0,08	ND	10,47	ND	ND	0,11
ABAP 4	11,06	7,032	0,53	2,10	ND	ND	7,27	ND	ND	0,17
ABAP 5	13,53	6,97	1,61	1,03	ND	ND	7,34	ND	ND	0,15
ABAP 6	12,97	11,43	4,74	2,40	1,22	ND	7,52	ND	ND	0,14
ABAP 7	6,546	8,028	ND	2,75	0,78	ND	3,88	ND	ND	0,24
ABAP 8	16,31	10,15	1,95	3,71	1,64	ND	7,85	ND	ND	0,47
ABAP 9	13,13	9,85	0,92	6,74	1,45	ND	7,50	ND	ND	0,44
ABCHA 1	ND	3,42	ND	0,05	ND	0,10	2,75	ND	0,01	19,97
ABCHA 2	0,07	0,12	0,19	ND	ND	1,45	1,23	0,16	ND	ND
ABCHA 3	1,30	ND	0,32	ND	17,12	18,02	ND	1,52	3,11	12,01
ABCHA 4	0,44	ND	2,77	ND	6,80	2,67	ND	0,23	ND	ND
ABCHA 5	1,06	ND	1,19	ND	8,33	9,12	ND	ND	0,76	1,49
ABCHA 6	6,17	13,03	ND	2,07	6,25	0,004	3,03	ND	ND	ND

*ND: No Detectado.

*Canf: Canferol. Naring: Naringenina. Isoquer: Isoquercetina. Ac. Cafei: Ácido Caféico. Ac. Hidroxi: Ácido Hidroxibenzoico. Ac. Metoxi: Ácido Metoxibenzoico. Ac. P-cumar: Ácido P-Cumarico. Ac. Vanil: Ácido Vanílico. Ac. Cinam: Ácido Cinámico. Ac. Sirin: Ácido Siringico.

A close-up photograph of a golden liquid being poured from a thin stream into a shallow, reflective golden dish. The liquid creates ripples and a central vortex as it hits the surface. The lighting is bright, highlighting the metallic sheen of the liquid and the dish.

CAPITULO 5 - DISCUSION



CAPITULO 5. DISCUSION

5.1. Parámetros Físicoquímicos.

De acuerdo a los resultados mostrados en las tablas 3, 4, 5, 6, 7 y 8, se determinó que las muestras de miel analizadas cumplen mayormente con los parámetros físicoquímicos de calidad independientemente de la región que provenga. La tabla 12 muestra el valor promedio encontrado para cada región.

Tabla 12. Comparación de promedios de los parámetros físicoquímicos.

REGIÓN	COLOR (MM Pfund)	pH	HUMEDAD (%)	ACIDEZ (meq/Kg)	HMF (mg/Kg)	CENIZAS (%)
RIO CUARTO	36 ^{bcd}	3,6 ^{ac}	18,5 ^{bc}	27 ^{bd}	23,8	0,1 ^{abcd}
LA CARLOTA	36 ^{efg}	3 ^{ac}	18,9 ^{ef}	30,3	9	0,2 ^a
FORMOSA	112,5 ^{behj}	3,89 ^{ei}	15,85 ^{bej}	32,5 ^{bij}	8,8	0,21 ^{bi}
CHUBUT	14 ^{efhk}	3,09 ^{ei}	15,5 ^{efk}	24 ^{ik}	9,2	0,05 ^{cik}
CHACO	67 ^{dgjk}	3,56	21,2 ^{jk}	39,4 ^{djk}	15,57	0,26 ^{dk}

Letras iguales en la misma columna significa que existen diferencias estadísticamente diferentes entre los valores.

Cabe mencionar que, según el análisis estadístico realizado en Microsoft Excel 2010 (t de student), con un nivel de confianza de 95%, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras provenientes de diferentes regiones en algunos de los parámetros físicoquímicos. Así, para las muestras de Río Cuarto y La Carlota, se evidenció que existe diferencia significativa sólo en pH, no existiendo diferencias significativas en los otros parámetros. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad de las muestras de miel provenientes de Río Cuarto (18,50%) respecto de las procedentes de Formosa (15,85%), Chaco (21,20%) y Chubut (15,05). Cabe destacar que para las muestras del Chaco, que superan más del 18%, puede deberse a la alta humedad relativa que caracteriza la región, encontrando similitud con el estudio realizado por Avallone (19). También existen diferencias estadísticamente significativas en la comparación de medias de las muestras de Formosa (15,85%) y El



Chaco (21,2%), las cuales son provincias que se encuentran en una misma región y de alta humedad relativa, sin embargo, las muestras de Formosa no superan el porcentaje máximo permitido (18%). Las muestras del chaco posiblemente pueden ser cosechas prematuras de panales no operculados, lo que quiere decir que su recolección fue realizada antes de madurar la miel, lo que se conoce como miel verde, en el cual se interrumpe la deshidratación que realizan las abejas en la maduración del producto, aumentando la humedad., o bien sea porque son mieles de brezo o trébol, como lo manifiesta Maidana (25), en la cual se dan ciertas condiciones climáticas, de flujo de miel, de humedad, donde las abejas operculan la miel con un contenido de agua superior al 18%. Estos casos se han observado en regiones de alta humedad y baja oscilación térmica diaria.

En cuanto al parámetro HMF, solo dos (2) muestras de Río Cuarto, tuvieron fluctuaciones importantes, superando los 40 mg/Kg, las cuales podrían estar envejecidas o posiblemente se debió al sobrecalentamiento de estas muestras.



5.2. Presencia de Flavonoides y Ácidos Fenólicos.

La tabla 13 muestra el resumen de los flavonoides y ácidos fenólicos identificados en las muestras de miel estudiadas, seguida de las medidas de resumen. El anexo 1 muestra los cromatogramas respectivos.

Tabla 13. Flavonoides y ácidos fenólicos, según el origen geográfico.

Origen Geográfico	Flavonoide	Ácidos Fenólicos
Río Cuarto, Chucul e Higueras	Canferol Naringenina	Ácido Vanílico Ácido Hidroxibenzoico Ácido Metoxibenzoico Ácido Caféico Ácido Siringico
La Carlota	Isoquercetina Canferol Naringenina	Ácido Caféico Ácido Cinámico Ácido P Cumarico Ácido Hidroxibenzoico Ácido Vanílico
Chubut	Naringenina Canferol Isoquercetina	Ácido P Cumarico Ácido Cafeico Ácido Siringico
Chaco	Naringenina Canferol Isoquercetina	Ácido P Cumarico Ácido Vanílico Ácido Metoxibenzoico Ácido Siringico Ácido Hidroxibenzoico
Formosa	Isoquercetina Naringenina	Ácido P Cumarico Ácido Cinámico Ácido Hidroxibenzoico Ácido Metoxibenzoico Ácido Cafeico



Medidas de Resumen Flavonoides y Ácidos Fenólicos, según el origen geográfico.

Origen Geográfico:

Río Cuarto, Chucul,

Higueras

<i>Flavonoide</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Canferol	7	3,92	3,58	0,19	10,96
Naringenina	7	9,11	7,83	2,65	24,31

<i>Ácido Fenólico</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Ácido Vanílico	7	2,08	2,21	0,03	5,88
Ácido Hidroxibenzoico	5	6,83	2,84	2,25	9,1
Ácido Metoxibenzoico	4	3,31	4,91	0,04	10,42
Ácido Caféico	2	0,94	0,77	0,39	1,48
Ácido Siringico	2	1,38	1,74	0,15	2,61

Origen Geográfico:

La Carlota

<i>Flavonoide</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Canferol	3	5,23	3,52	2,53	9,2
Naringenina	2	2,72	3,75	0,07	5,37

<i>Ácido Fenólico</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Ácido Caféico	3	1,75	1,84	0,11	3,74
Ácido Cinámico	2	0,41	0,42	0,11	0,7
Ácido P- cumárico	2	4,36	3,75	1,7	7,01
Ácido Hidroxibenzoico	2	2,42	1,24	1,54	3,3
Ácido Vanílico	1	0,14	0,00	0,14	0,14

Origen Geográfico:

Chubut

<i>Flavonoide</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Canferol	9	11,95	2,96	6,55	16,31
Naringenina	9	8,85	2,26	6,57	12,71
Isoquercetina	8	1,98	1,51	0,21	4,74

<i>Ácido Fenólico</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Ácido P- cumárico	9	7,24	1,70	3,88	10,47
Ácido Caféico	9	4,37	3,65	1,03	12,05
Ácido Siringico	9	0,33	0,2	0,11	0,64



Origen Geografico:

Chaco

<i>Flavonoide</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Canferol	5	1,81	2,49	0,07	6,17
Naringenina	3	5,52	6,71	0,12	13,03
Isoquercetina	4	1,12	1,19	0,19	2,77

<i>Ácido Fenólico</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Ácido P- cumárico	3	2,34	0,97	1,23	3,03
Ácido Vanílico	3	0,64	0,77	0,16	1,5
Ácido Metoxibenzoico	6	5,23	7,12	0,004	18,02
Ácido Siringico	3	11,16	9,27	1,49	19,97
Ácido Hidroxibenzoico	4	9,63	5,07	6,25	17,12

Origen Geografico:

Formosa

<i>Flavonoide</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Isoquercetina	4	1,28	0,51	0,76	1,85

<i>Ácido Fenólico</i>	<i>n</i>	<i>media</i>	<i>Desv. Estándar</i>	<i>Mín</i>	<i>Máx</i>
Ácido P- cumárico	4	8,37	2,51	5,96	11,87
Ácido Cinámico	4	2,31	1,5	1	3,71
Ácido Hidroxibenzoico	4	4,43	0,93	3,04	5,02
Ácido Metoxibenzoico	3	0,63	0,28	0,45	0,96
Ácido Caféico	1	0,44	0	0,44	0,44

La naringenina se destaca como el flavonoide que se encuentra en la mayoría de las mieles analizadas, seguidas del canferol e isoquercetina, y por otra parte, los ácidos fenólicos mayoritarios fueron el ácido p-cumárico, ácido hidroxibenzoico y el ácido cafeico, seguidos del ácido metoxibenzoico.

De acuerdo a los resultados encontrados, podemos concluir que en todas las muestras analizadas se identificaron los flavonoides canferol, naringenina e isoquercetina. La naringenina se encontró en cantidades que van desde los 2,6 mg/Kg de miel hasta los 24,31 mg/kg de miel, siendo este flavonoide el más representativo en cantidad para las mieles estudiadas. En contraste con las mieles estudiadas por Pelachim (18) procedentes del Brasil, solo hay similitud en el compuesto isoquercetina, de los que se identificó en ese estudio (quercetina, morina, tricetina, isoquercetina). Por su parte, los ácidos fenólicos mayormente identificados fueron ácido cafeico, ácido hidroxibenzoico, ácido



metoxibenzoico y ácido p-cumárico. El ácido p-cumárico fue el que se encontró en mayor cantidad arrojando resultados que van desde los 3,80 mg/Kg de miel hasta los 11,80 mg/Kg de miel, seguido del ácido hidroxibenzoico desde los 2 mg/Kg de miel hasta los 17,10 mg/Kg de miel y el ácido cafeico desde los 0,03 mg/Kg de miel hasta los 12,05 mg/Kg de miel. Comparado con el estudio realizado por Tomas Barberan (17), se refleja una concordancia con los ácidos encontrados y que en su mayoría son ácido cinámico, ácido cafeico y ácido p-cumárico.



CRER. CREAR. CREER



CAPITULO 6 - CONCLUSION



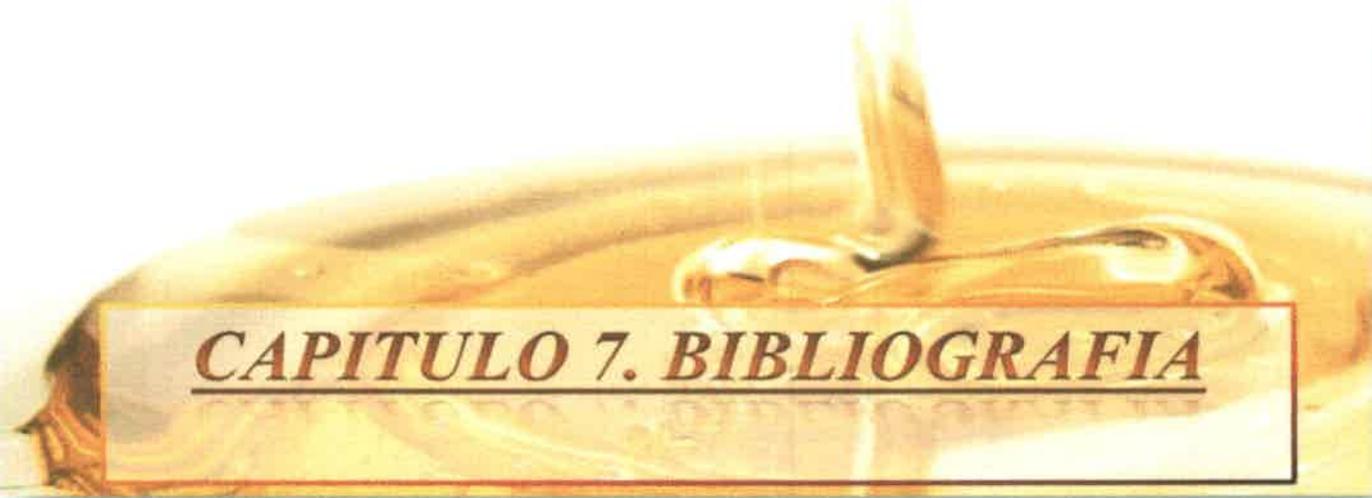
CAPITULO 6. CONCLUSIONES

En general podemos establecer que las técnicas utilizadas son adecuadas para incrementar tanto el control de calidad de las mieles, como la identificación o tipificación de las mismas. Con seguridad más estudios quedan por realizar en este sentido, incluso aquellos que permitan establecer alteraciones o adulteraciones de las mieles. Por lo anterior, las mieles analizadas son de excelente calidad, confirmando su frescura y pureza, y garantizando que no se presentó degradación alguna en el producto.

En tal sentido, los estudios realizados con HPLC para identificar flavonoides y ácidos fenólicos, fueron alentadores, ya que se pudieron aislar e identificar los flavonoides y ácidos fenólicos que componen las mieles estudiadas, pudiéndose establecer que las mismas son ricas en este tipo de sustancias, lo que conlleva a efectos positivos en la salud del consumidor gracias a su capacidad antioxidante y a la relación que existe entre estos y la prevención de enfermedades cardiovasculares, entre otras.

Estos estudios son la base para continuar realizando análisis, en los cuales se puedan relacionar uno o varios parámetros de calidad con el contenido de algún/os flavonoides o ácido (s) fenólico(s), como lo puede ser la relación color-flavonoide, debido a que los pigmentos están formados por carotenos y flavonoides. Cabe destacar que también es un estudio preliminar a efectos de determinar su origen botánico y marcador floral.

Por último, es importante destacar que se requiere un número mayor de muestras por cada provincia con el fin de tener mayor exactitud en el análisis estadístico de los datos, sin descartar los datos obtenidos en la presente tesis, ya que se consideran como preliminares.

A photograph of a golden liquid being poured into a shallow, reflective dish. The liquid is captured in mid-pour, creating a central stream and ripples on the surface. The lighting is warm, highlighting the metallic sheen of the liquid and the dish.

CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA



CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA

- Alabdeen S, Gadkariem E y Hussein S, 2008. Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. E-Journal of chemistry, S429 – S437.
- Ávalos, A., Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119 -145.
- Avallone, C., Montenegro, S., Grurszycki, A., Baez, M., Cravzov, A., Glibota, A. 2004. Alteraciones Físicoquímicas de los principales parámetros de la miel cuando es utilizada como materia prima de alimentos. Universidad Nacional del Nordeste. Chaco, Argentina. Resumen T-048.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano, L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. International Honey Commission. Apidologie 35, 4-S17.
- Cabrera, A., Pérez, A., Castillo, L., Tabío, C., Pérez, J. 2000. Caracterización y comparación preliminar de algunos indicadores físicoquímicos en la miel de Campanilla Morada (*Ipomoea Triloba*) antes de su beneficio. Apiciencia. Vol 2.
- Ceksteryte, V., Kaslauskas, S., Racys, J. (2006). Composición de flavonoides en miel Lituana y pan de miel. Biología Vol 2 : 28 - 33.
- Código Alimentario Argentino. 2010. Capítulo X, Artículo 782-783:249-251). Ley 18284. Código Alimentario Argentino.
- Daigle. D. J. y Conkerton. E.J. 1983. Análisis de flavonoides por HPLC. Journal of liquid chromatography. Vol 6: 105 – 118.
- Díaz, C. 2003. Determinación floral y caracterización física y química de mieles de abeja (*apis mellifera L*) etiquetadas como “miel de umo” (*Eucrichya Cordifolia cav*). Universidad Austral de Chile. Pag 61.
- Dulce placer La Miel griegos, romanos y egipcios.
<http://www.mipunto.com/temas/2do_trimestre03/lamiel.html>.
- Escamilla, C., Cuevas, E., Guevara, J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM. Vol 52 (2): 73 -75.
- Francis, C y Gontier, F. 1983. Honey as environmental indicator: effect of sample preparations on trace element determination by ICP-AES. Mikrochimica Acta 112.
- Informe internacional de la miel – Quinquenio 2009 – 2013. 2014. Corrientes Exporta.



- Maidana, J., Herrera Humberto, F., Rojas A., Mazzola M., Fontanellaz R., Rodríguez M. 2000. Determinación de las características fisicoquímicas de mieles de Santiago del Estero. Centro de investigaciones apícolas (CEDIA), Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero. Santiago del Estero, 4200. Argentina. http://www.agroindustria.gob.ar/site/desarrollo_rural/producciones_regionales/00_origen_animal/00_apicultura/_publicaciones/_trabajos/determinacion_de_las_caracteristicas.pdf
- Mann, J. Secondary Metabolism Clarendon Press, Oxford, 1987.
- Montenegro, S., Avallone, C., Aztarbe, M., Osuna, M., Ambrosini, S. 2004, Prolina en miel regional, en: comunicaciones científicas y tecnológicas 2004. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Agroindustrias, Chaco, Argentina.
- Muñoz, O., Copaja, S. Speisky, H., Peña, R. C., Montenegro, G., Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Quim. Nova. Vol 30 (4): 848 -851.
- Norma Técnica Colombiana NTC.2007. Miel de Abejas. Segunda actualización.
- Pelachim, R. L., 2009. Perfiles de sustancias fenólicas en mieles brasileras por cromatografía líquida de alta eficacia y evaluación del potencial antioxidante. Tesis Doctoral, Departamento de Química. Univ. Fed. de Río de Janeiro, Inst. Ciencias Exactas, Seropédica, Río de Janeiro, Brasil.
- Rodriguez, F., 2009. La Miel.
http://www.todomiel.net/notas/produccion/articulo_produccion.php?get_notas_id=1286&get_notas_titulo=LA-MIEL
- Serra, Bonvehi, J. 1996. Criterios a Considerar en las Directivas de calidad de la Miel. Vida Apícola 76 (22-26).
- Tomas-Barberan, F, Martos. I, Ferreres. F, Radovic. B, Anklam E. 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. J. Sci. Food. Agric. Vol 81: 485 – 496.
- Vit, P., Gutierrez M., Titera, D., Bednar, M., y Rodriguez-Malaver, A. 2008. Mieles Checas categorizadas según su actividad antioxidante. Acta Latin.Clin.Lationoam. Vol 42 (2): 237 – 244.
- Yao, L., Jiang, Y., D'arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K., 2004. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Flavonoids in Australian Eucalyptus Honeys. J. Agric. Food Chem. Vol 52 : 210 -214.
http://www.culturaapicola.com.ar/wiki/index.php/Cueva_de_la_Araña



CREER. CREAR. CRECER.



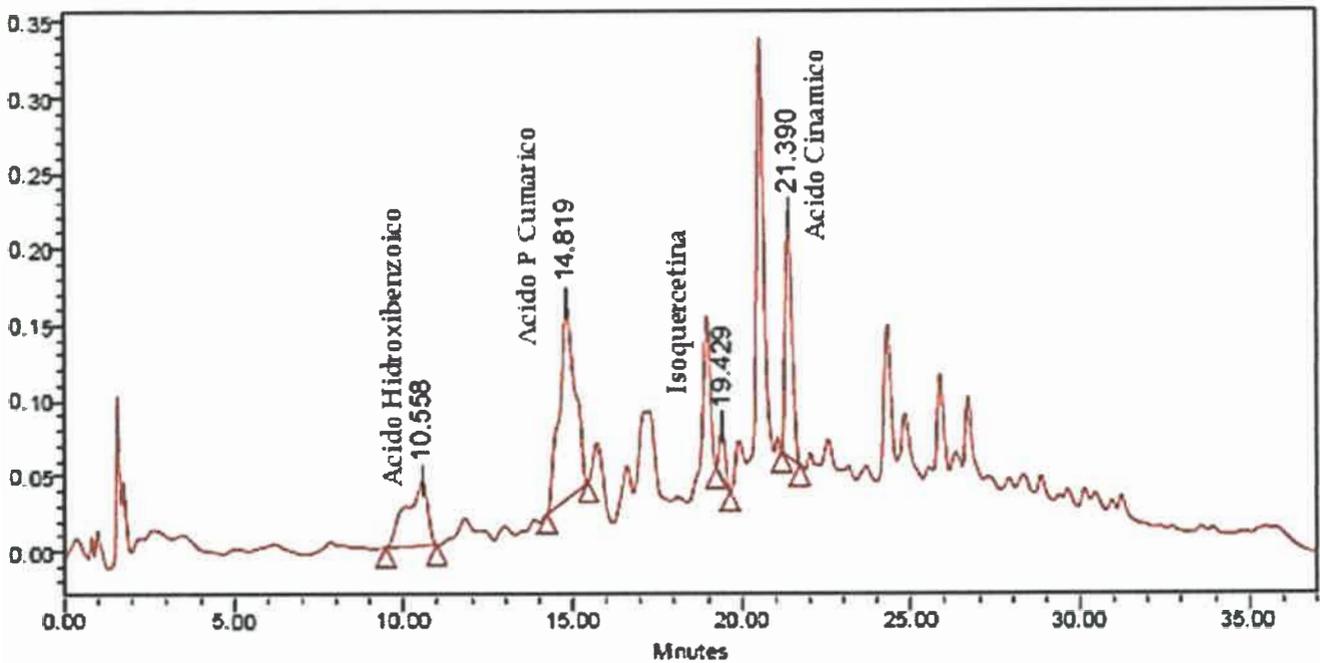
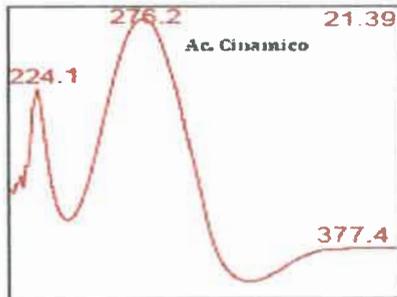
ANEXOS



ANEXO 1

MUESTRA: Formosa 109

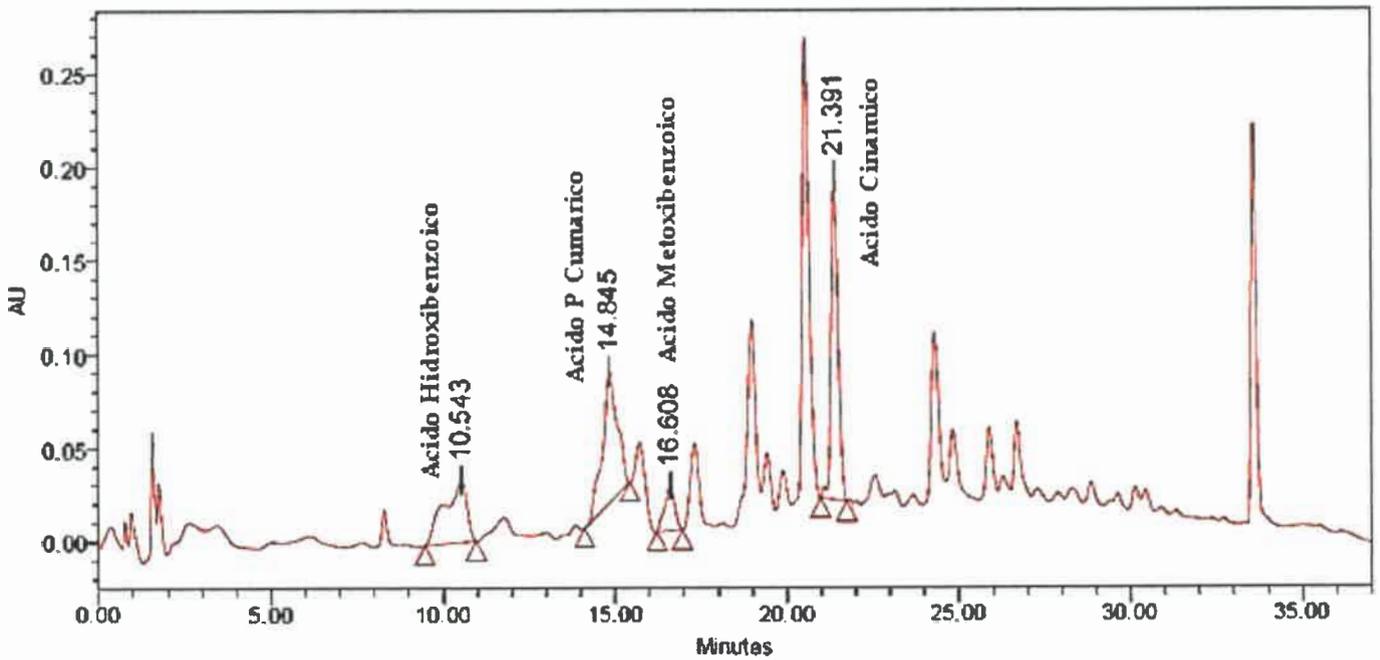
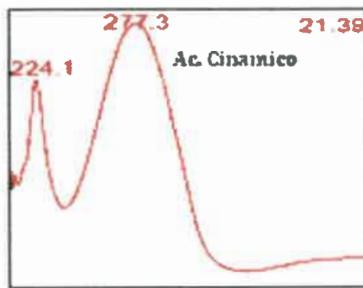
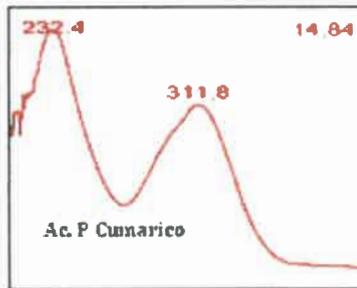
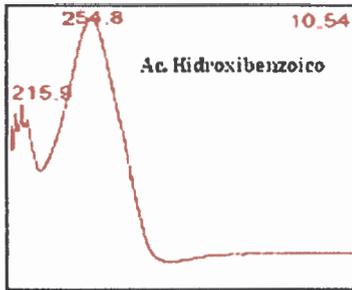
CODIGO: ABF 4 Acetato





MUESTRA: Formosa 109

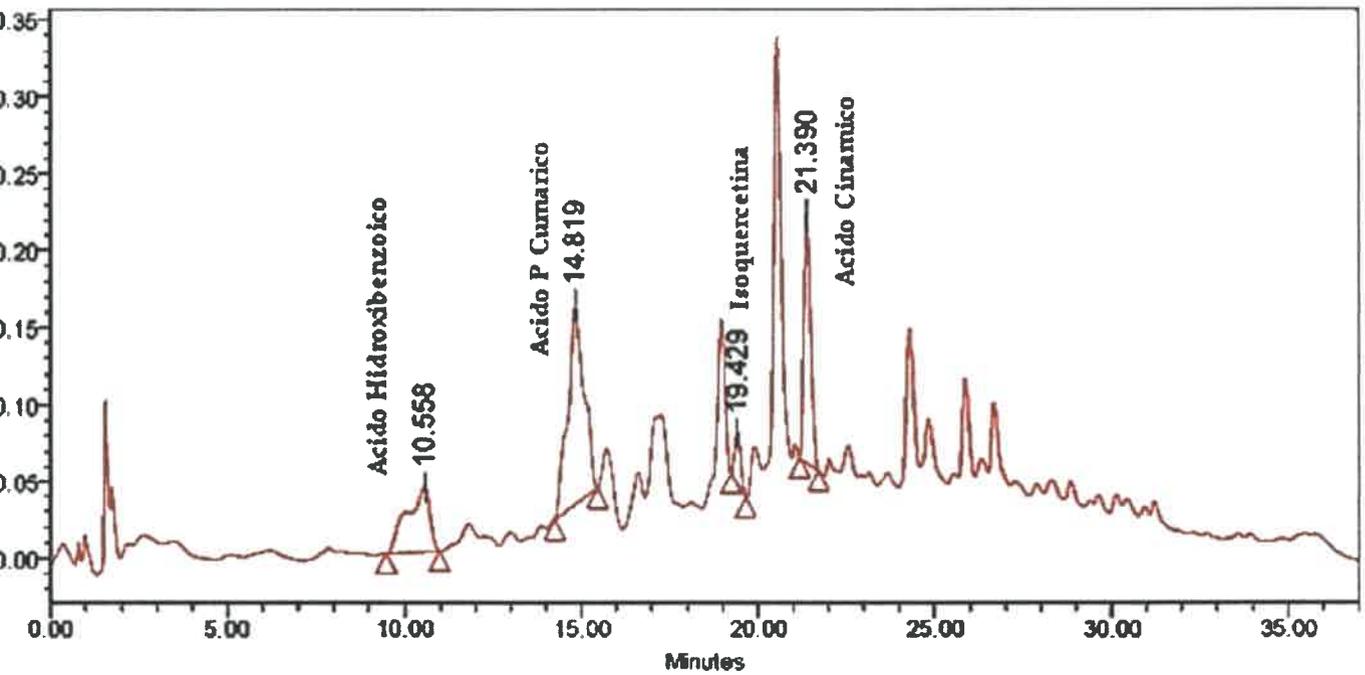
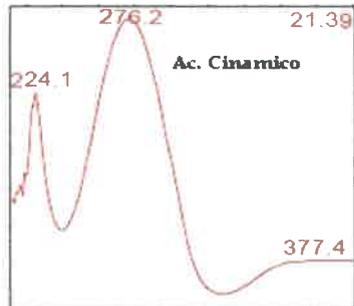
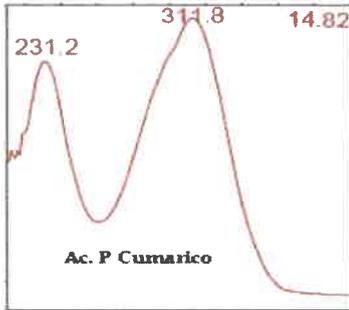
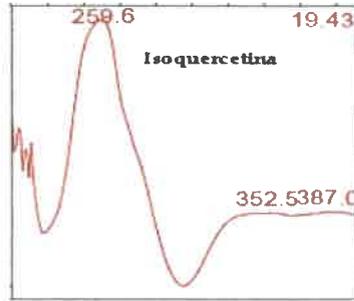
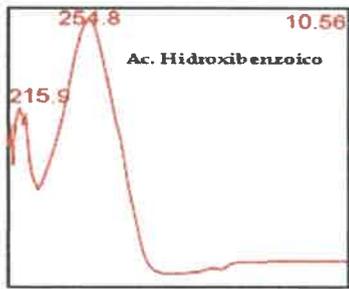
CODIGO: ABF 4 Eter





MUESTRA: Formosa 119

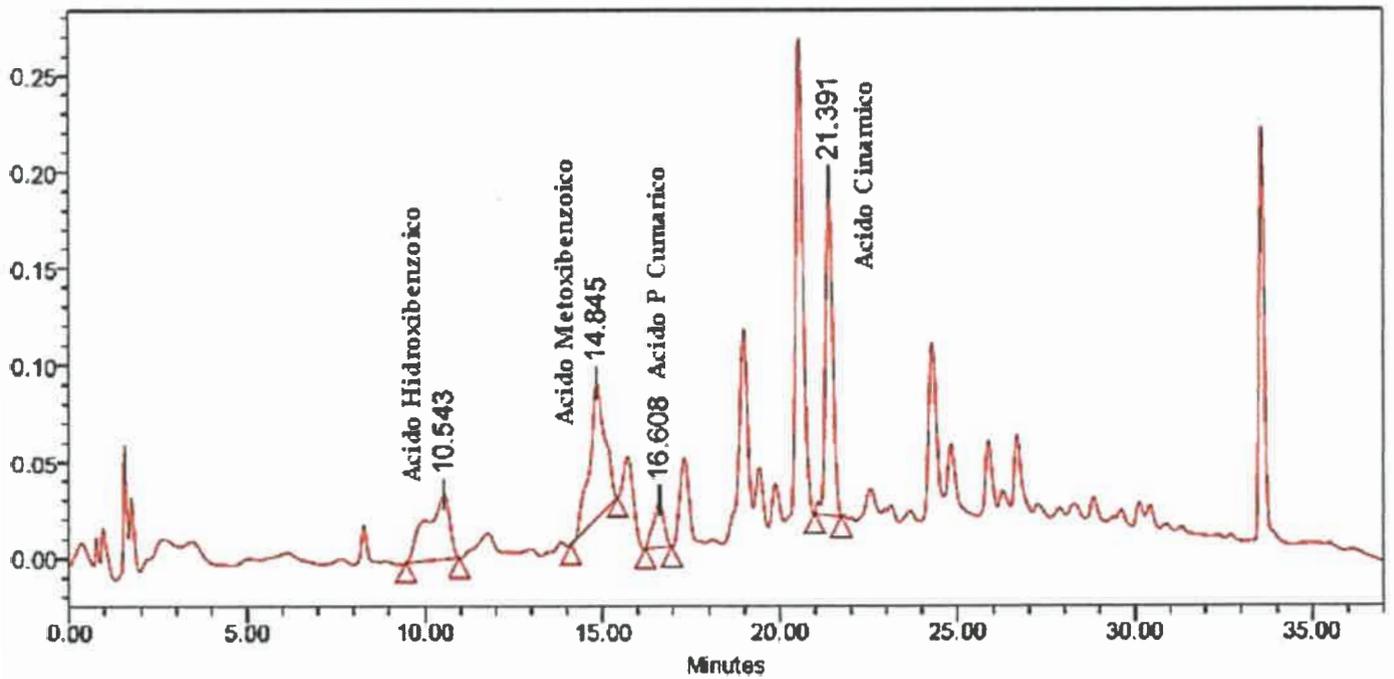
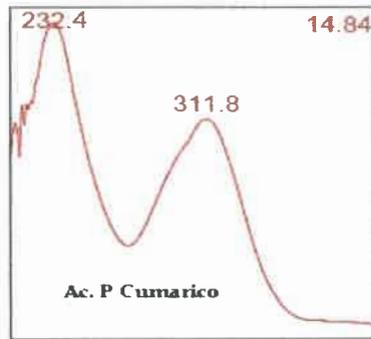
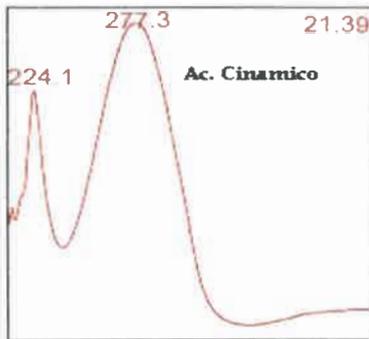
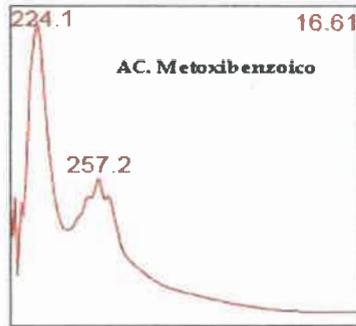
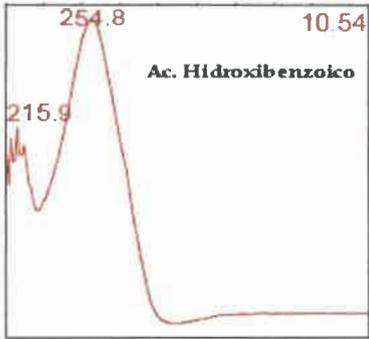
CODIGO: ABF 3 Acetato





MUESTRA: Formosa 119

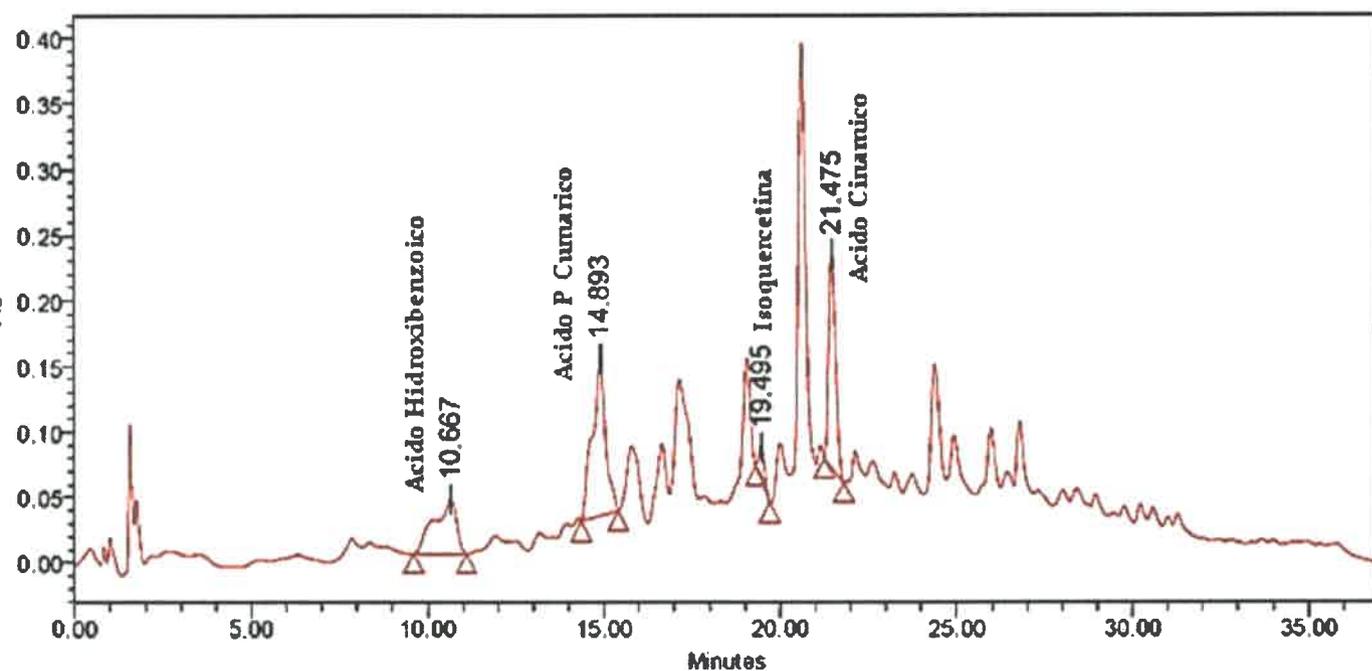
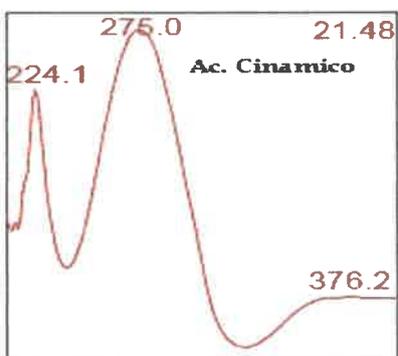
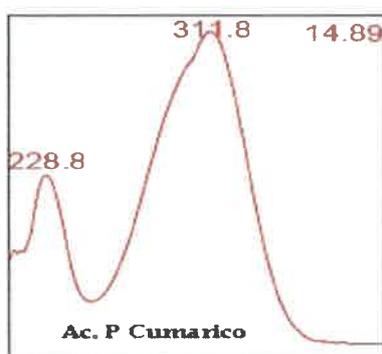
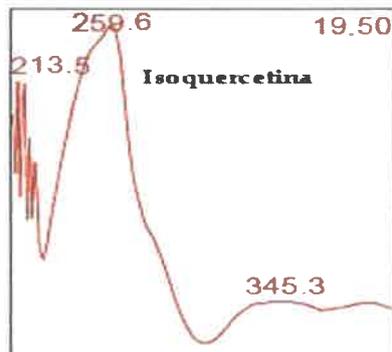
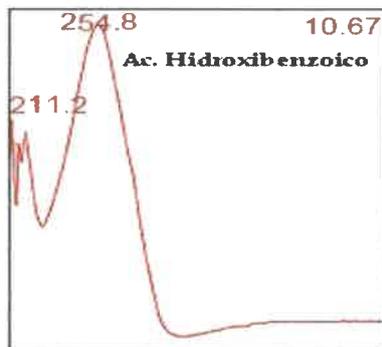
CODIGO: ABF 3 Eter





MUESTRA: Formosa 130

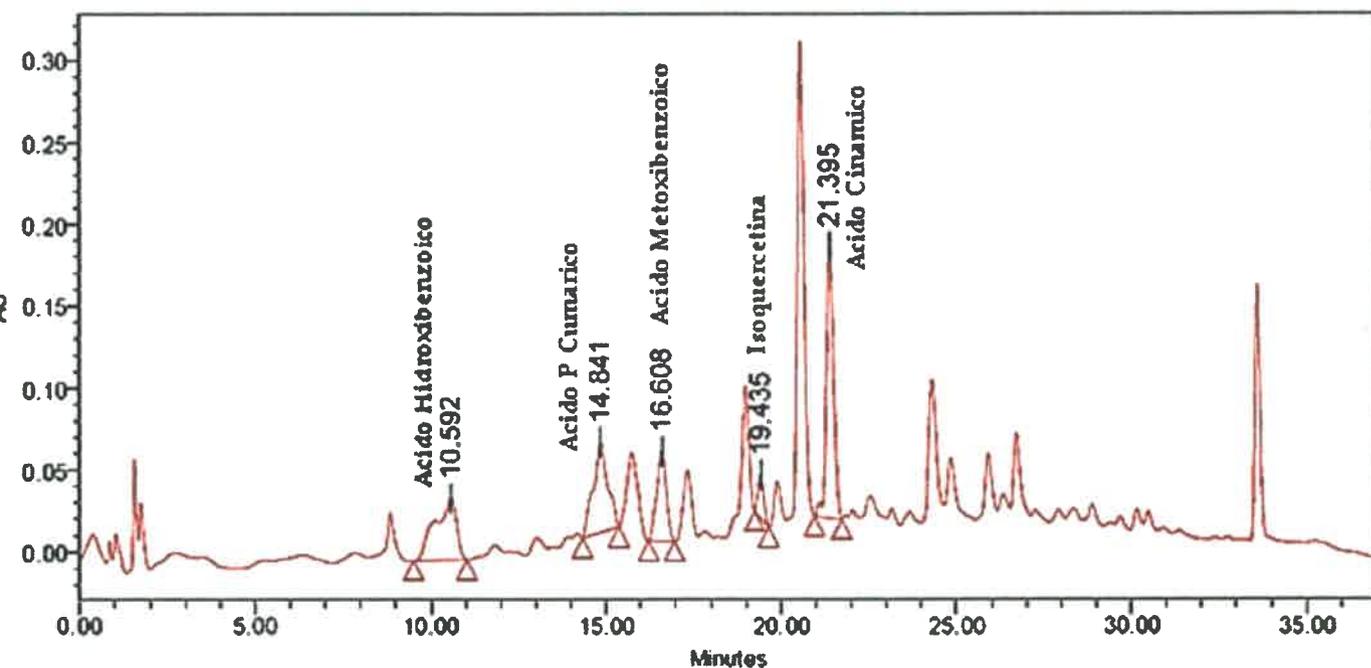
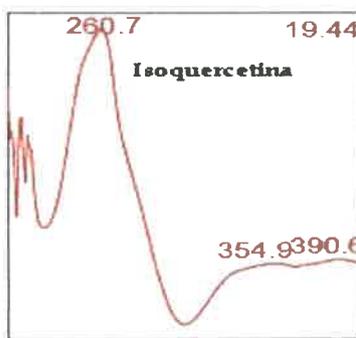
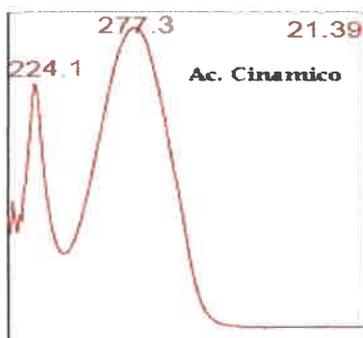
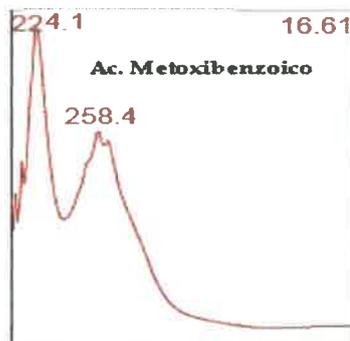
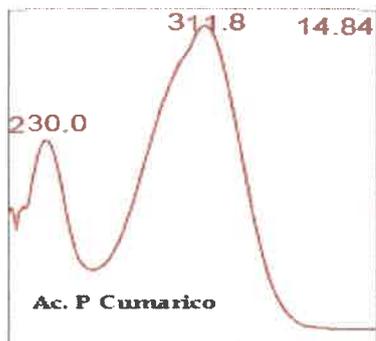
CODIGO: ABF 2 Acetato





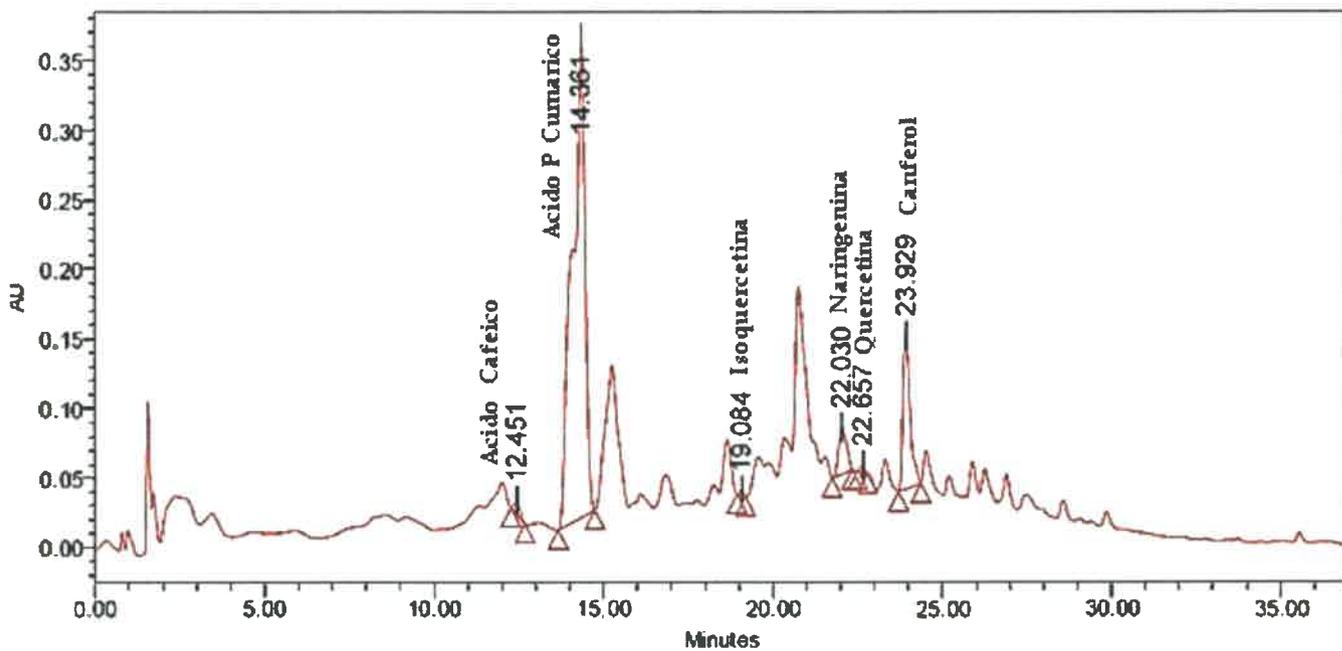
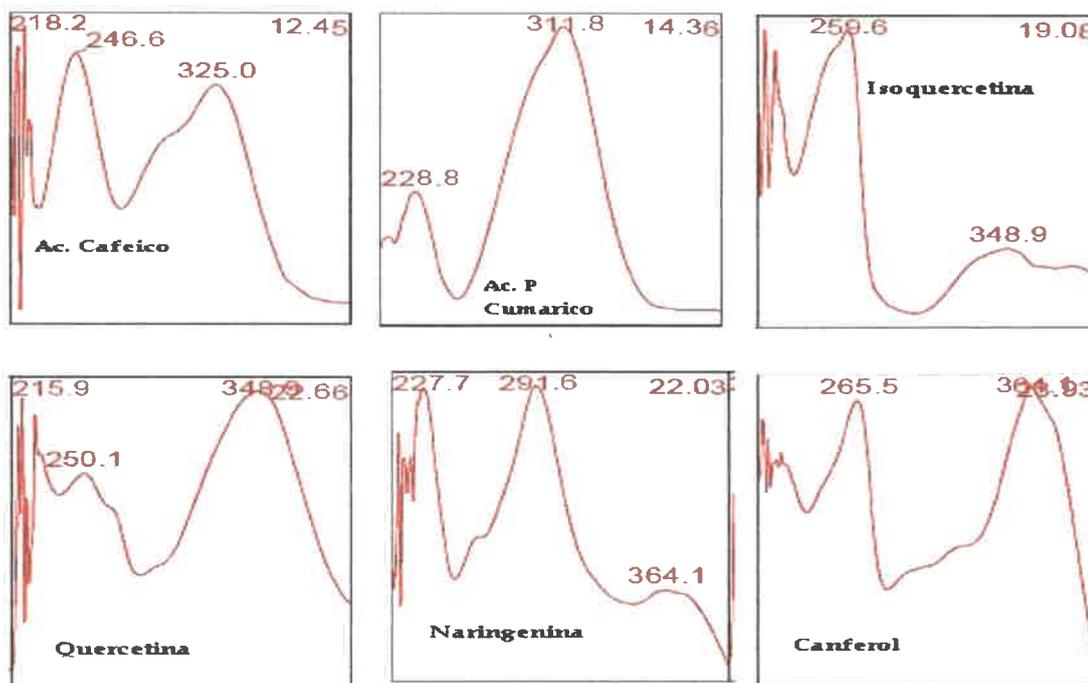
MUESTRA: Formosa 130

CODIGO: ABF 2 Eter



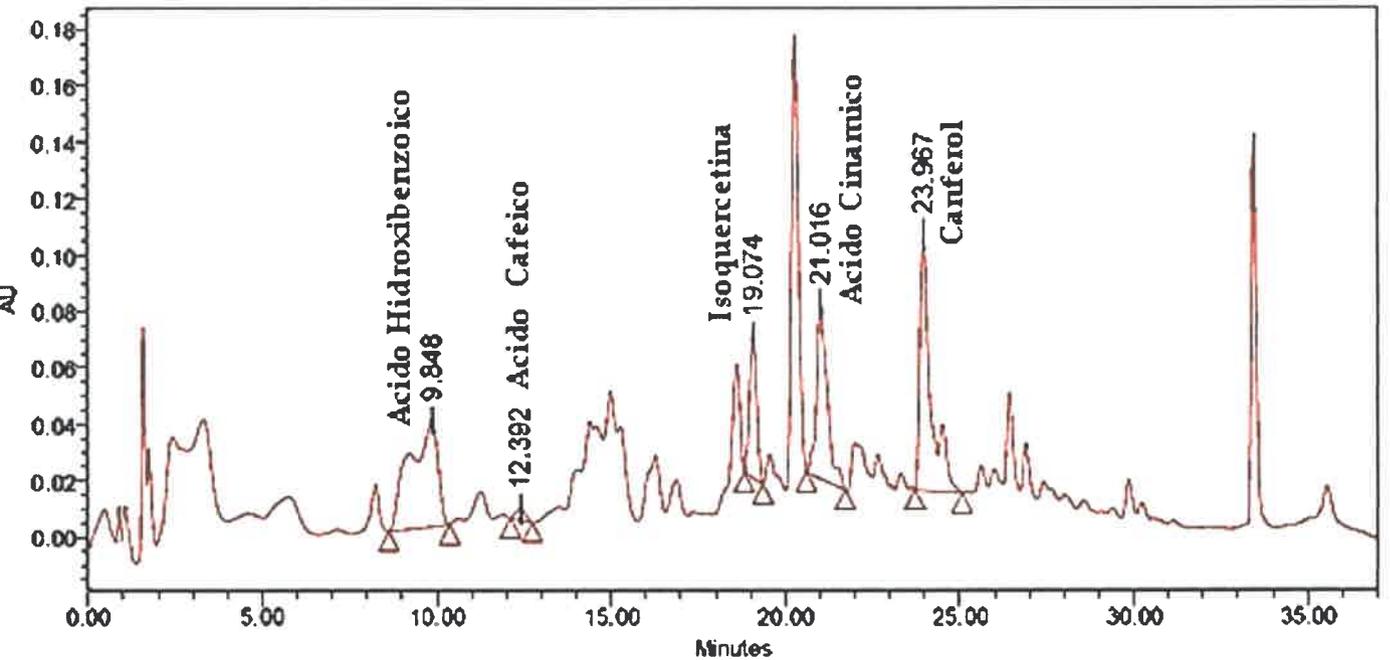
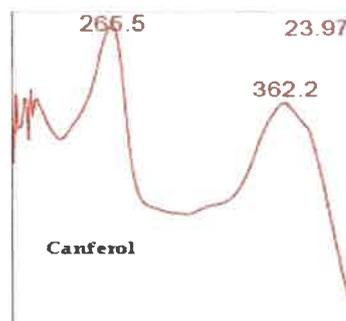
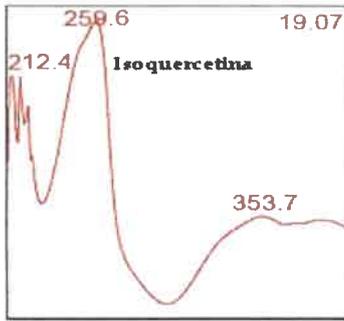
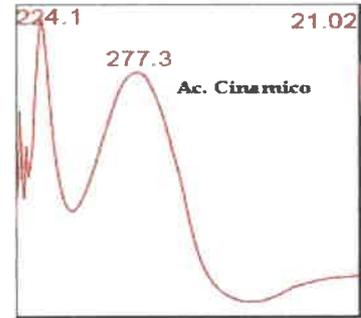
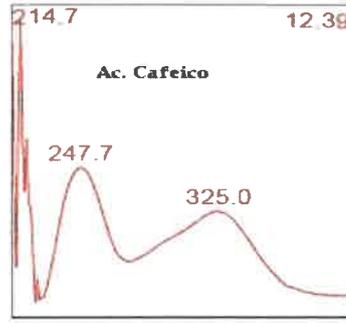
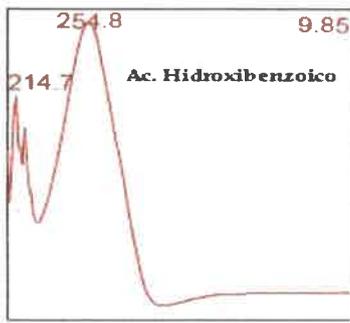


MUESTRA: Formosa 116 - CODIGO: ABF 1 Acetato



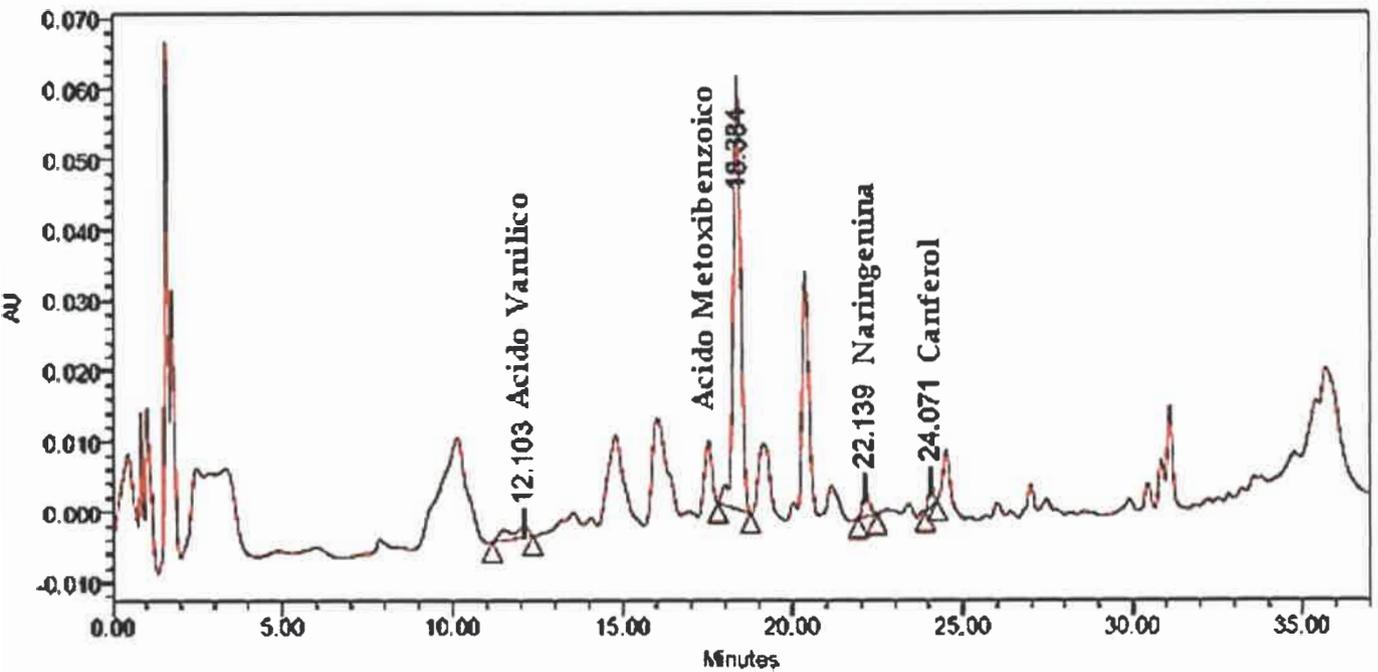
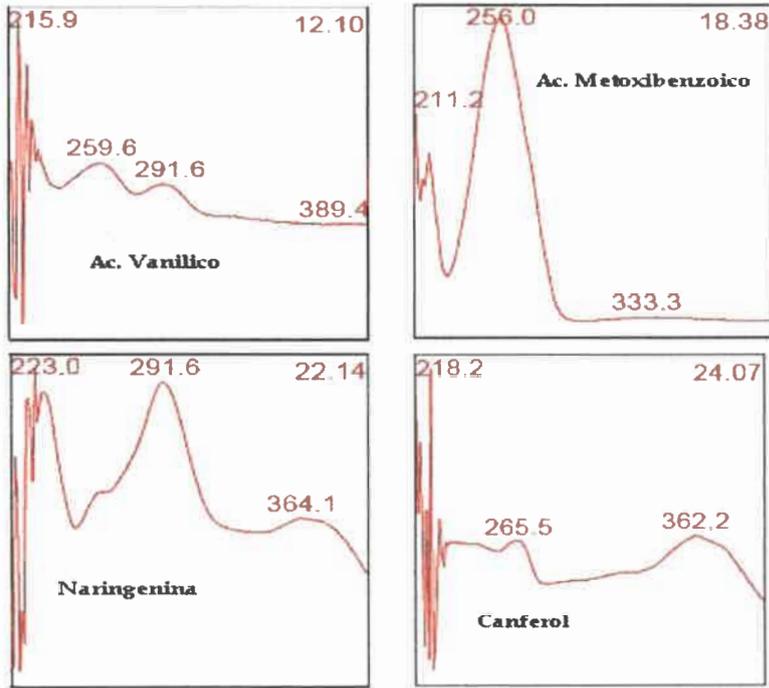


MUESTRA: Formosa 116 - CODIGO: ABF 1 Eter



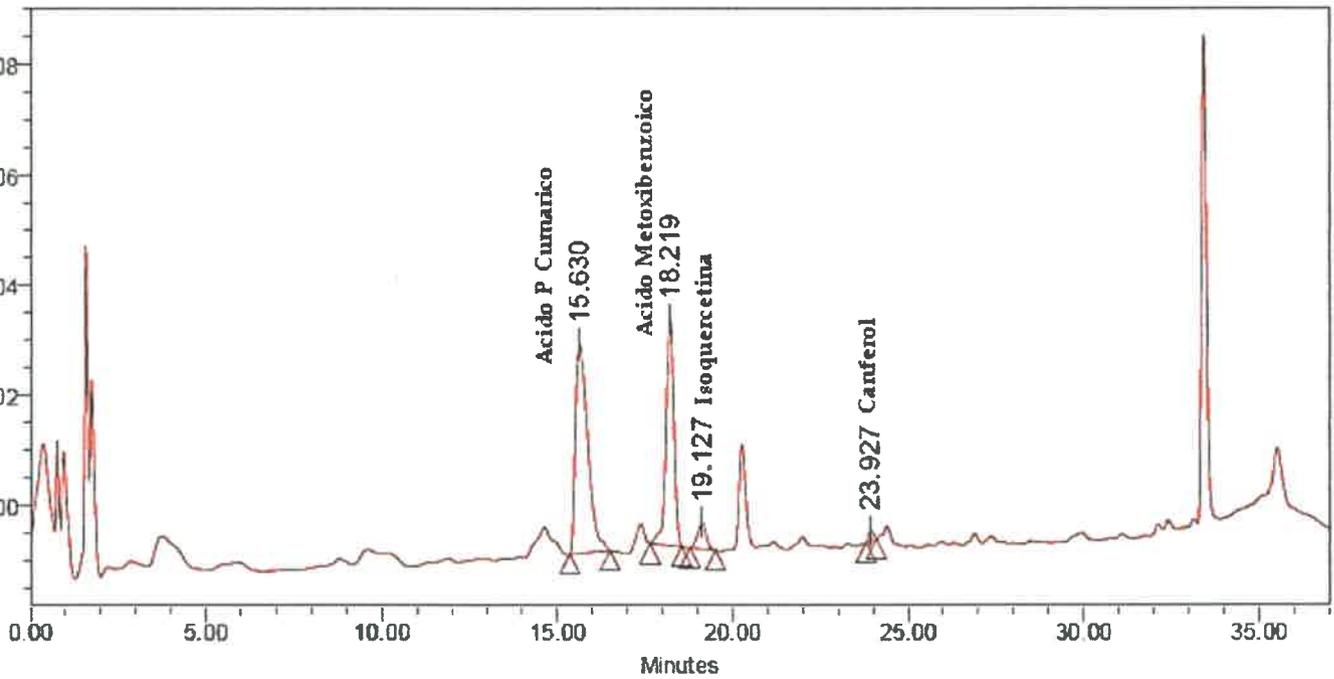
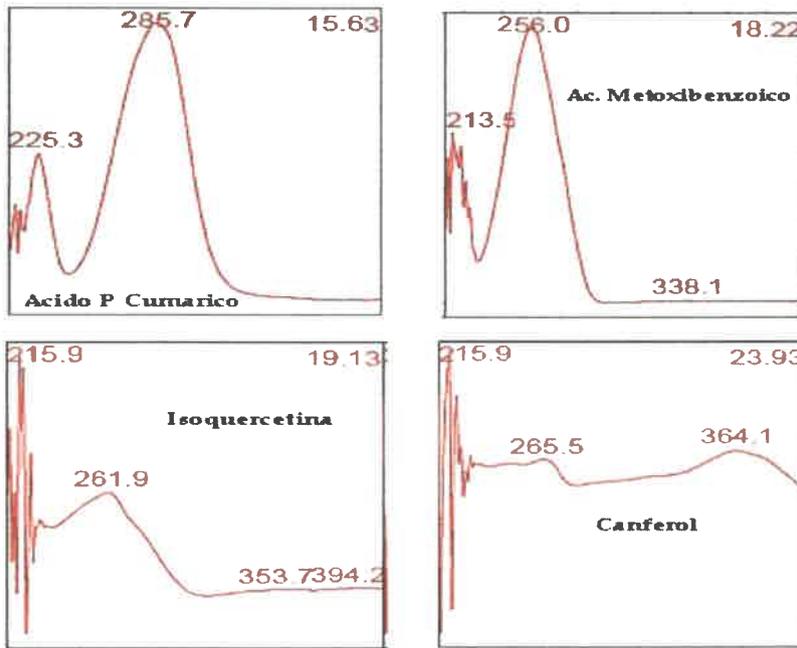


MUESTRA: Chaco 29- CODIGO: ABCHA 2 Acetato



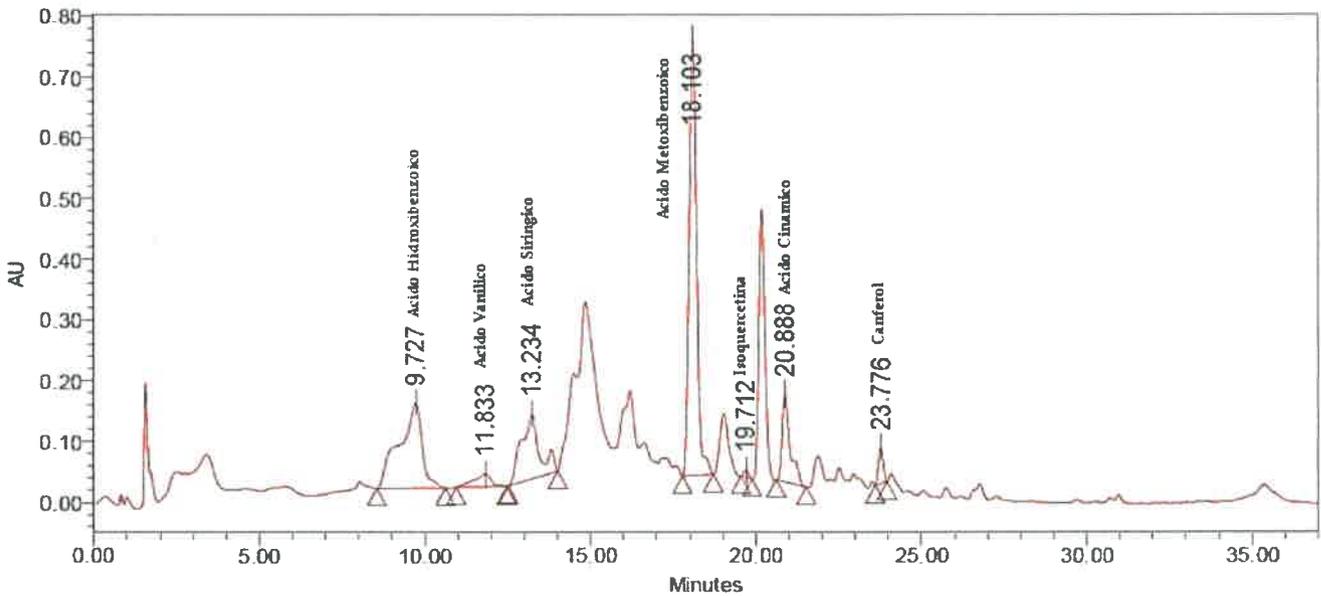
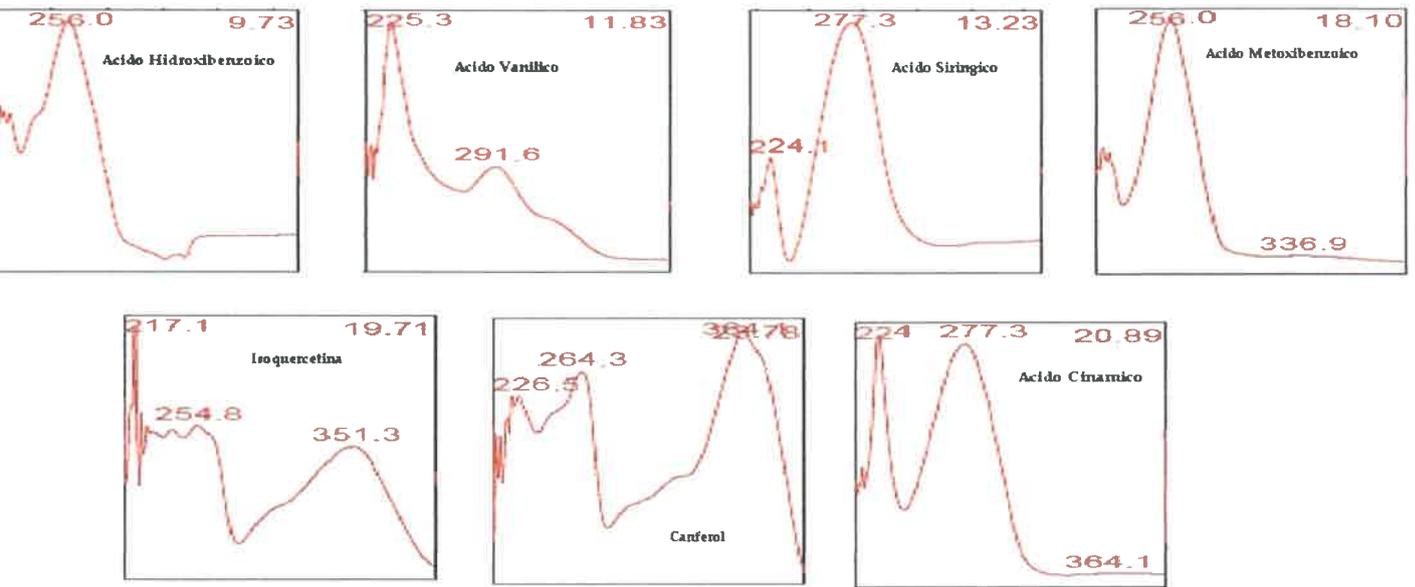


MUESTRA: Chaco 29- CODIGO: ABCHA 2 Eter



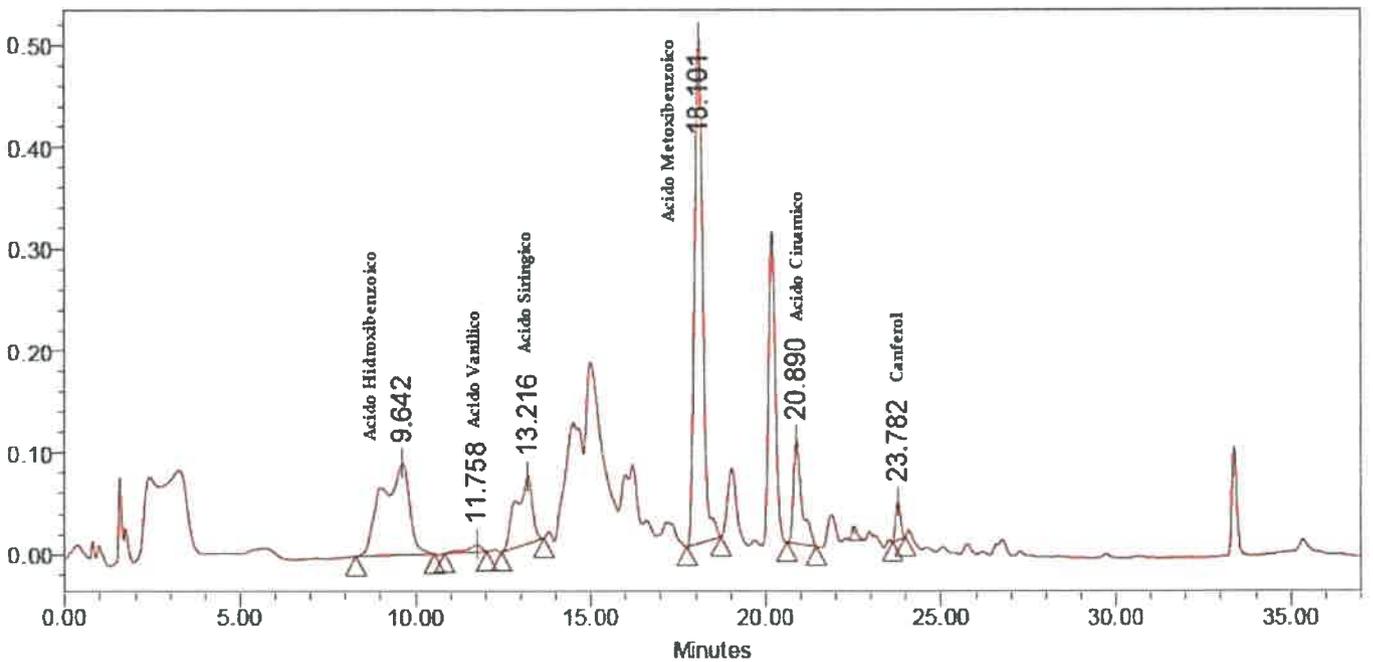
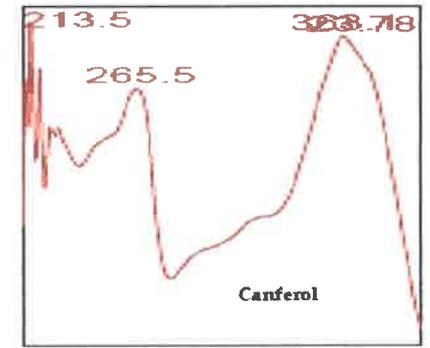
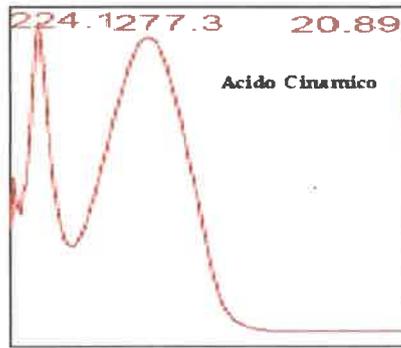
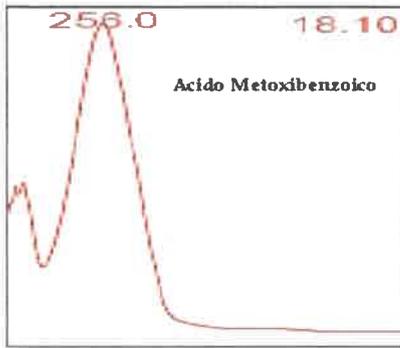
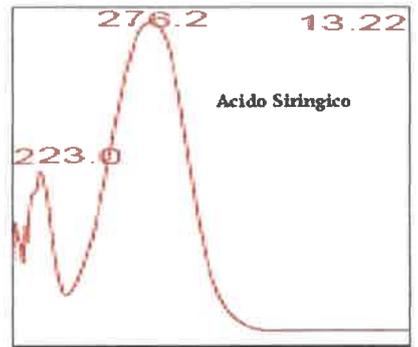
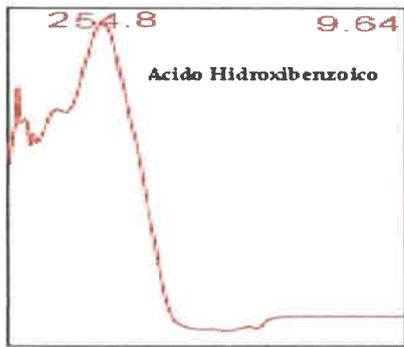


MUESTRA: Chaco 42- CODIGO: ABCHA 3 Acetato



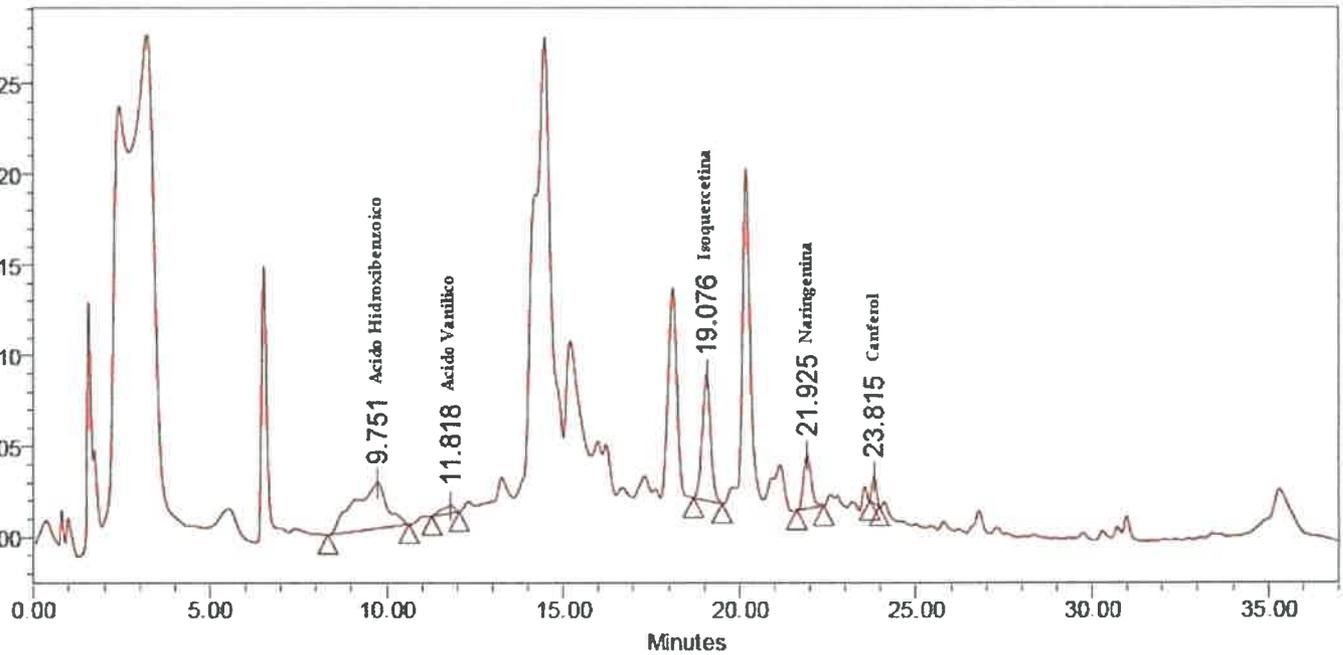
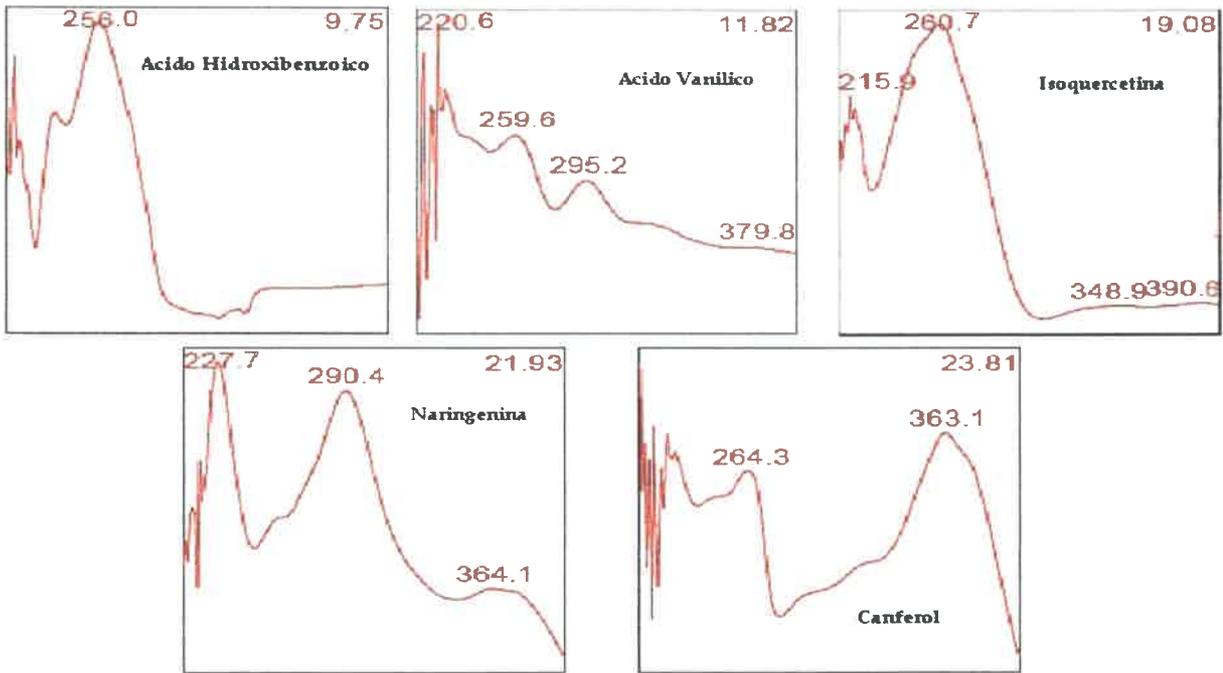


MUESTRA: Chaco 42- CODIGO: ABCHA 3 Eter



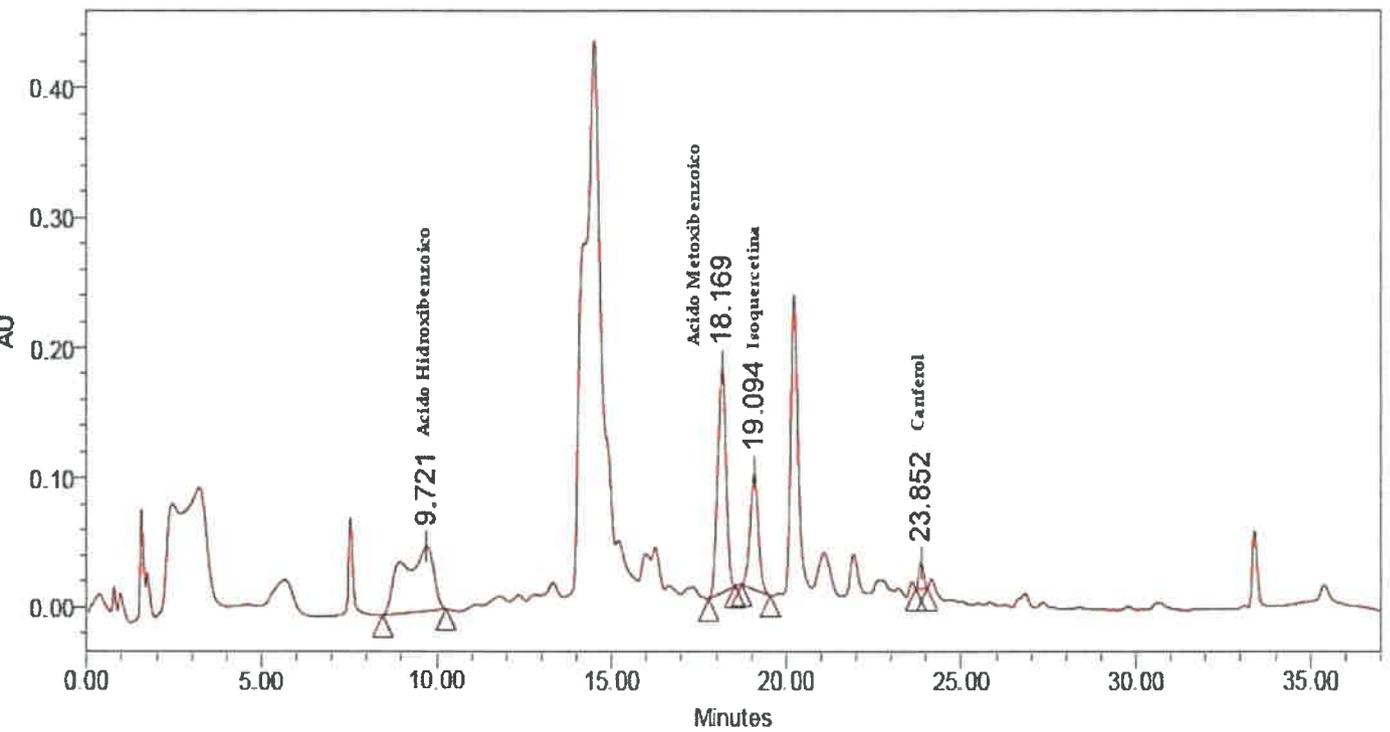
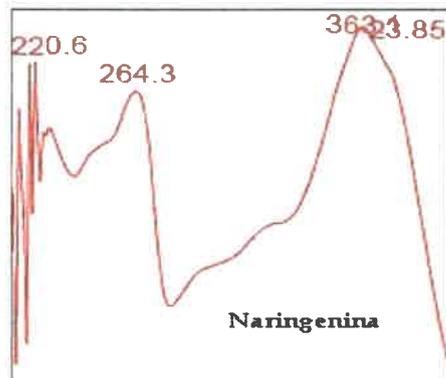
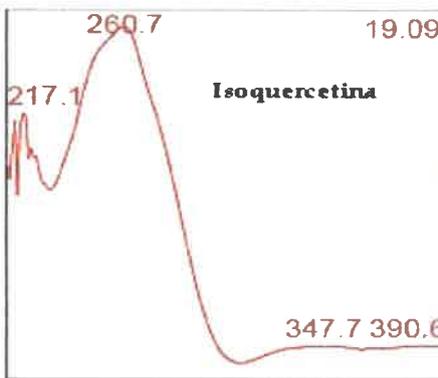
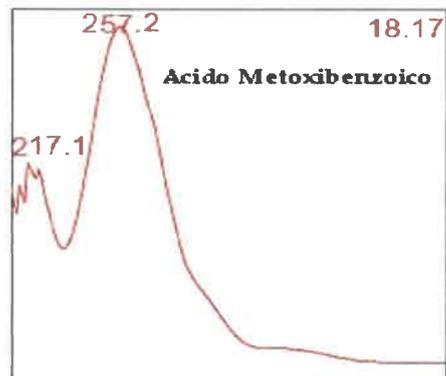
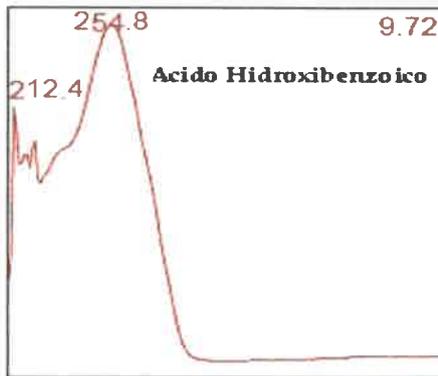


MUESTRA: Chaco 80- CODIGO: ABCHA 4 Acetato



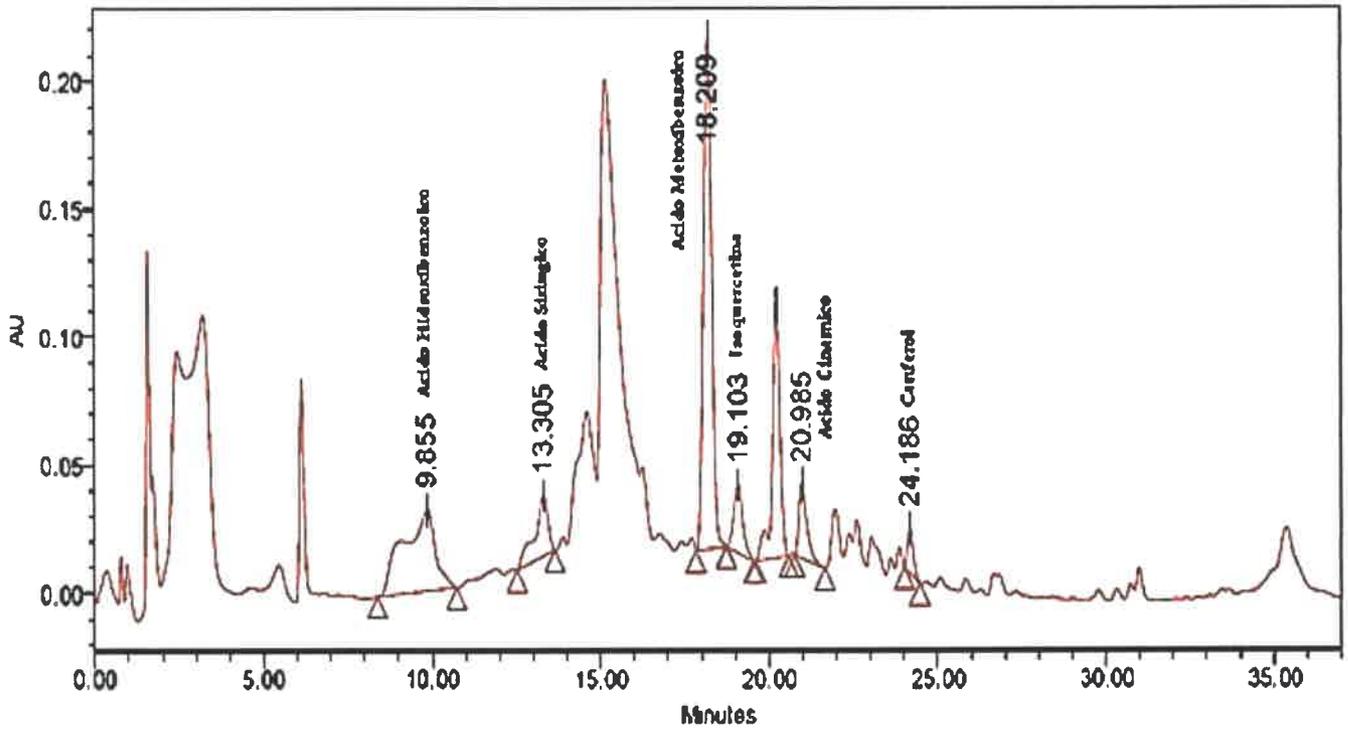
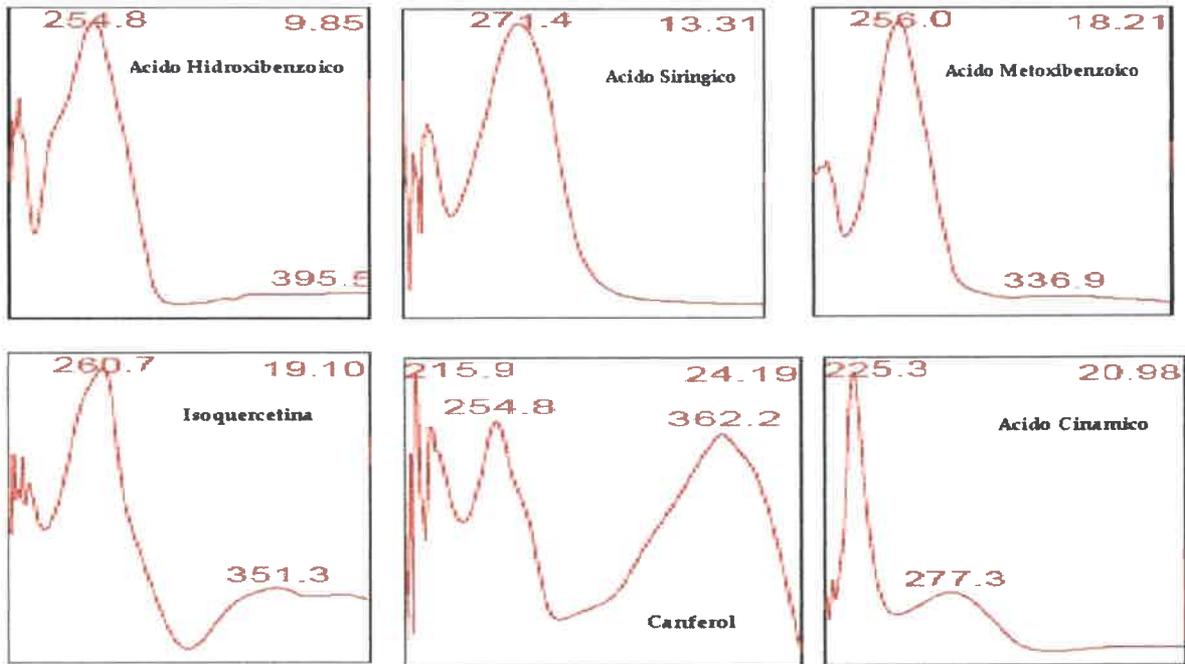


MUESTRA: Chaco 80- CODIGO: ABCHA 4 Eter



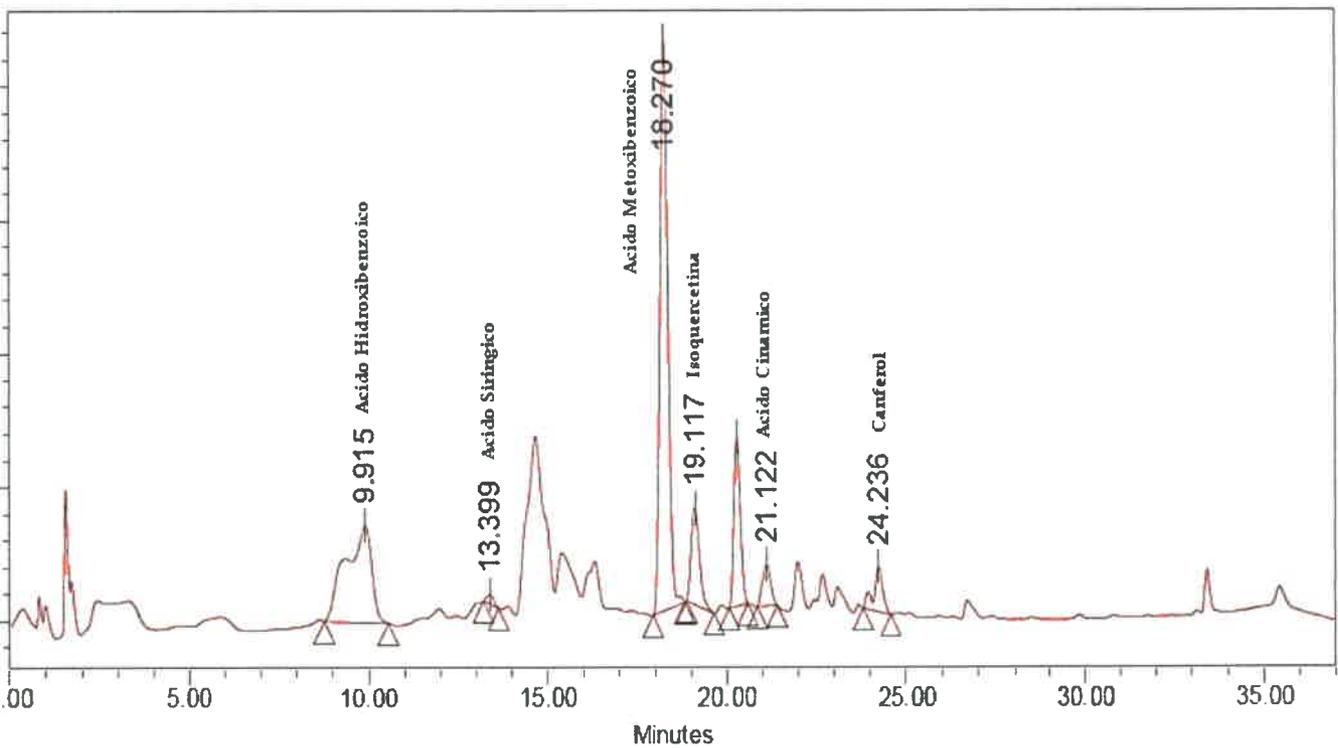
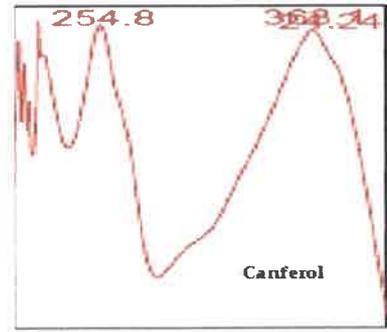
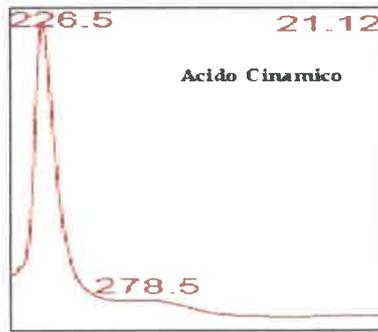
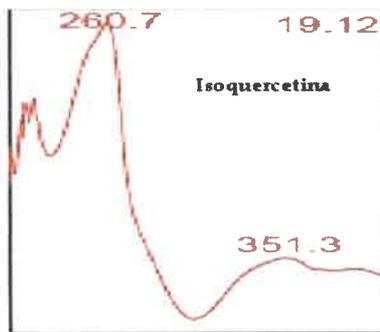
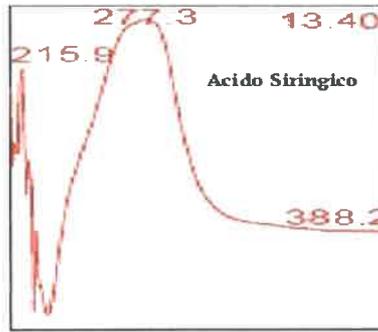
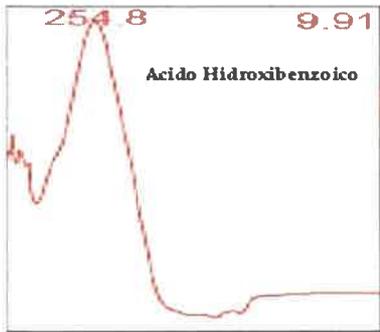


MUESTRA: Chaco 55- CODIGO: ABCHA 5 Acetato



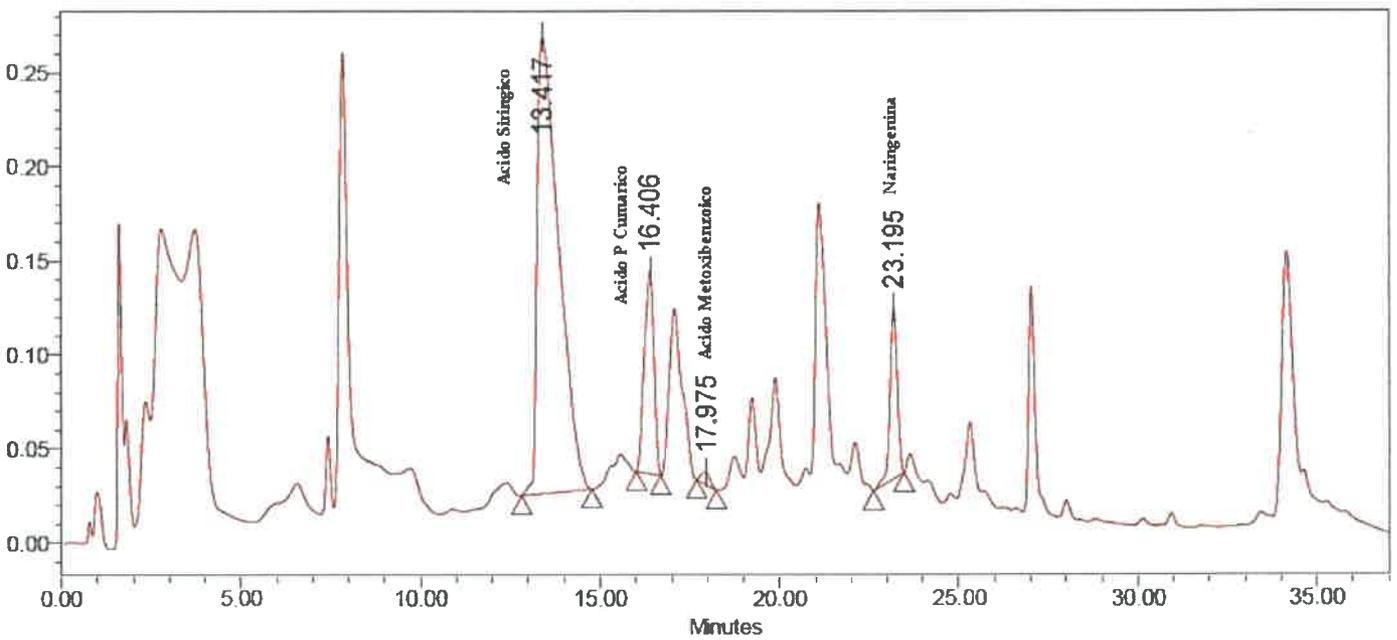
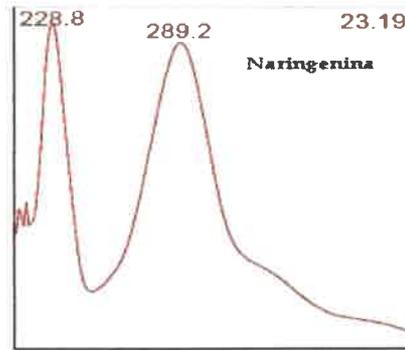
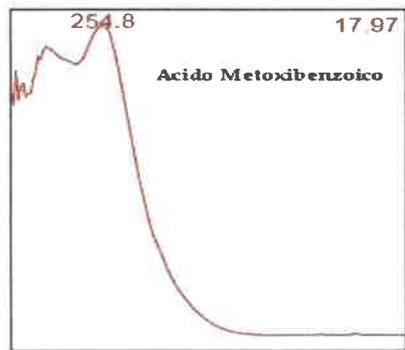
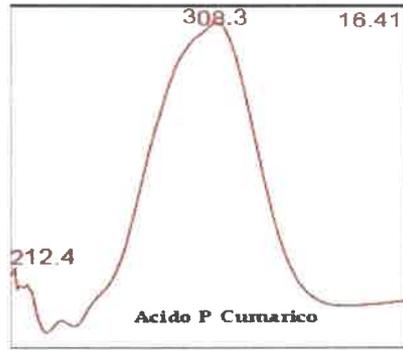
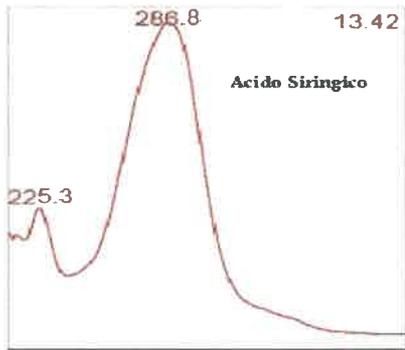


MUESTRA: Chaco 55- CODIGO: ABCHA 5 Eter



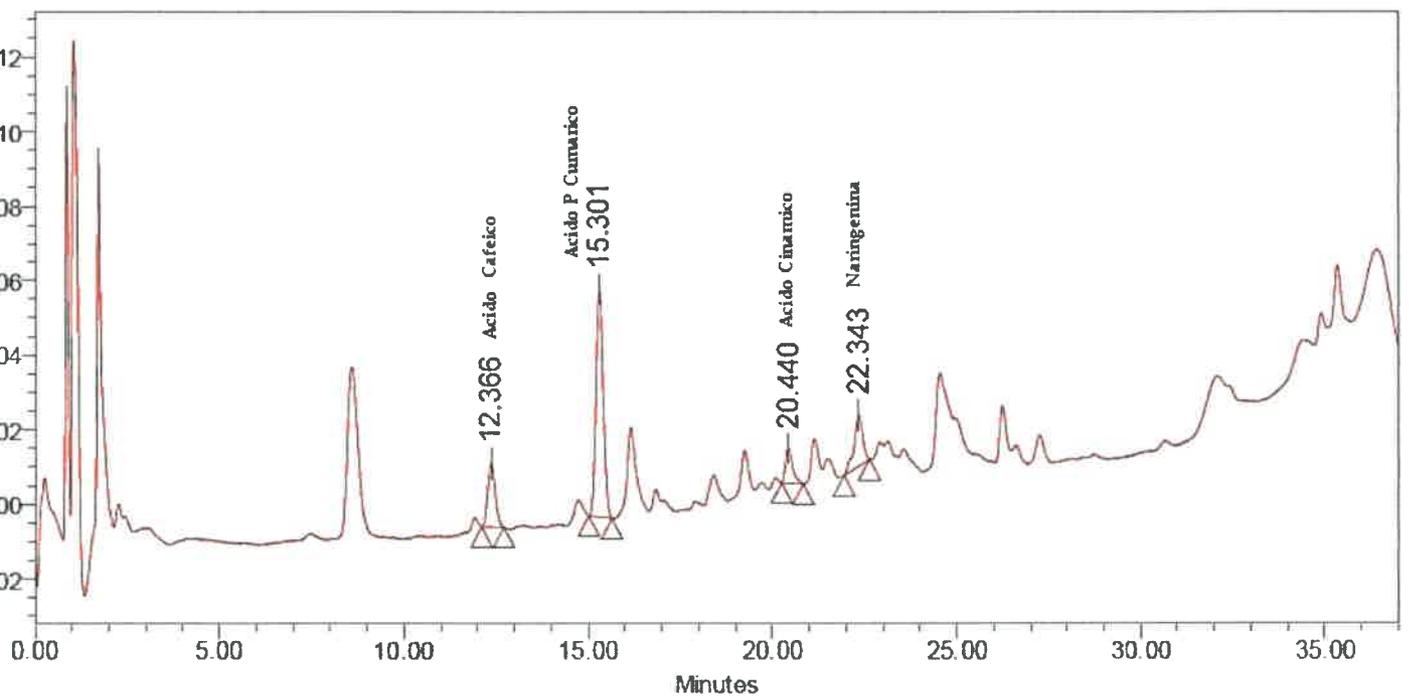
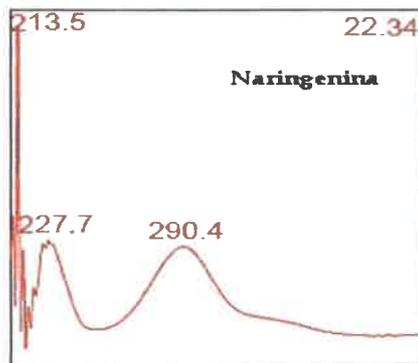
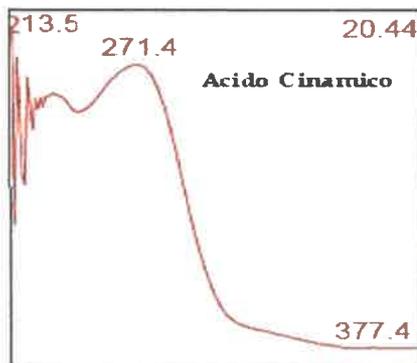
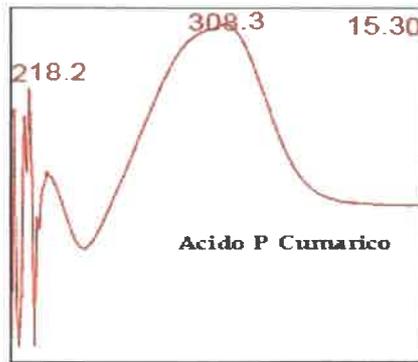
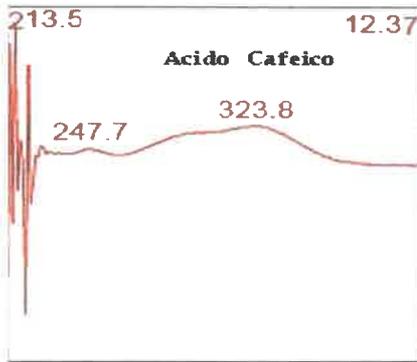


MUESTRA: Chaco 22- CODIGO: ABCHA 1 Acetato



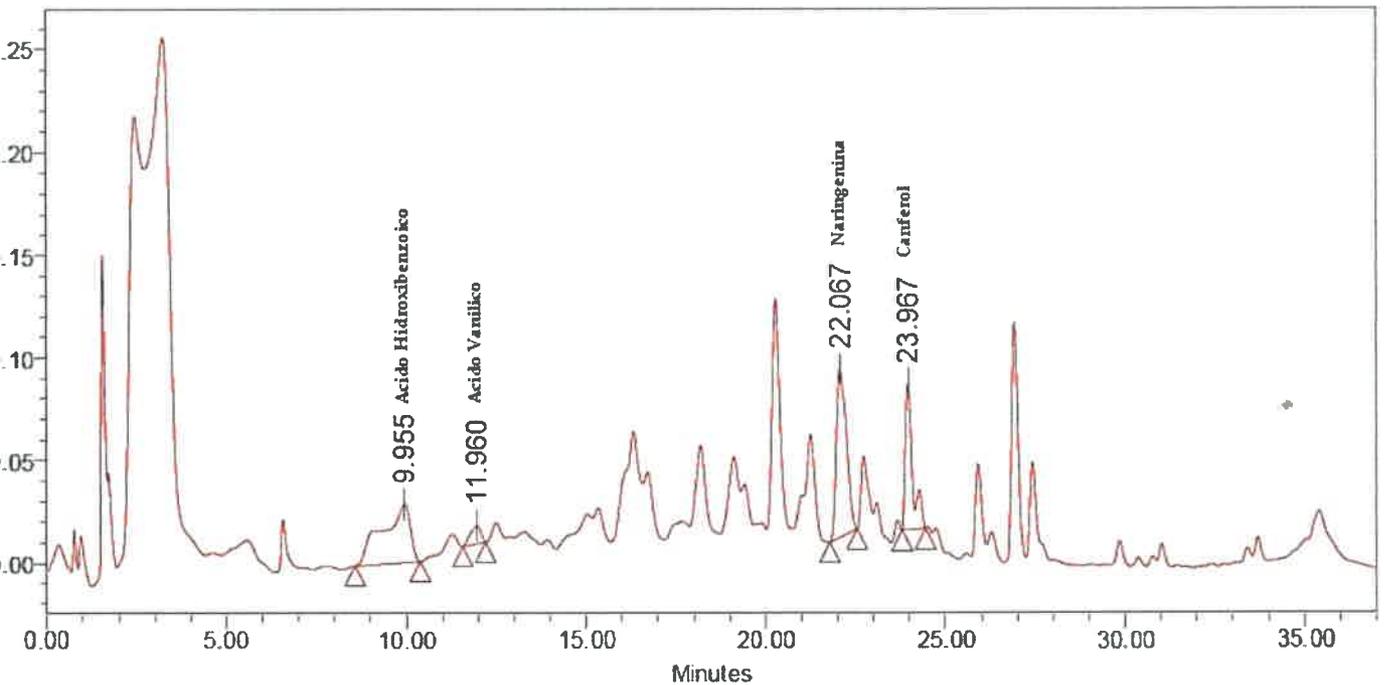
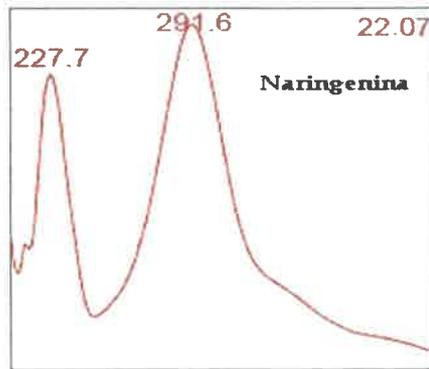
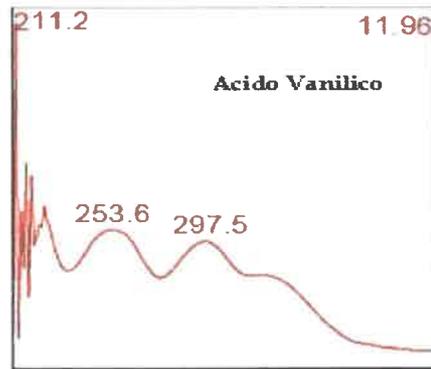
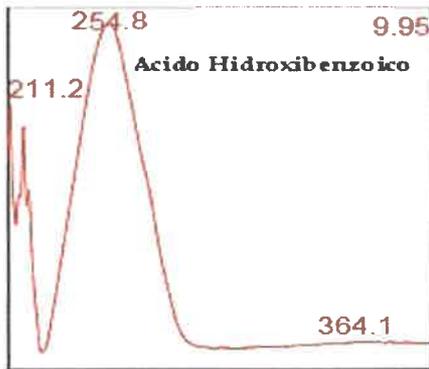


MUESTRA: Chaco 22- CODIGO: ABCHA 1 Eter



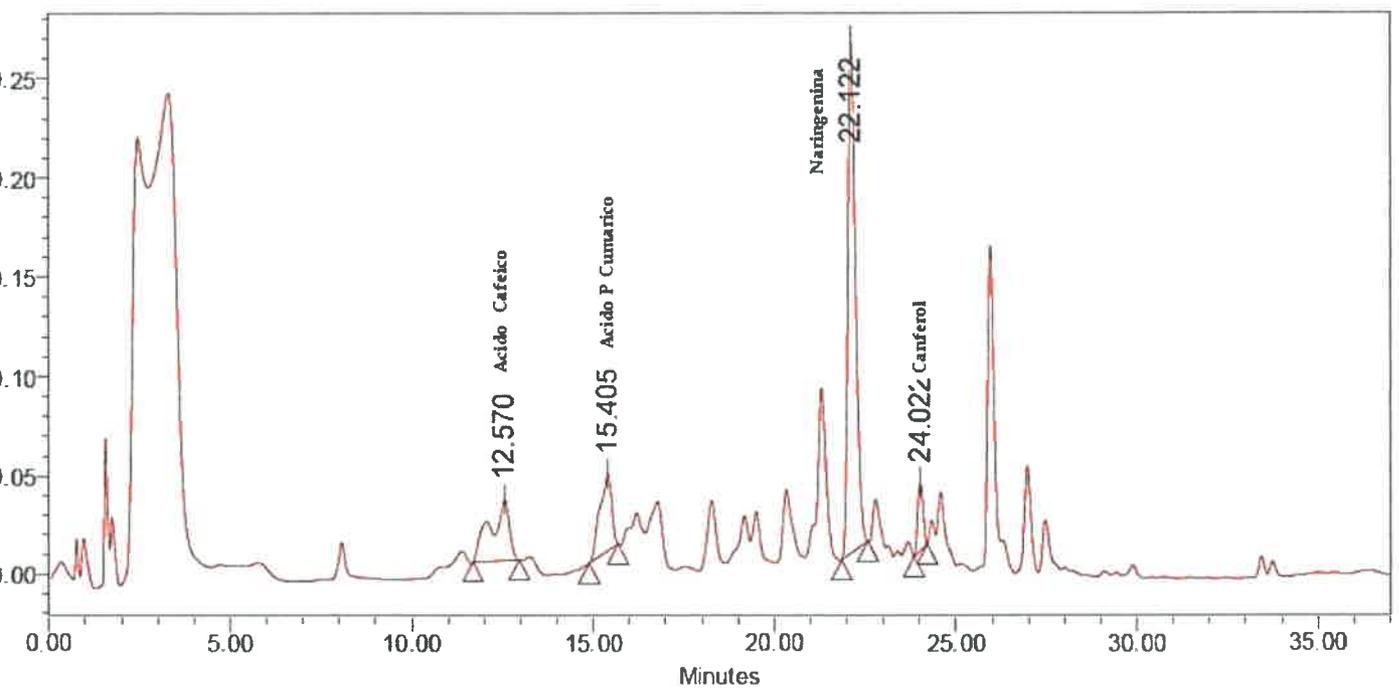
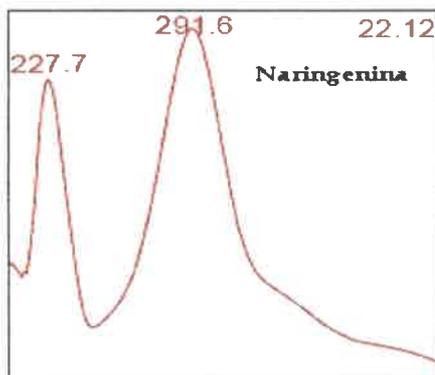
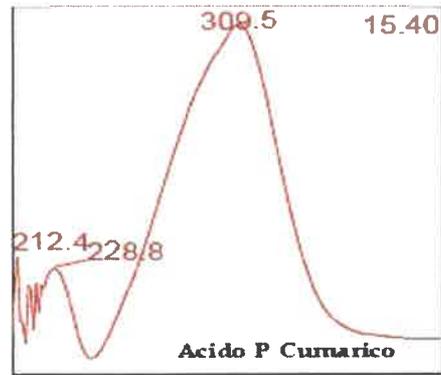


MUESTRA: Río IV- CODIGO: ABR Acetato



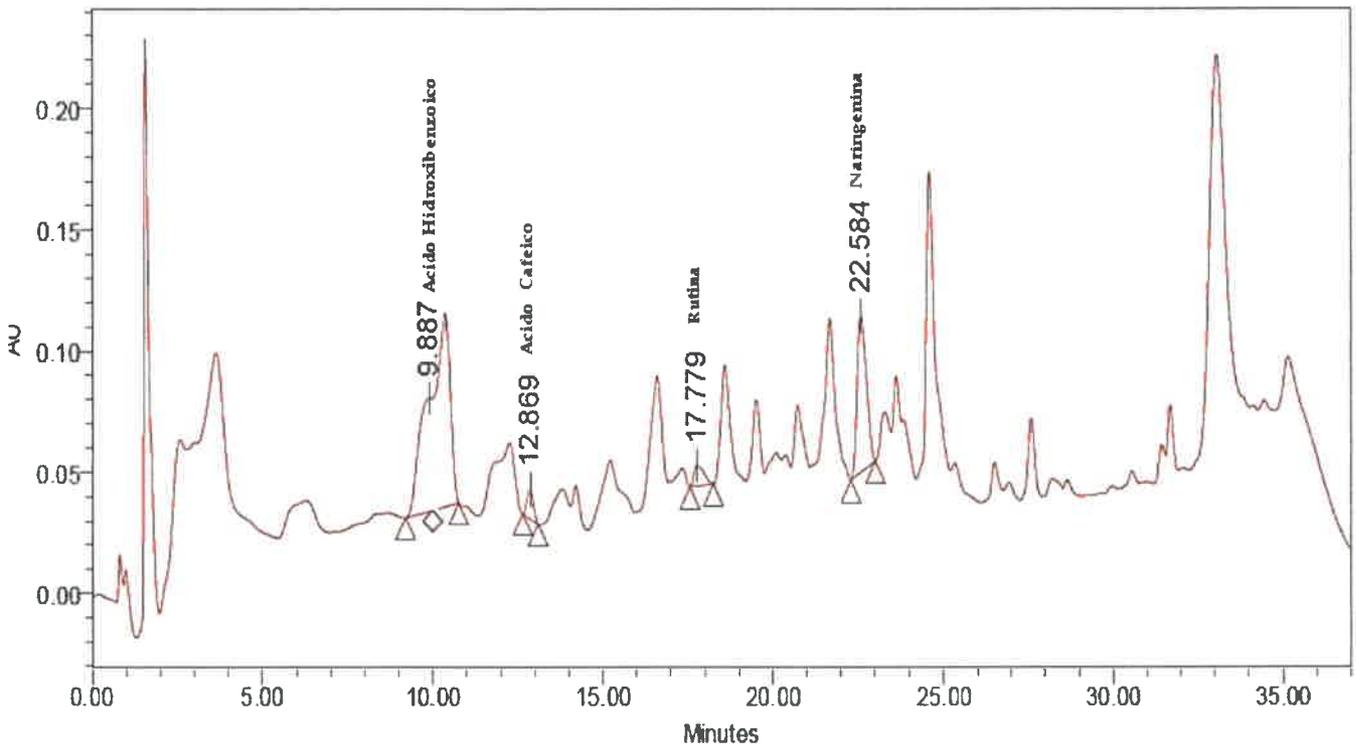
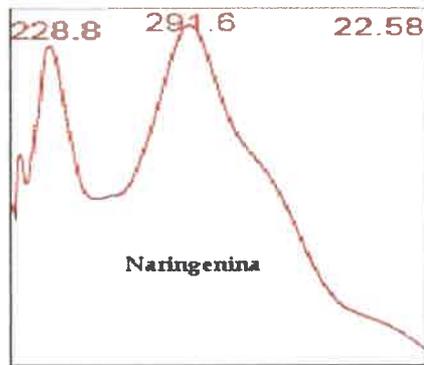
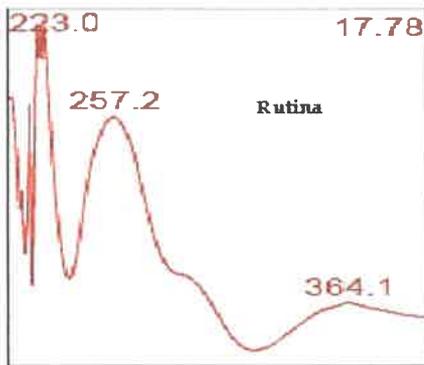
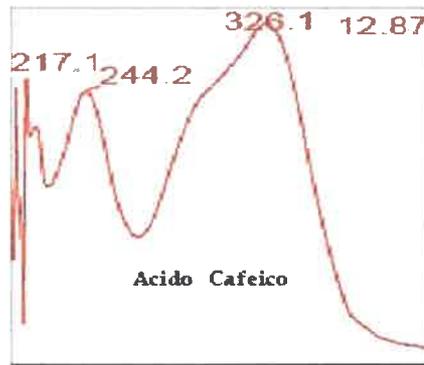


MUESTRA: Río IV- CODIGO: ABR Eter



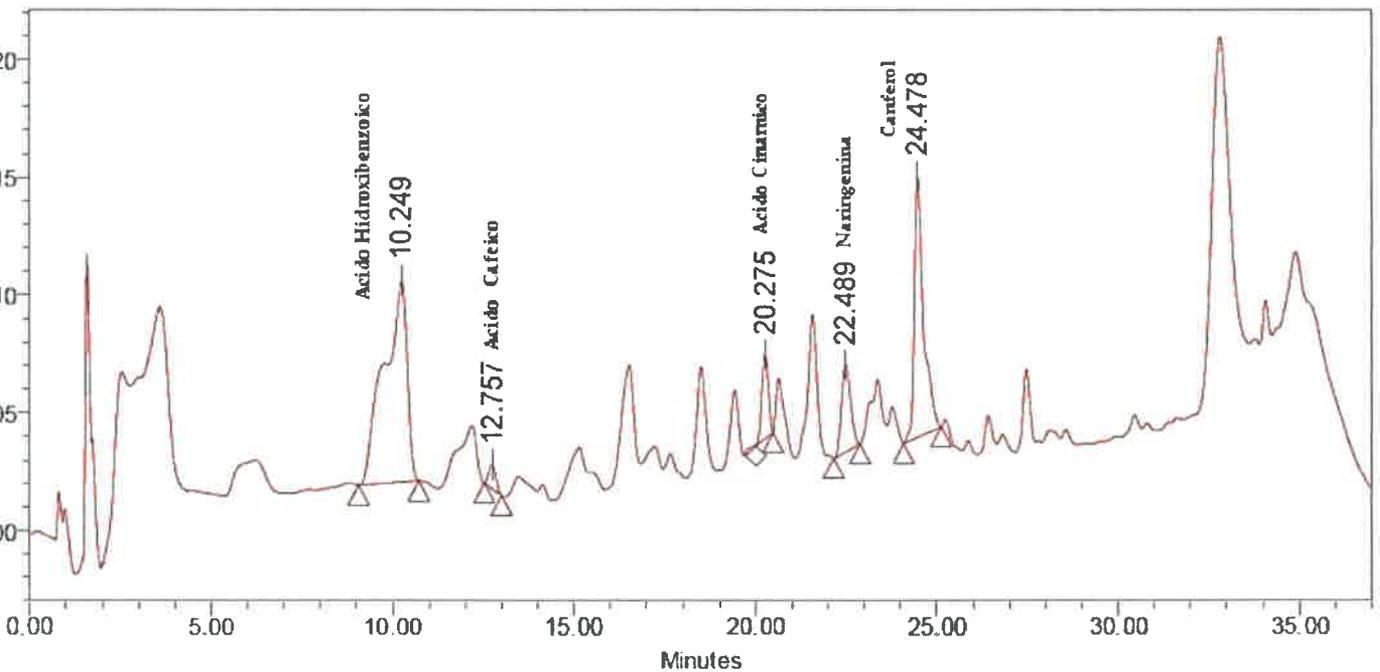
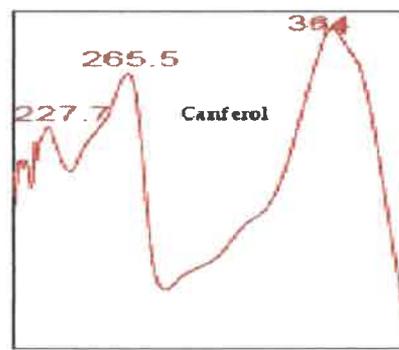
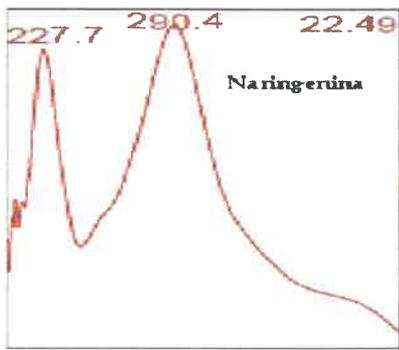
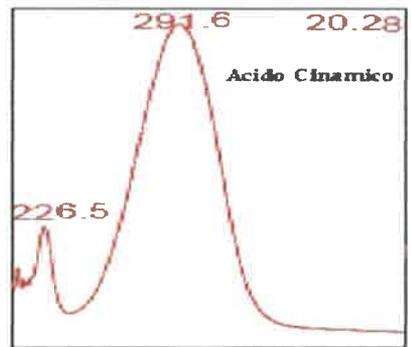
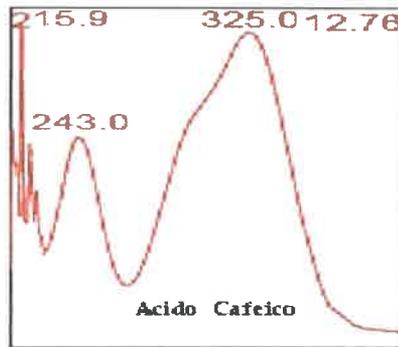
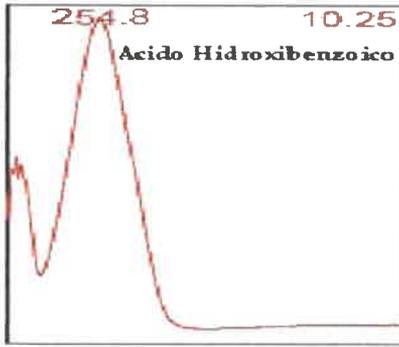


MUESTRA: Río IV 7- CODIGO: ABR 7 Acetato



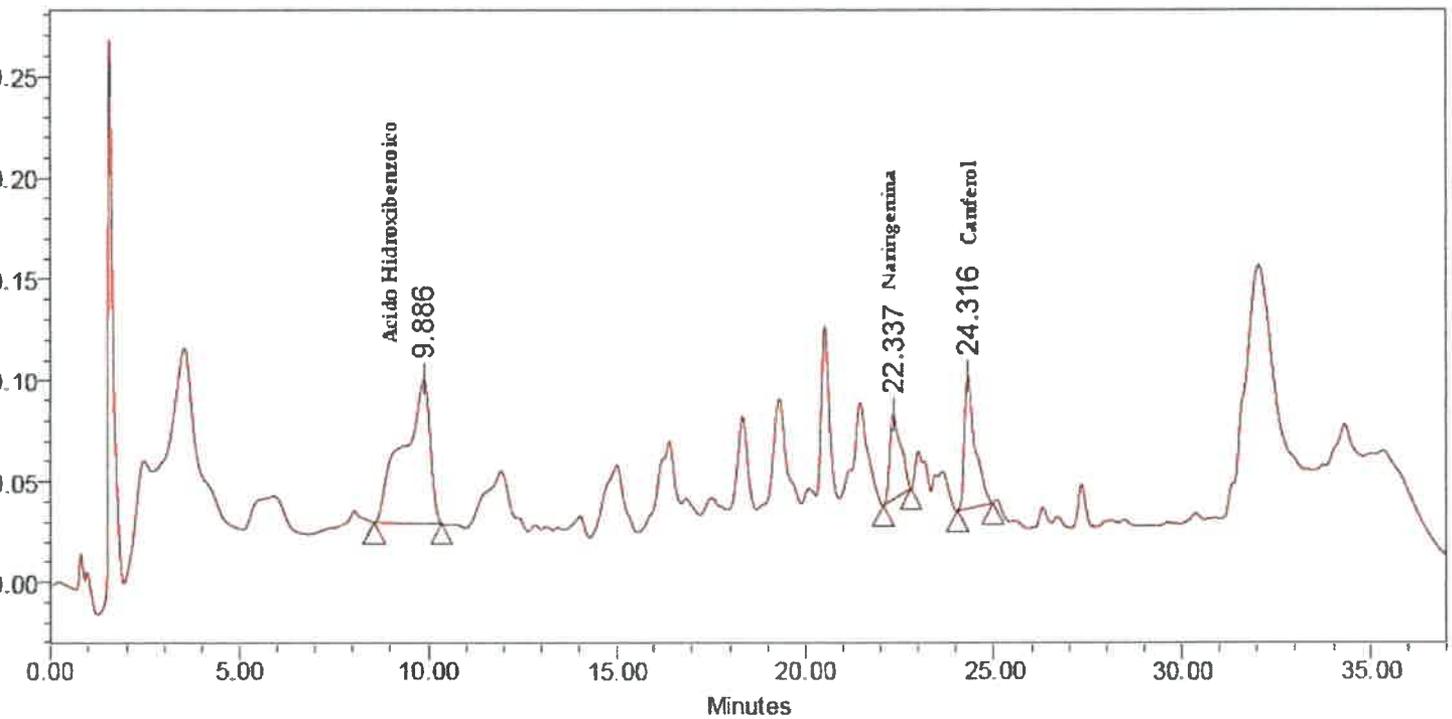
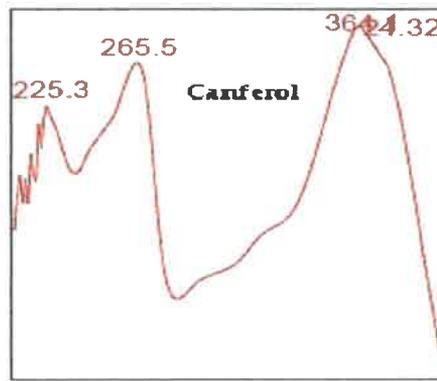
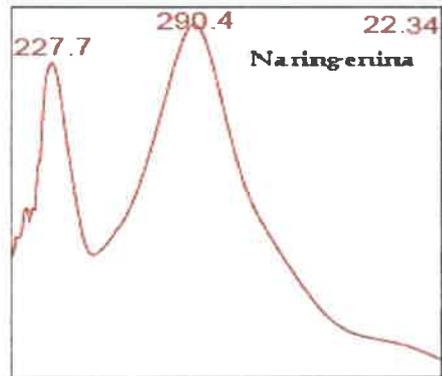
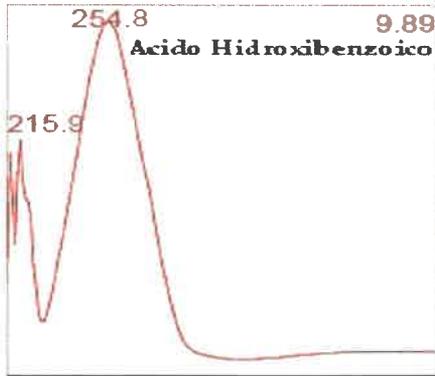


MUESTRA: Río IV 7- CODIGO: ABR 7 Eter



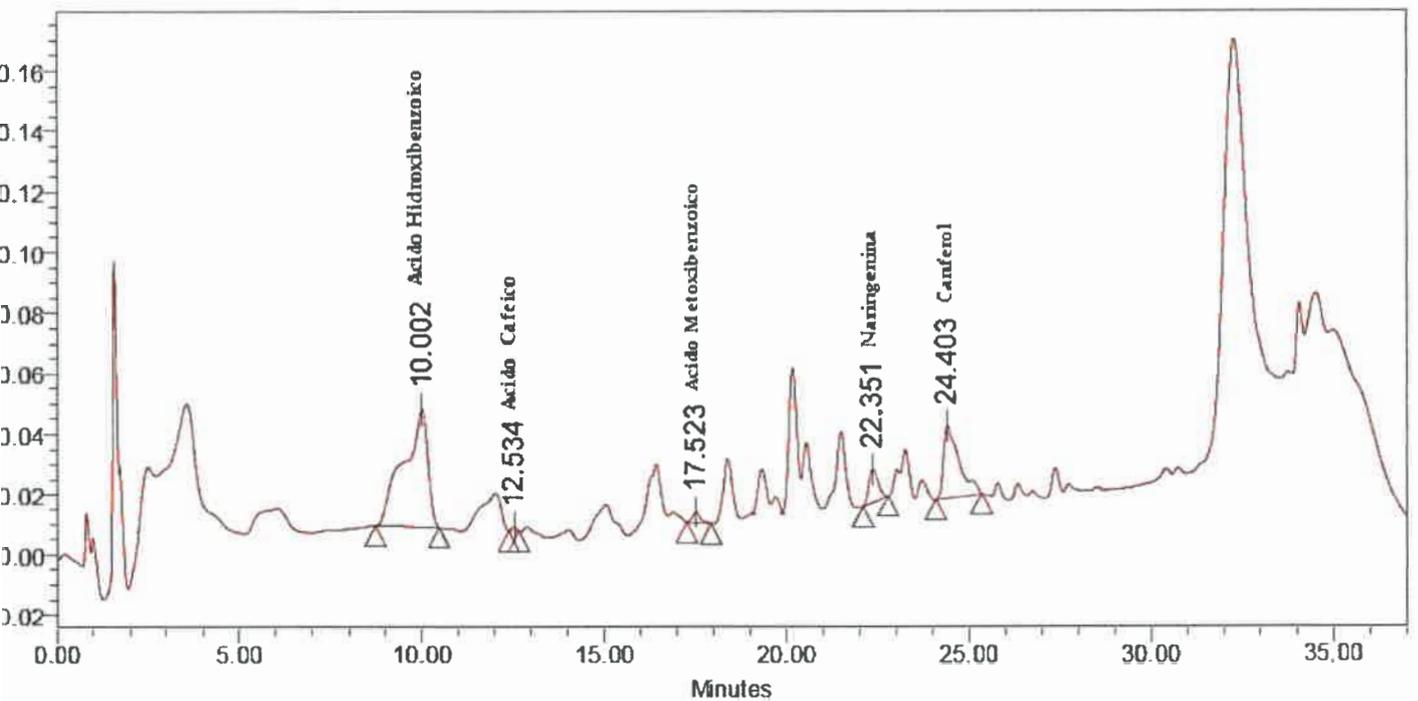
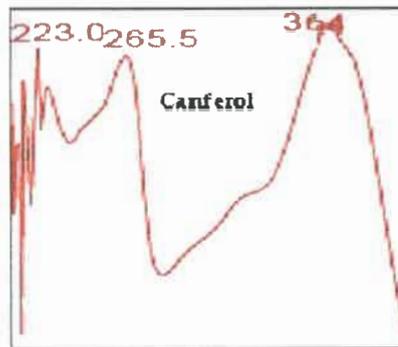
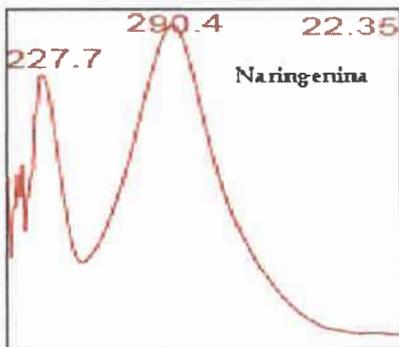
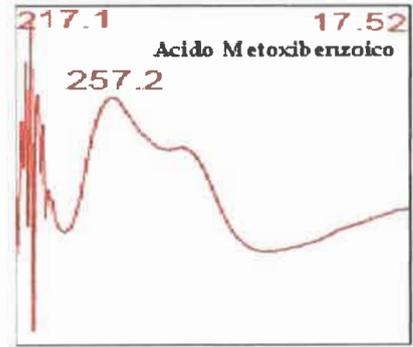
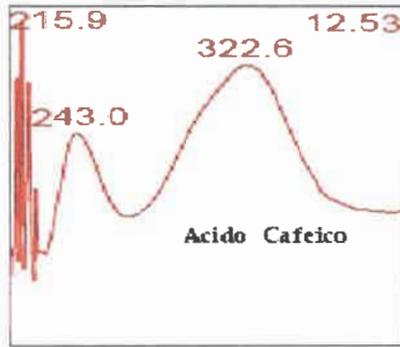
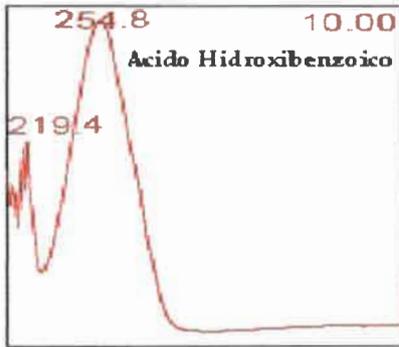


MUESTRA: Río IV 8- CODIGO: ABR 8 Acetato



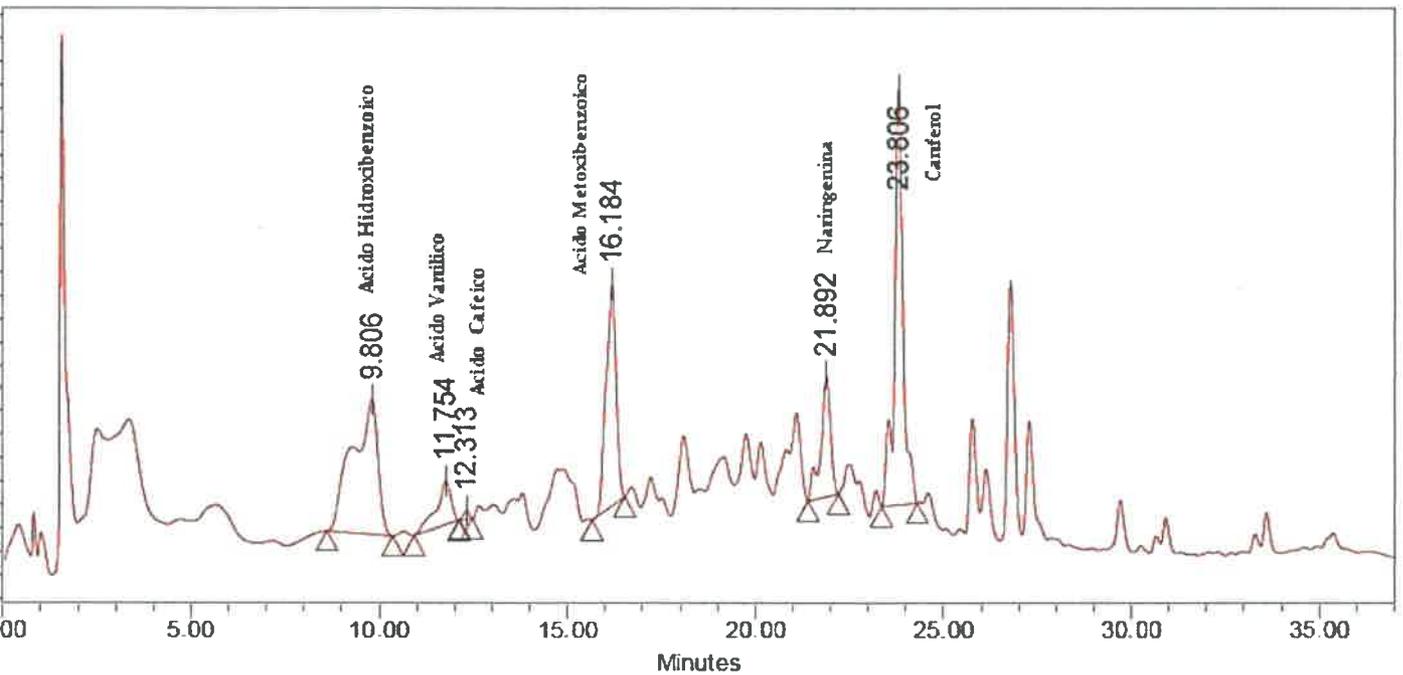
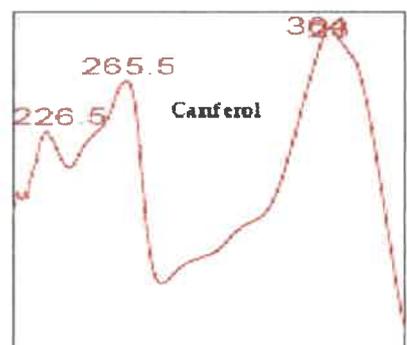
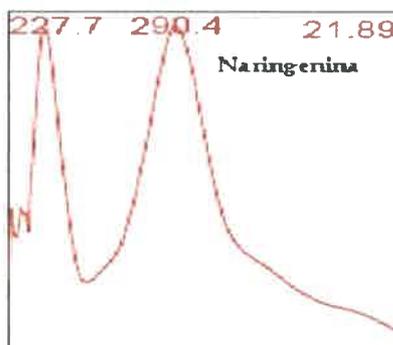
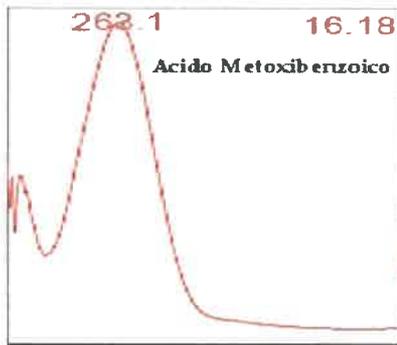
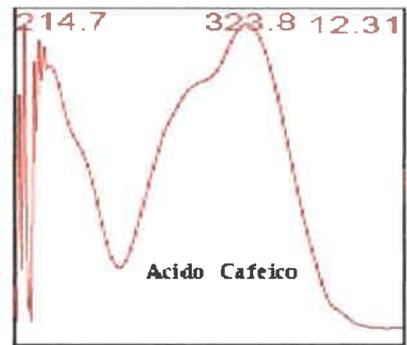
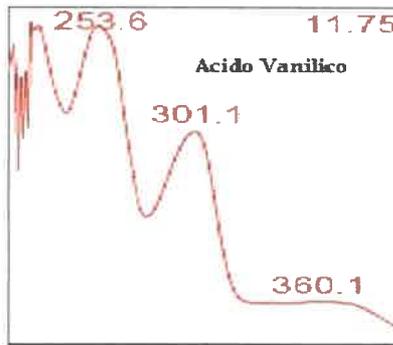
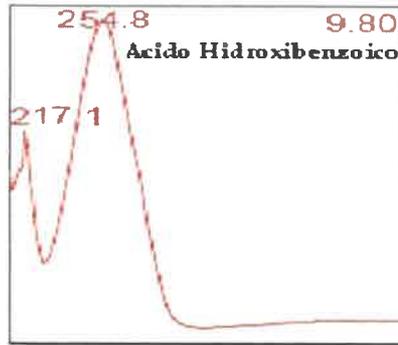


MUESTRA: Río IV 8- CODIGO: ABR 8 Eter



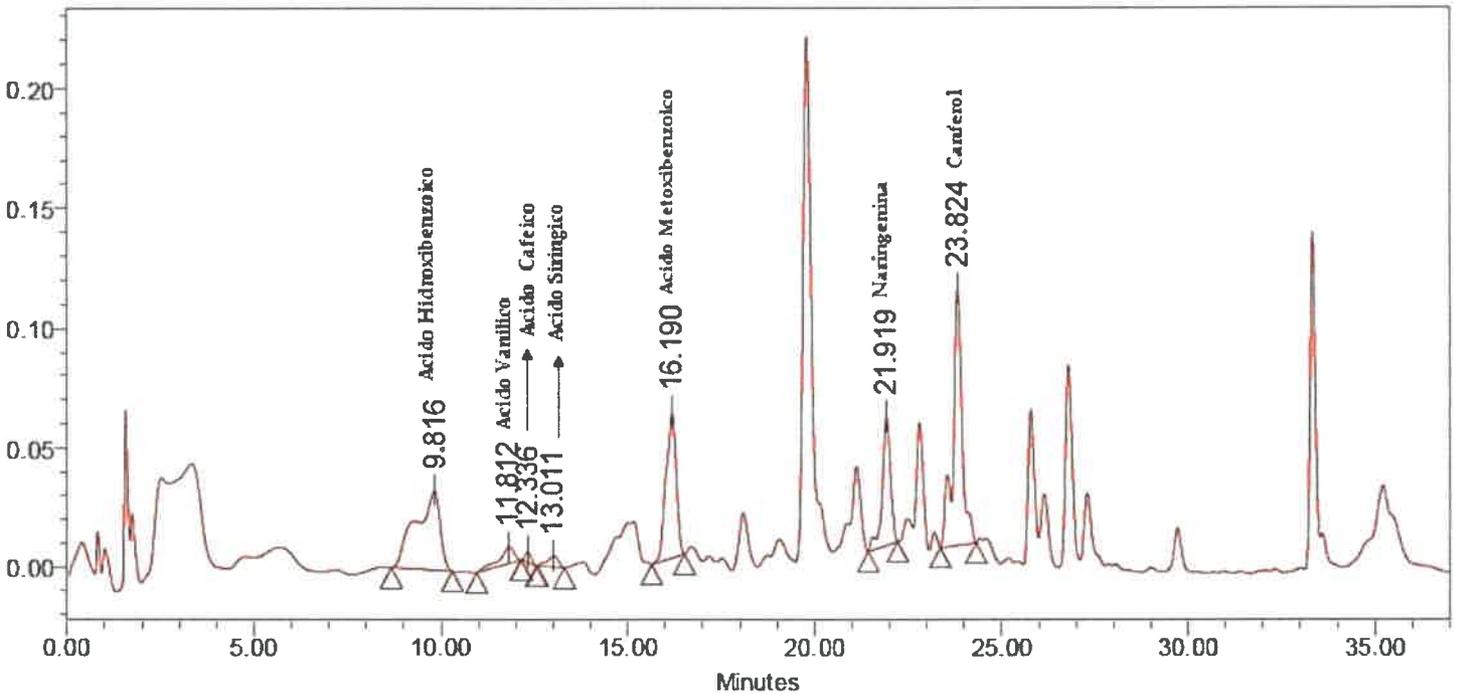
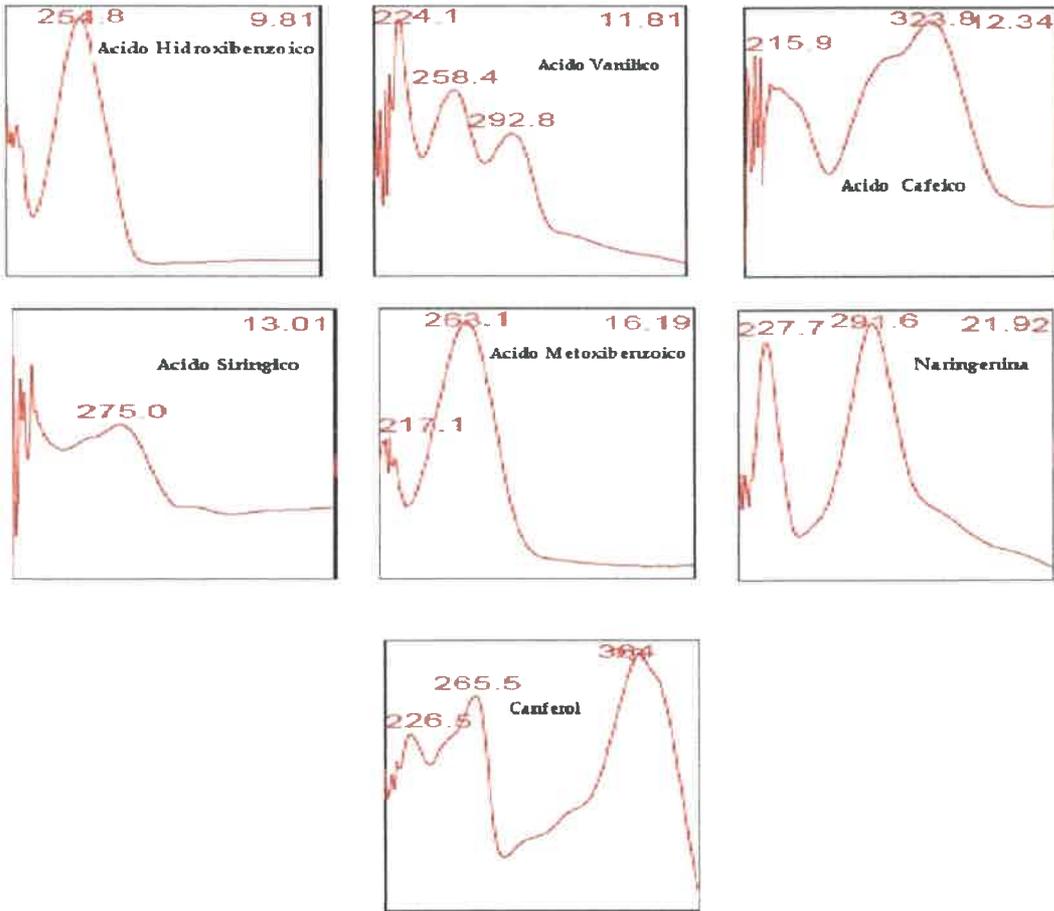


MUESTRA: Río IV 9- CODIGO: ABR 9 Acetato



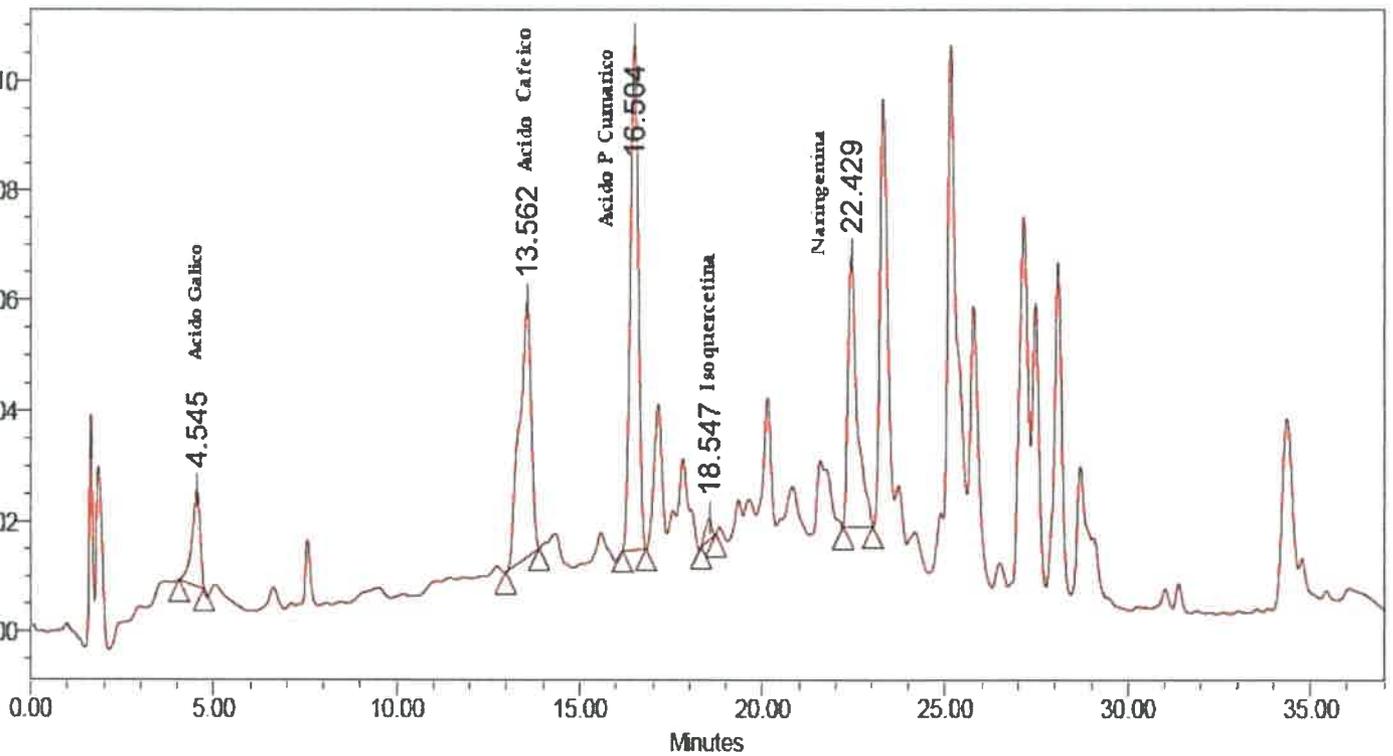
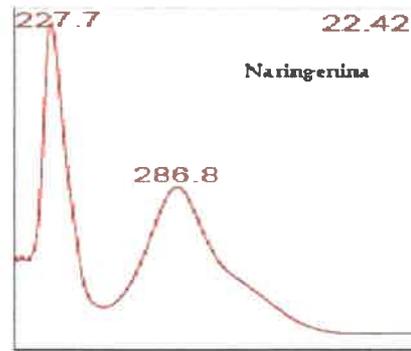
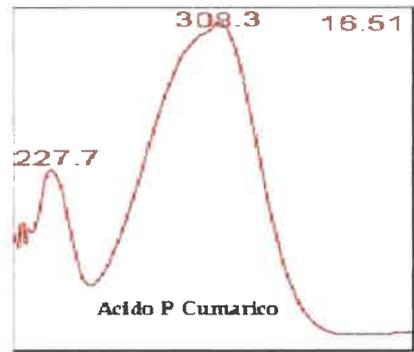
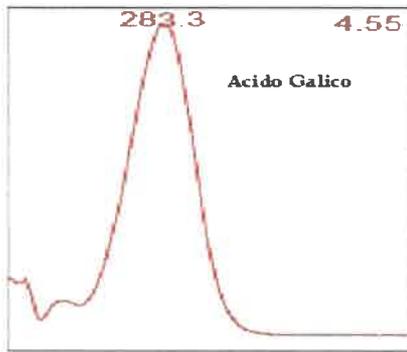


MUESTRA: Río IV 9- CODIGO: ABR 9 Eter



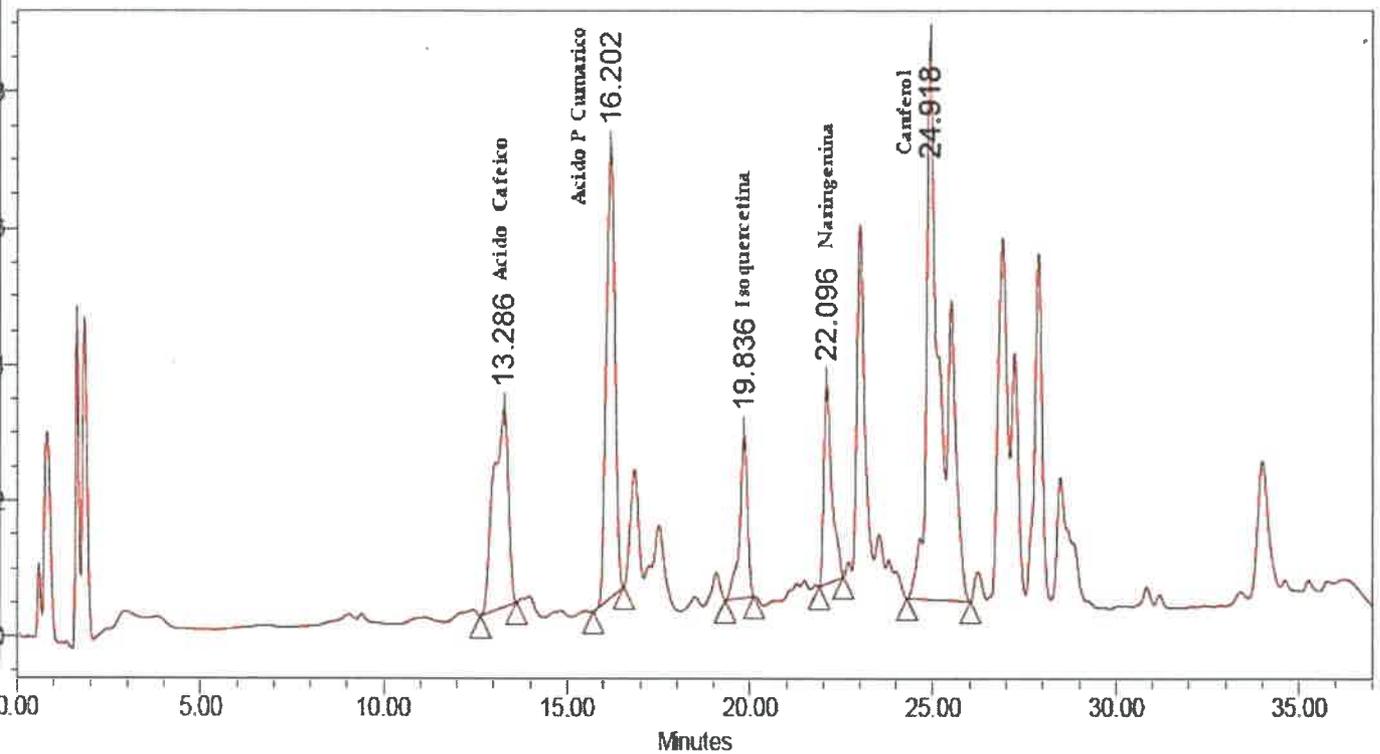
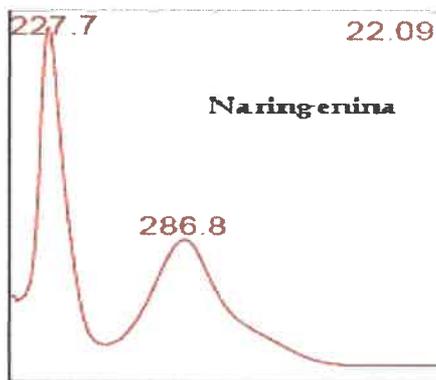
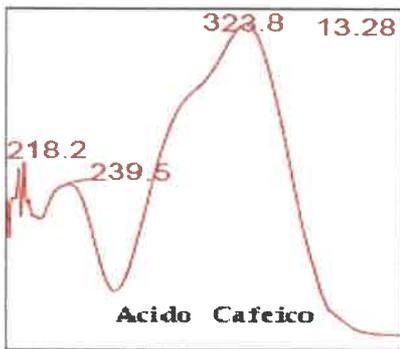


MUESTRA: Río IV 24- CODIGO: ABR 24 Acetato



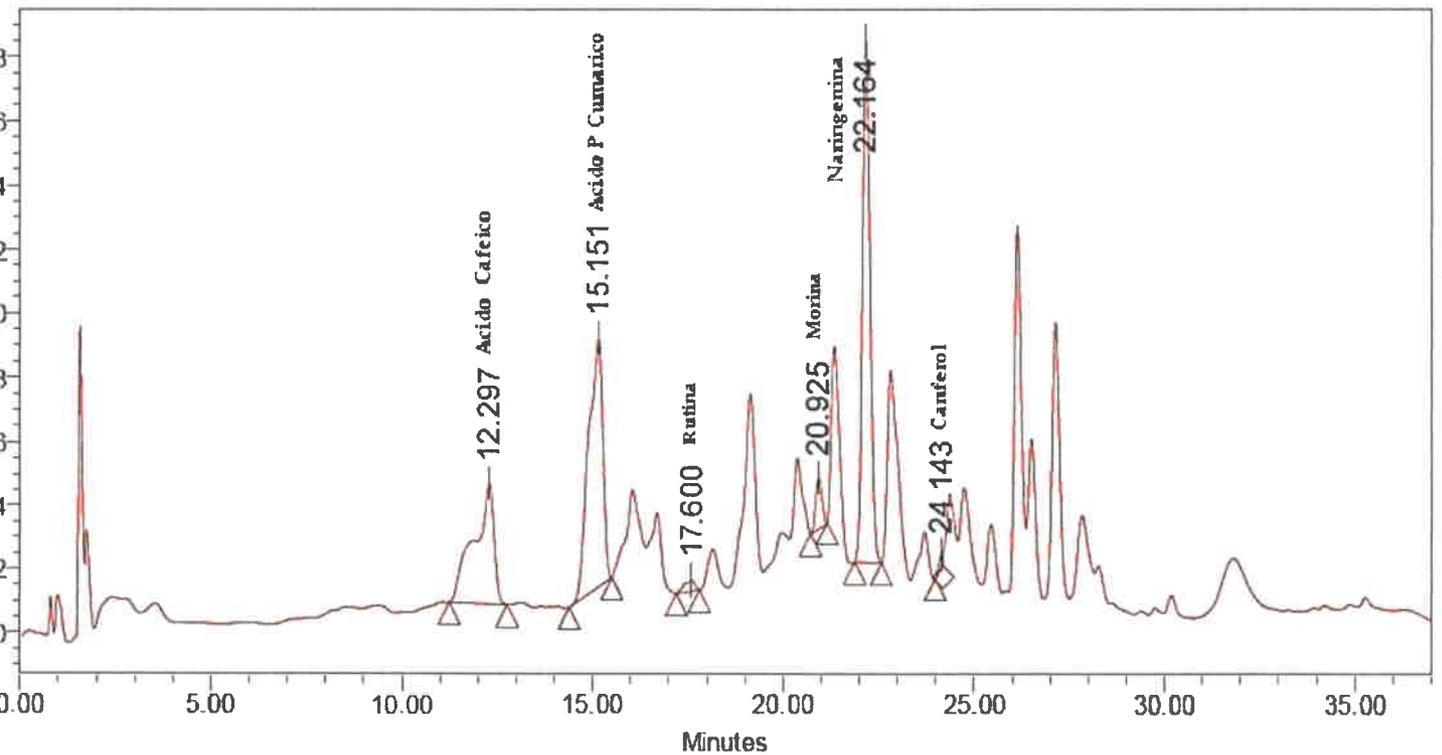
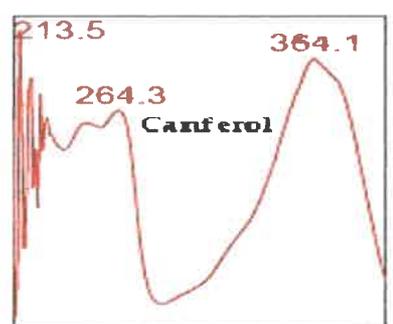
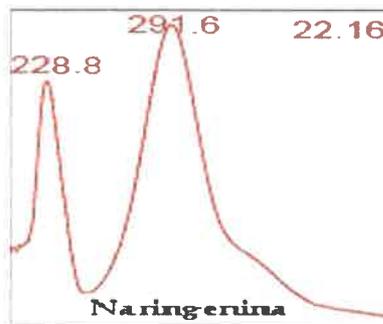
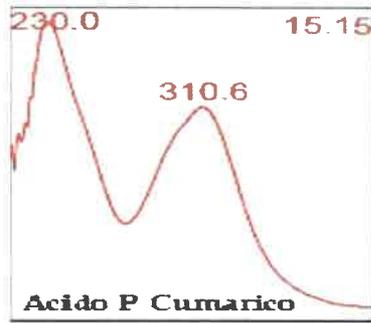
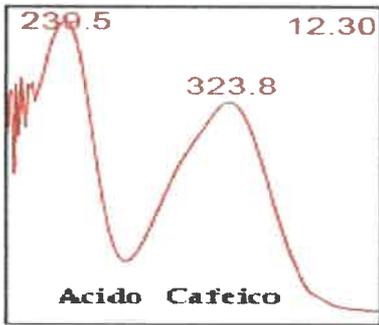


MUESTRA: Río IV 24- CODIGO: AB R 24 Eter



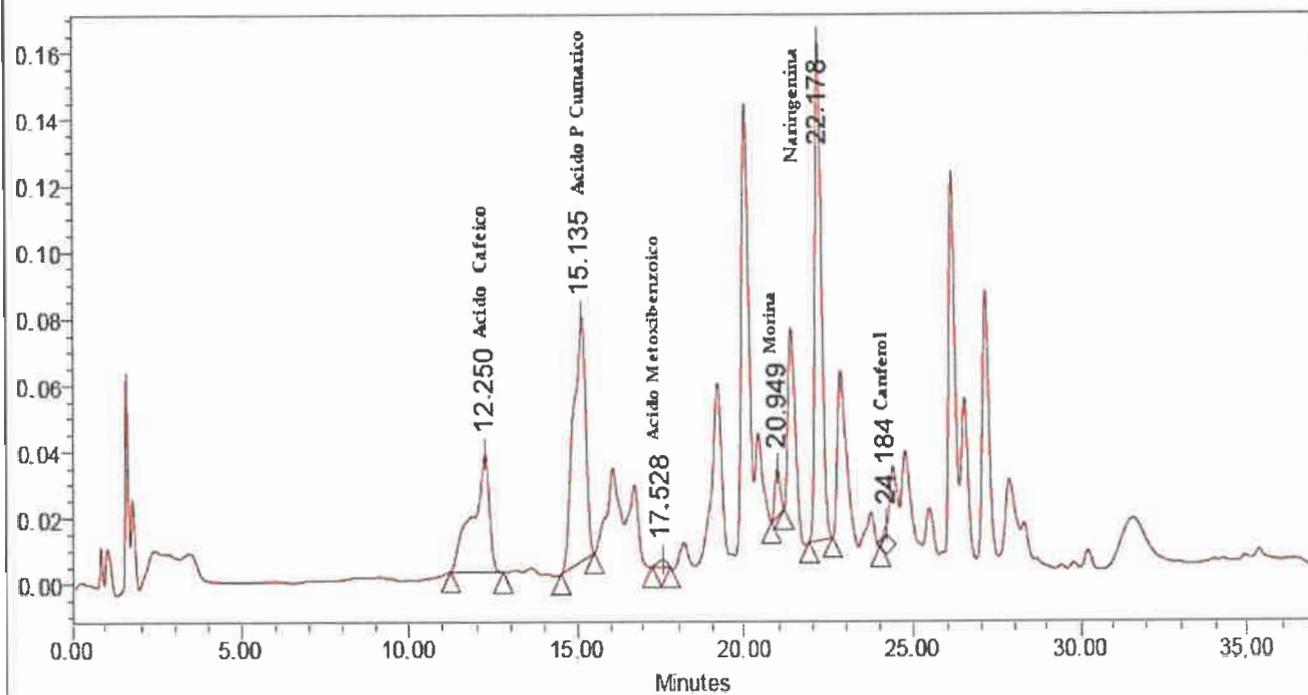
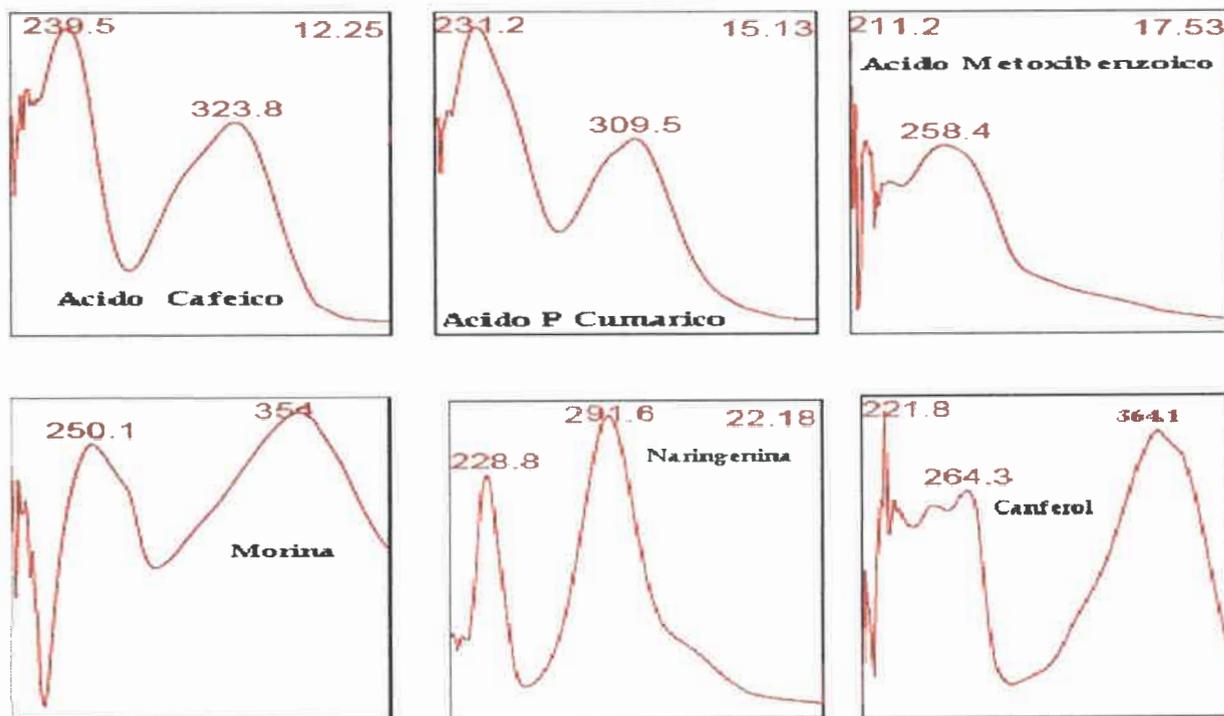


MUESTRA: Higueras- CODIGO: ABHI Acetato



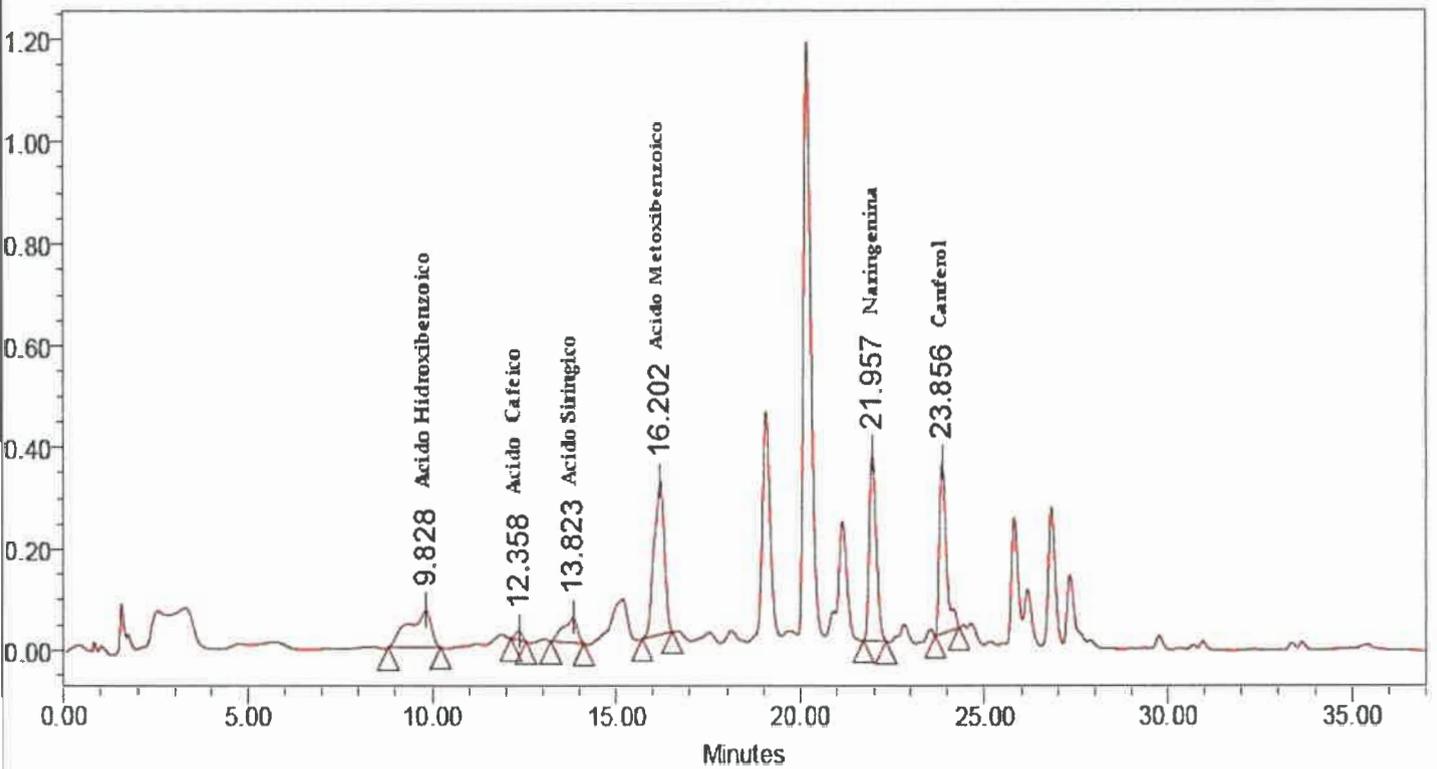
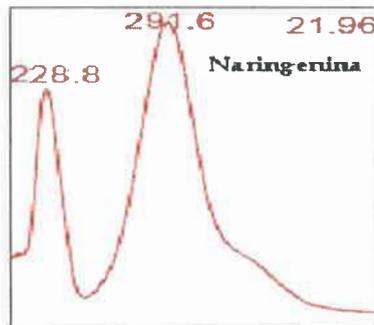
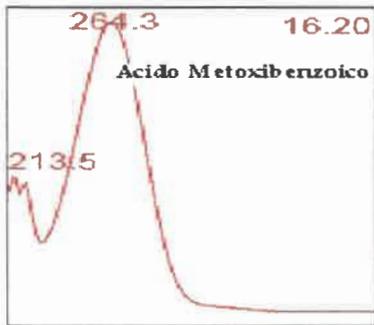
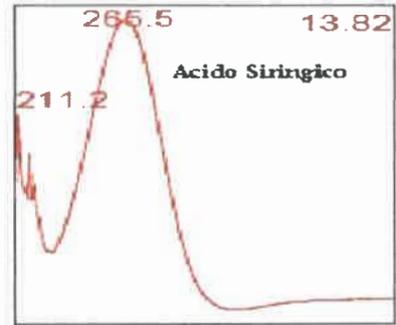
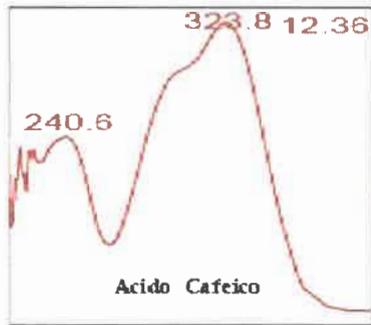
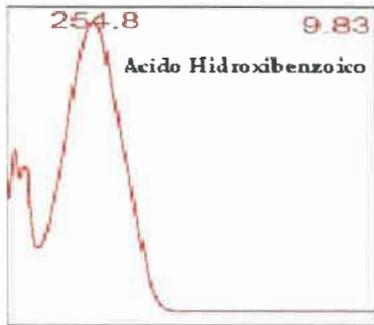


MUESTRA: Higueras- CODIGO: ABHI Eter



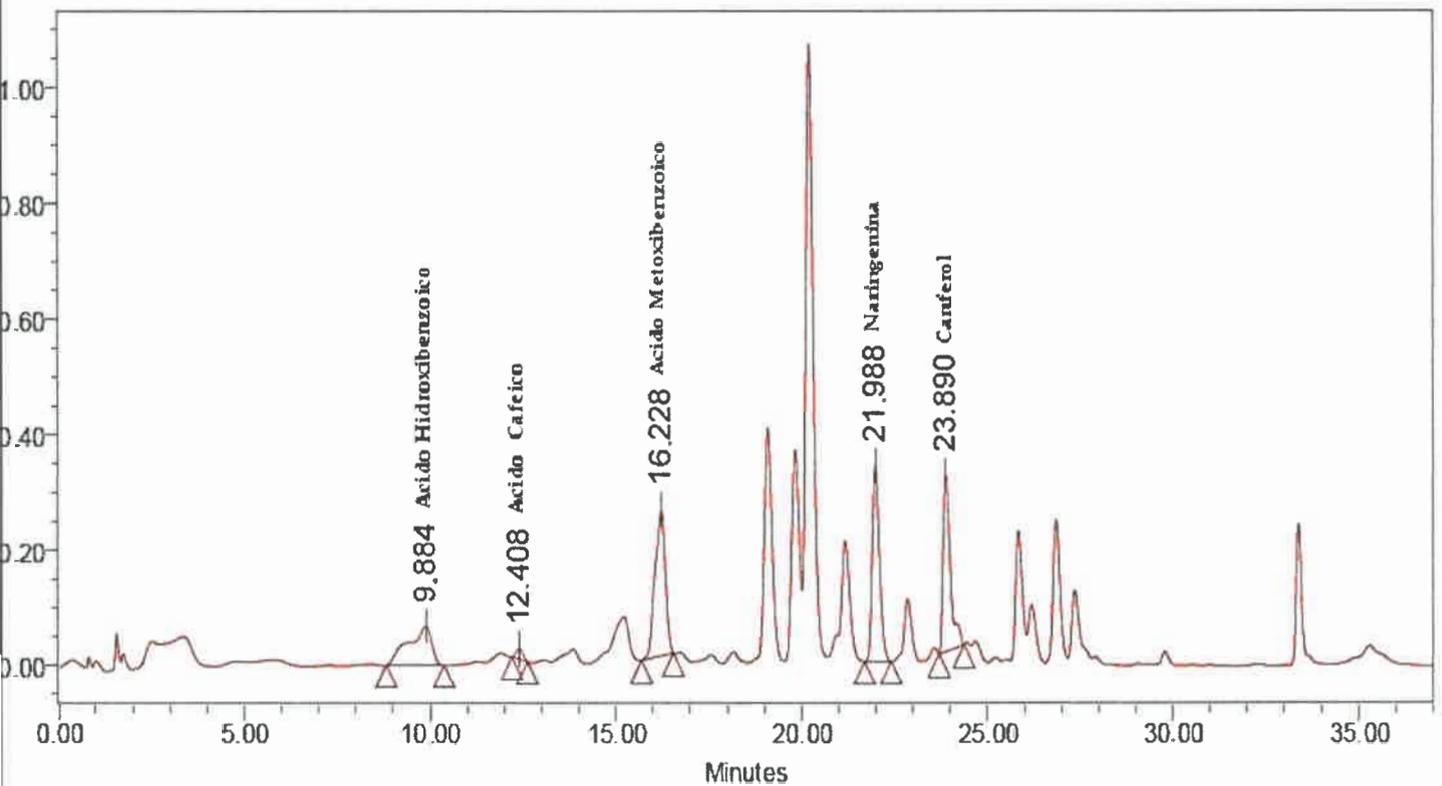
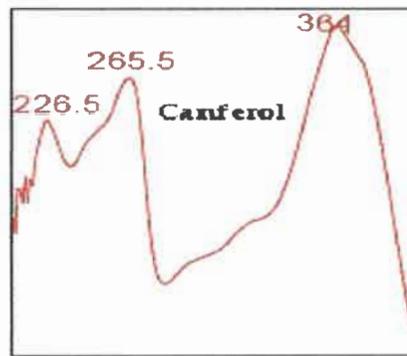
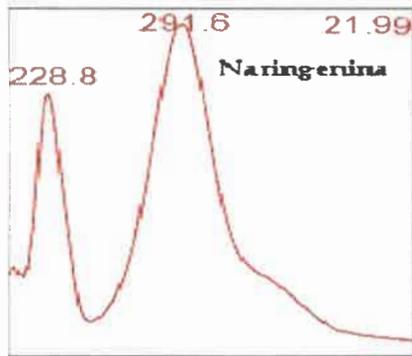
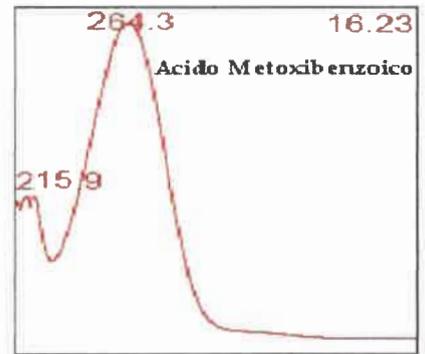
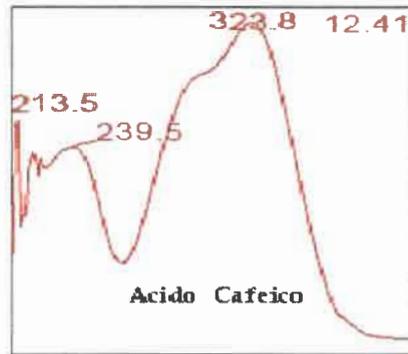
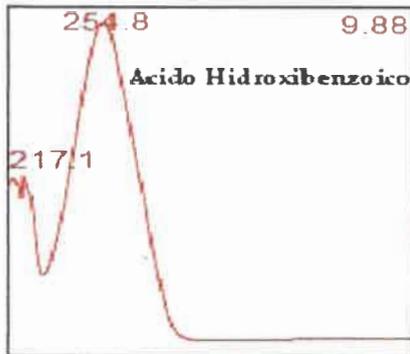


MUESTRA: Chucul- CODIGO: ABCHU Acetato



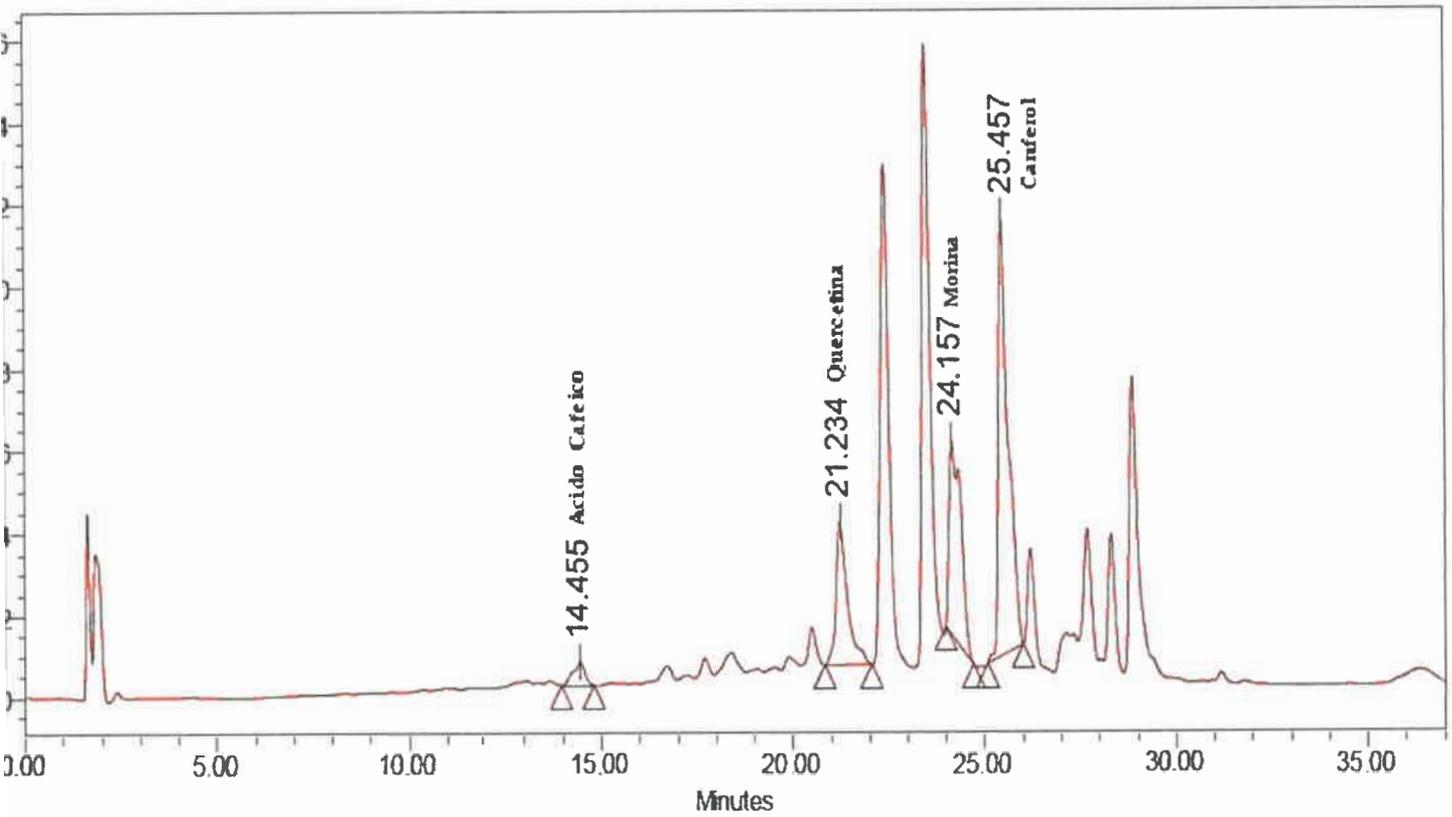
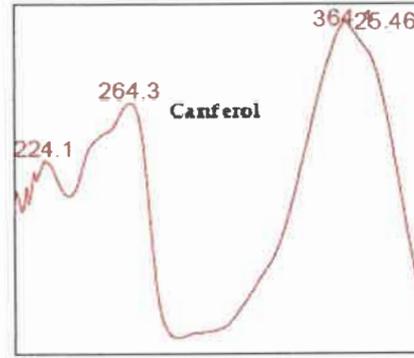
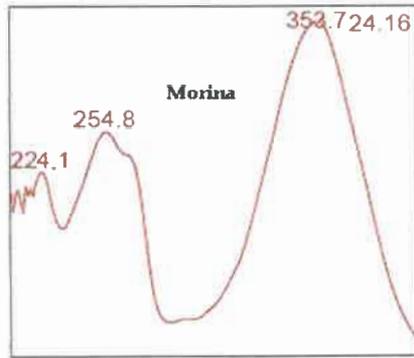
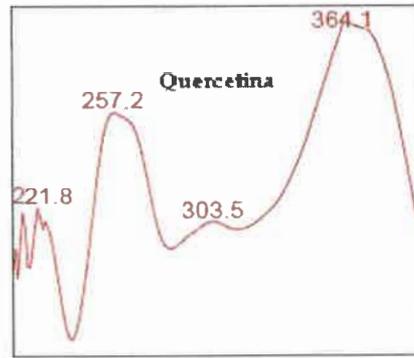
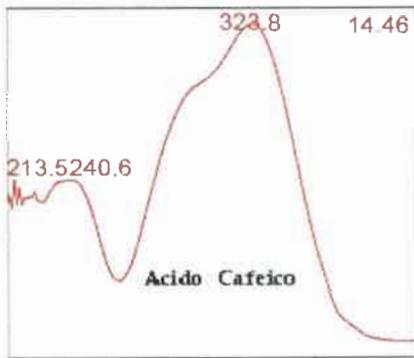


MUESTRA: Chucul- CODIGO: ABCHU Eter



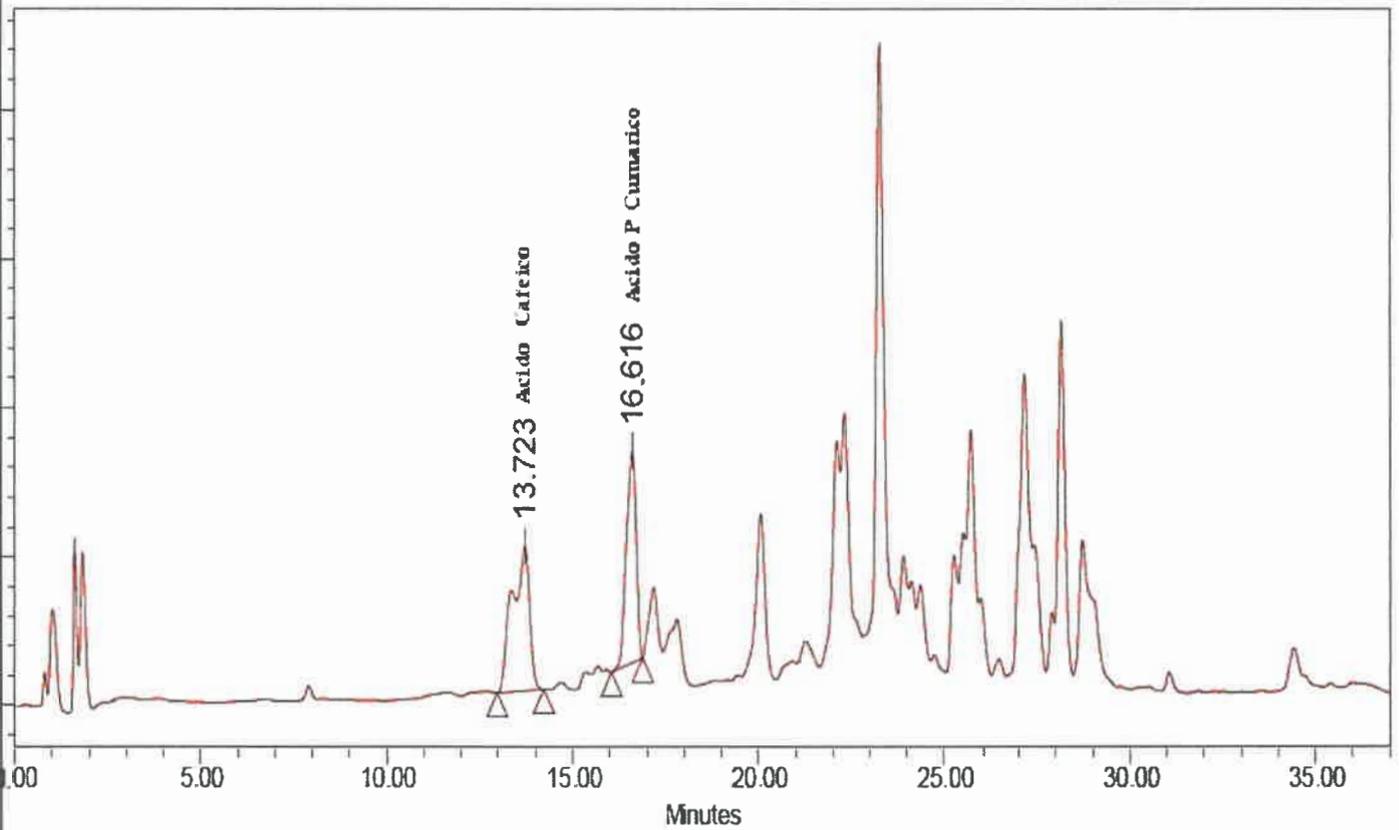
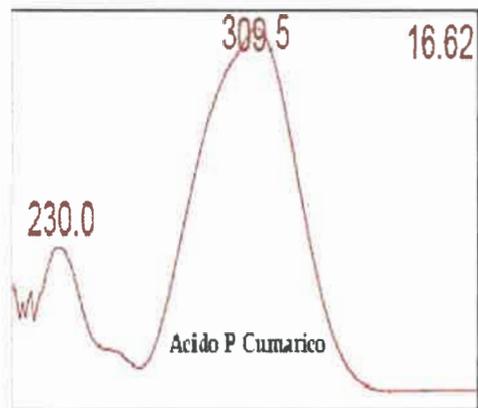
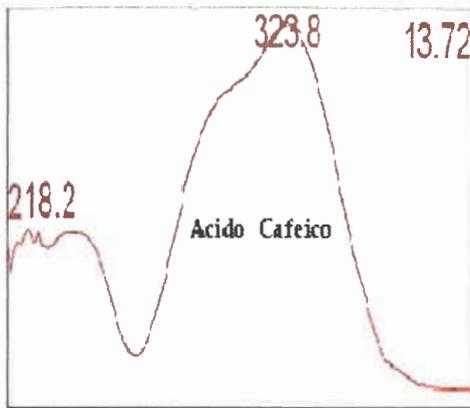


MUESTRA: La Carlota- CODIGO: ABC 1 Acetato



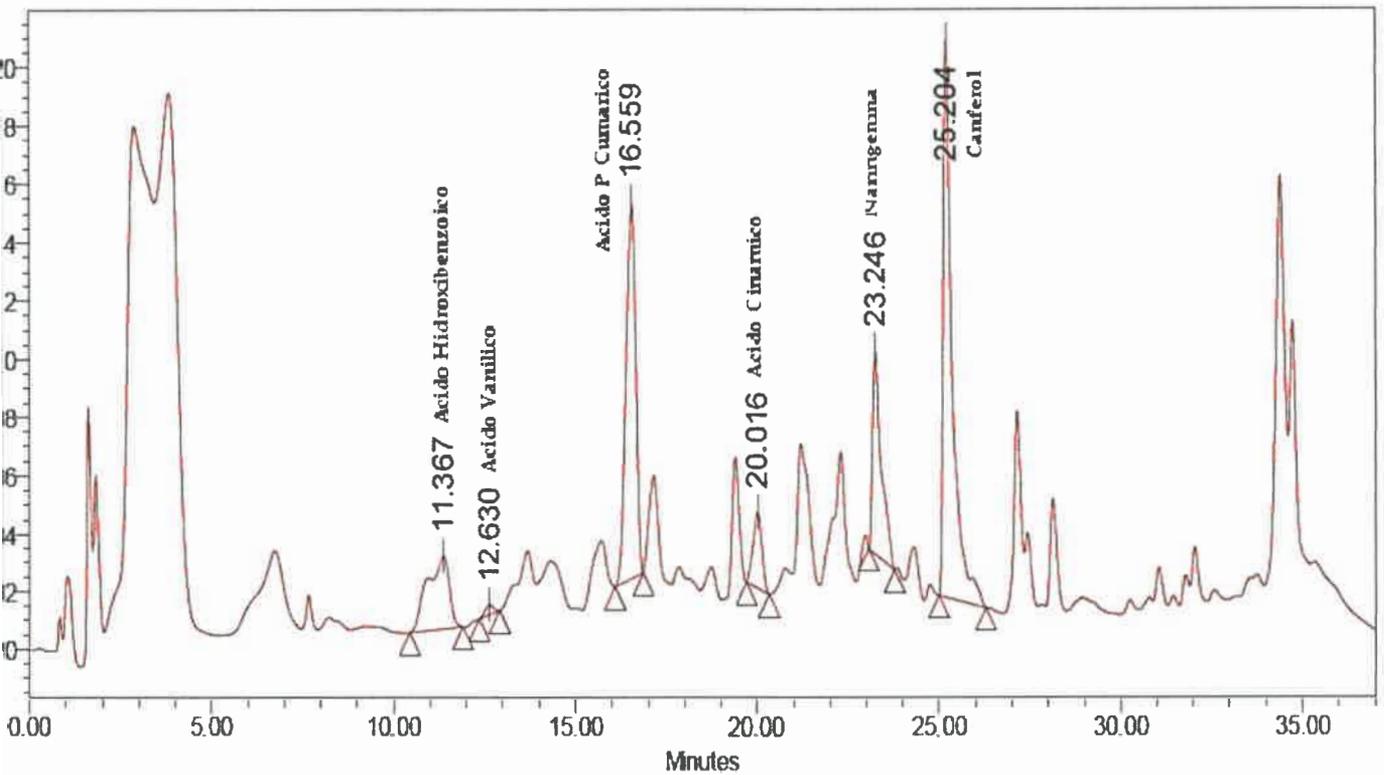
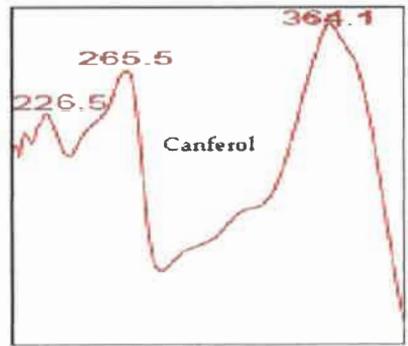
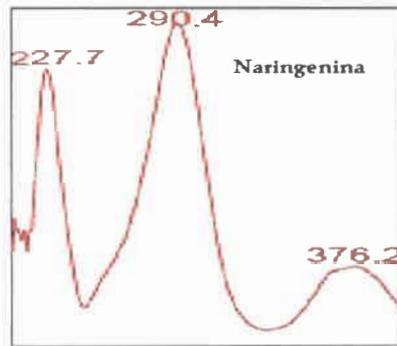
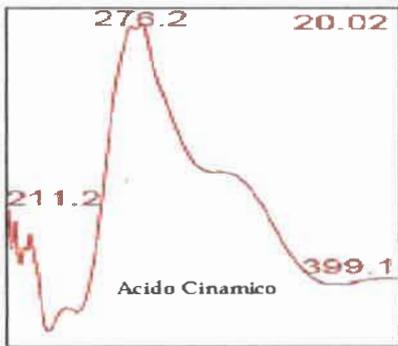
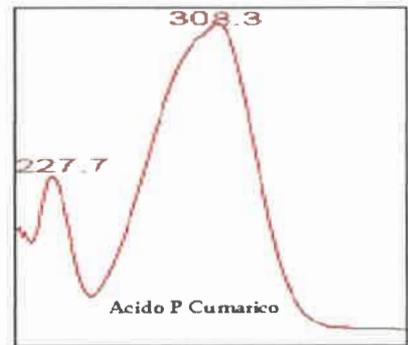
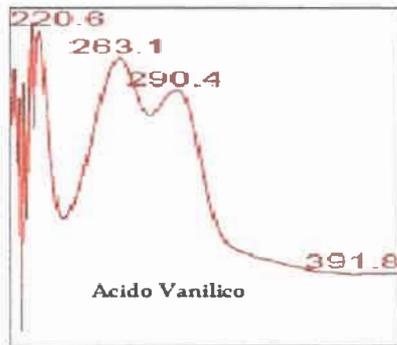
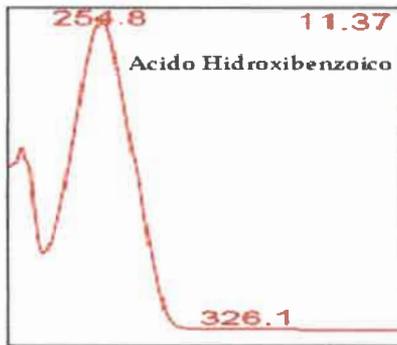


MUESTRA: La Carlota- CODIGO: ABC 1 Eter



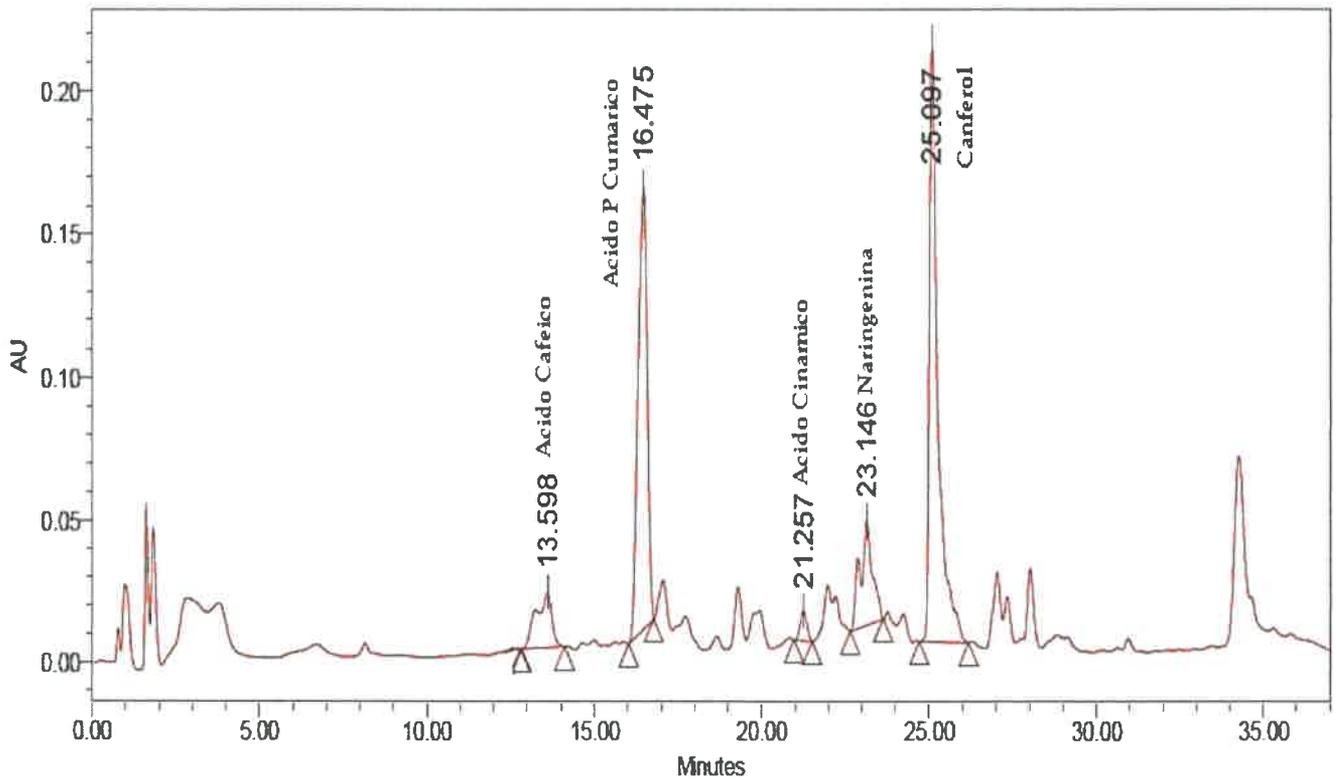
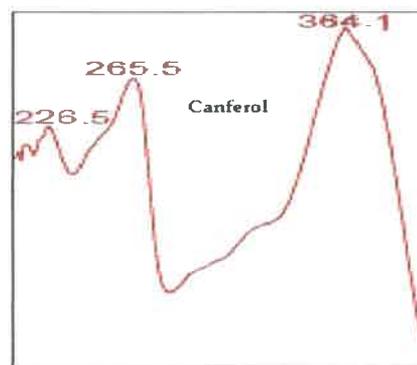
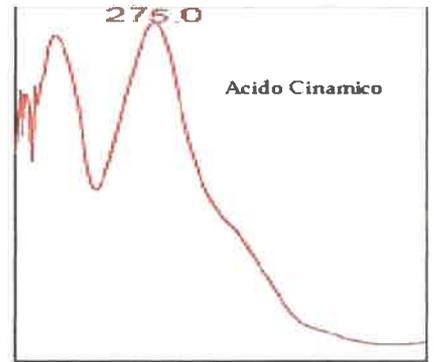
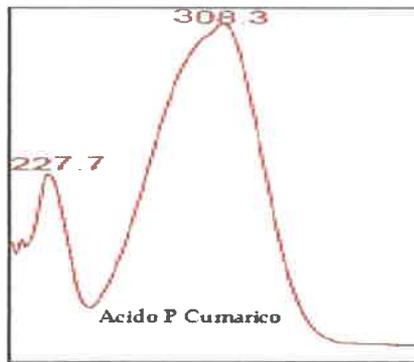
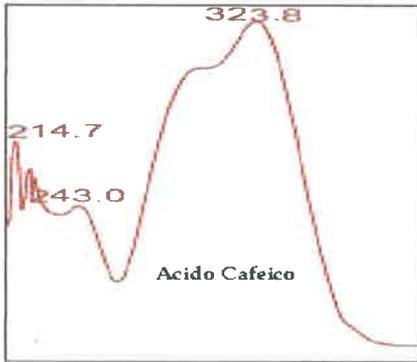


MUESTRA: La Carlota- CODIGO: ABC 2 Acetato



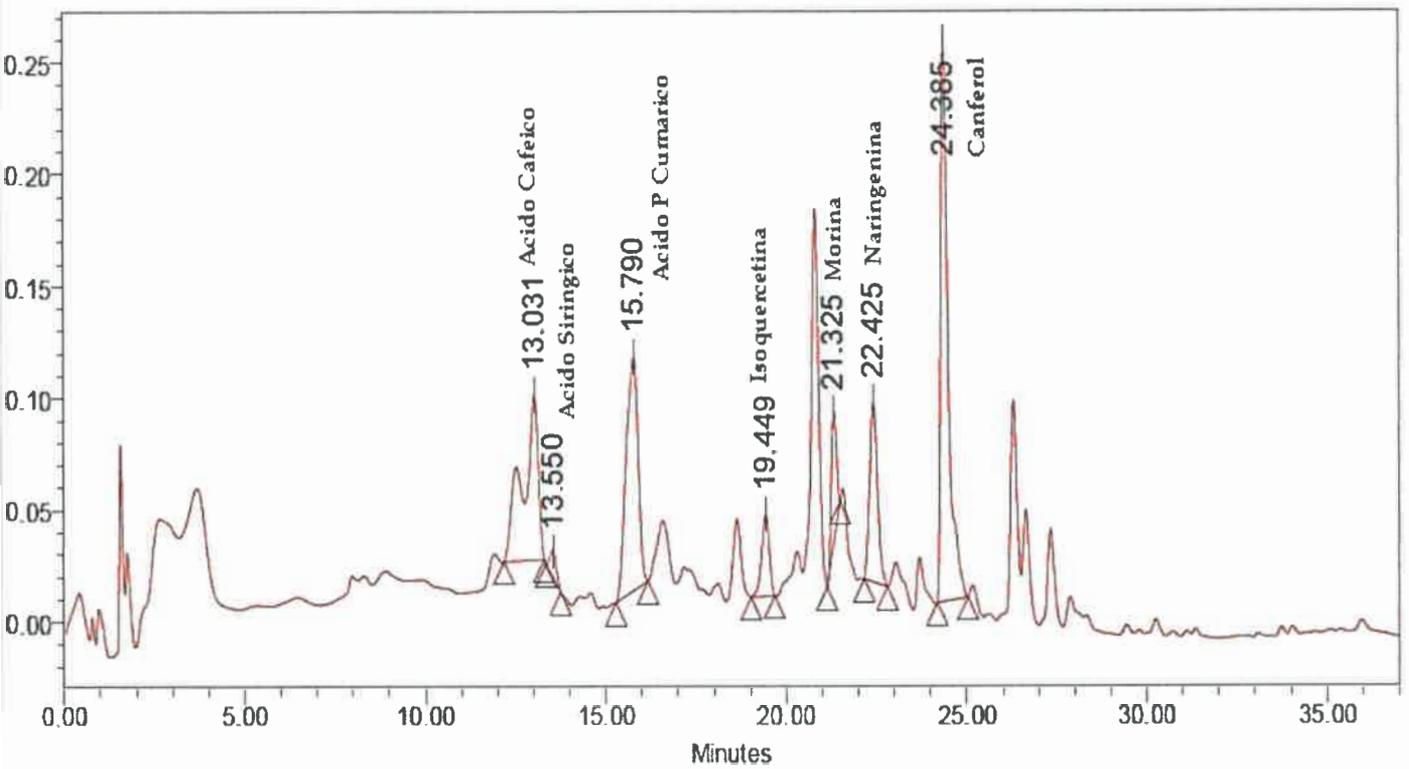
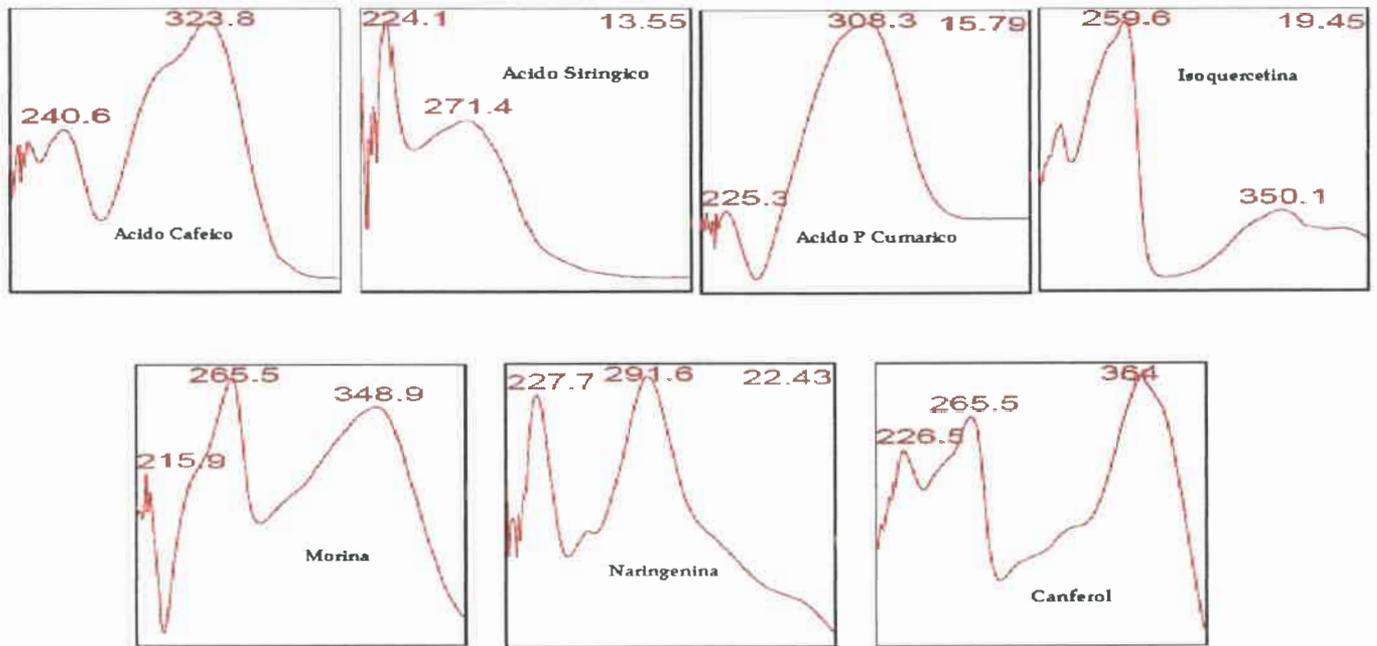


MUESTRA: La Carlota- CODIGO: ABC 2 Eter



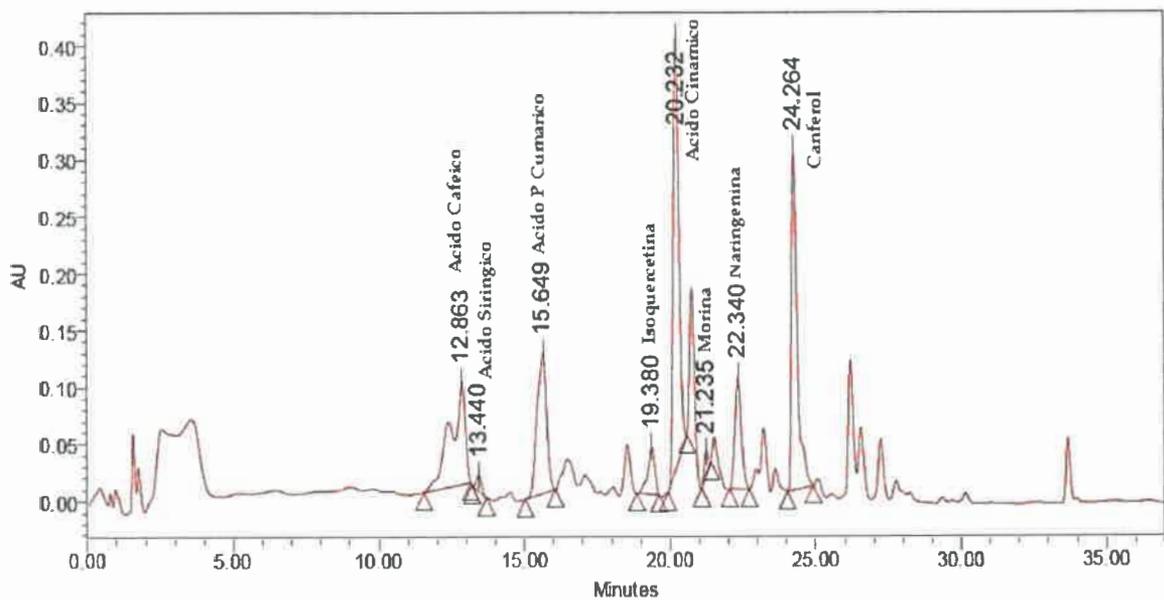
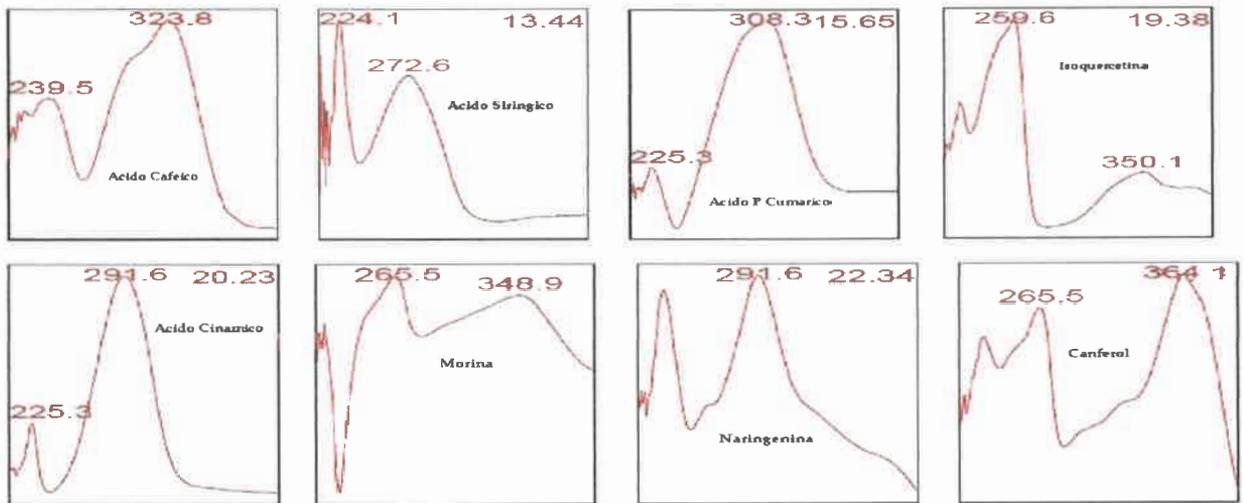


MUESTRA: Duarte I- CODIGO: ABAP I Acetato



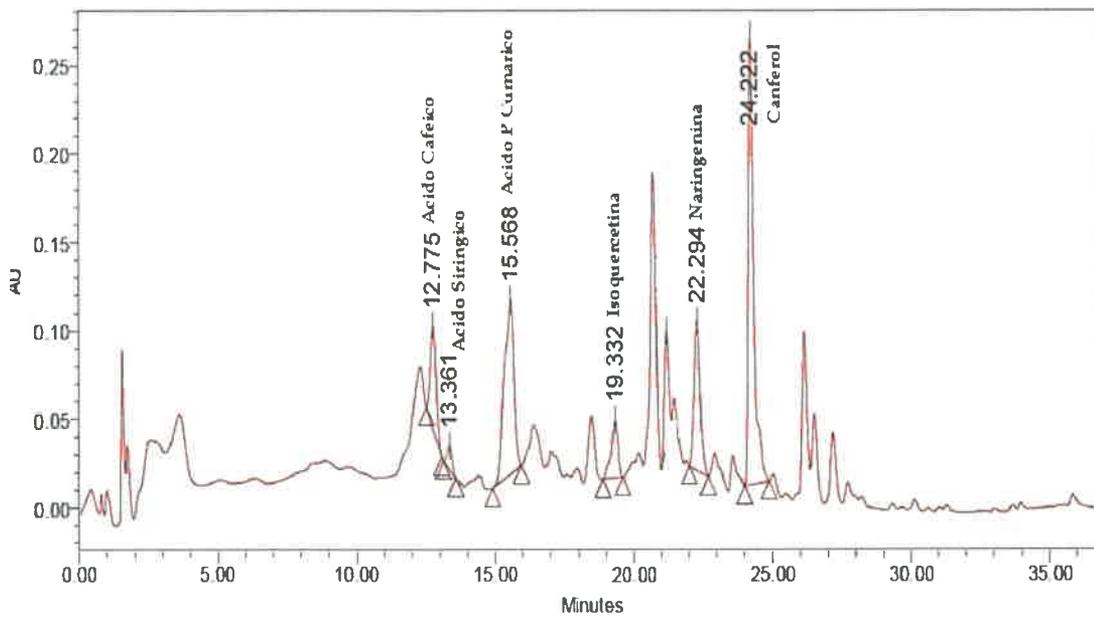
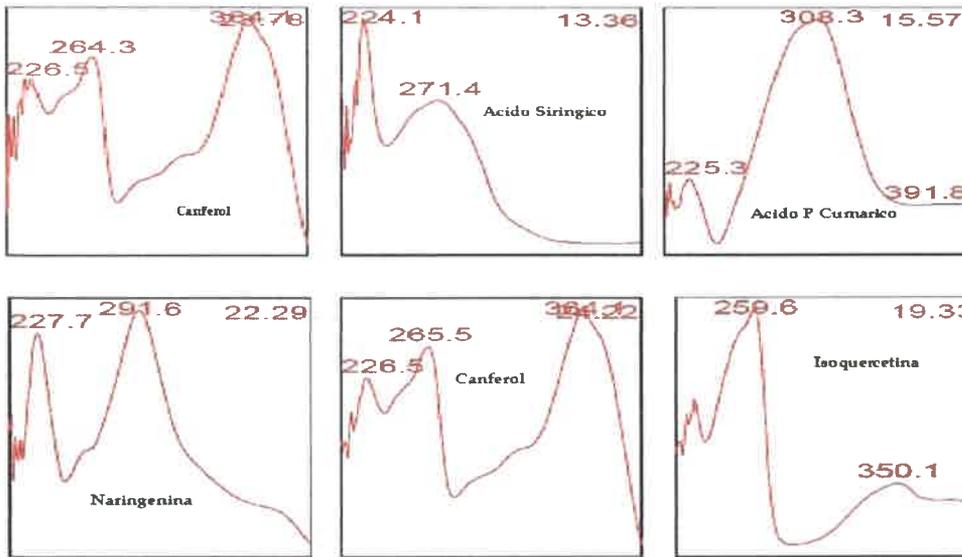


MUESTRA: Duarte 1- CODIGO: ABAP 1 Eter



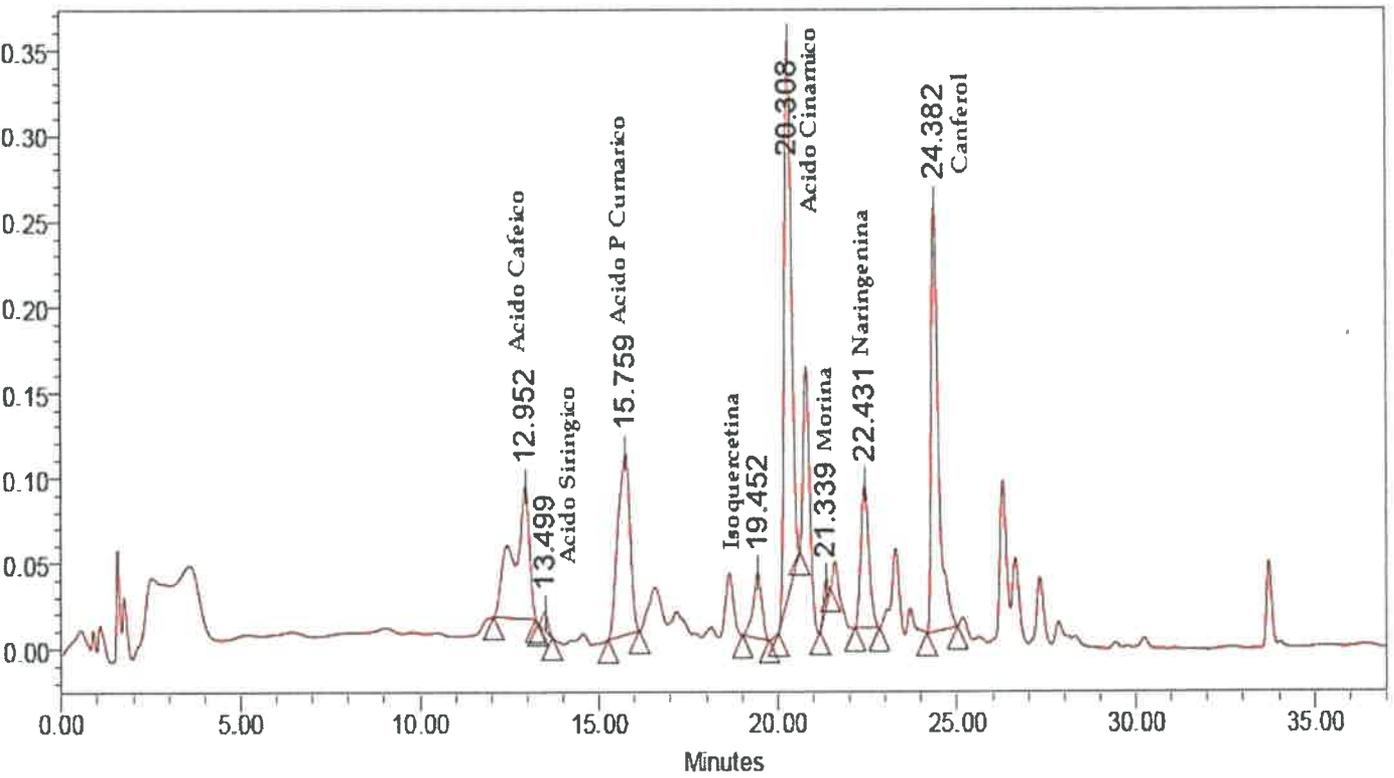
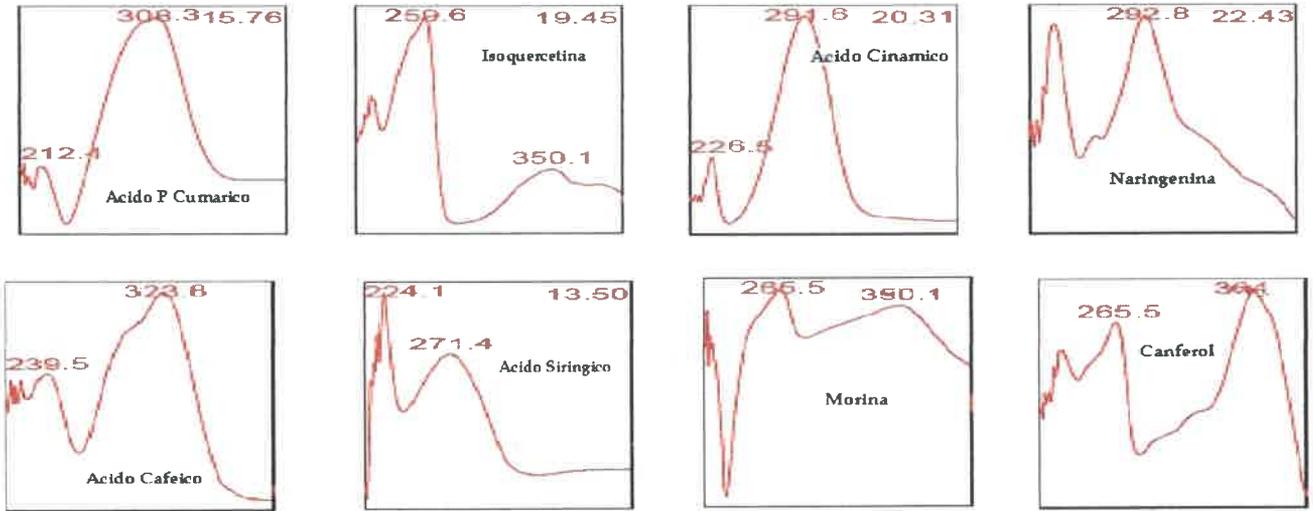


MUESTRA: Duarte 2- CODIGO: ABAP 2 Acetato



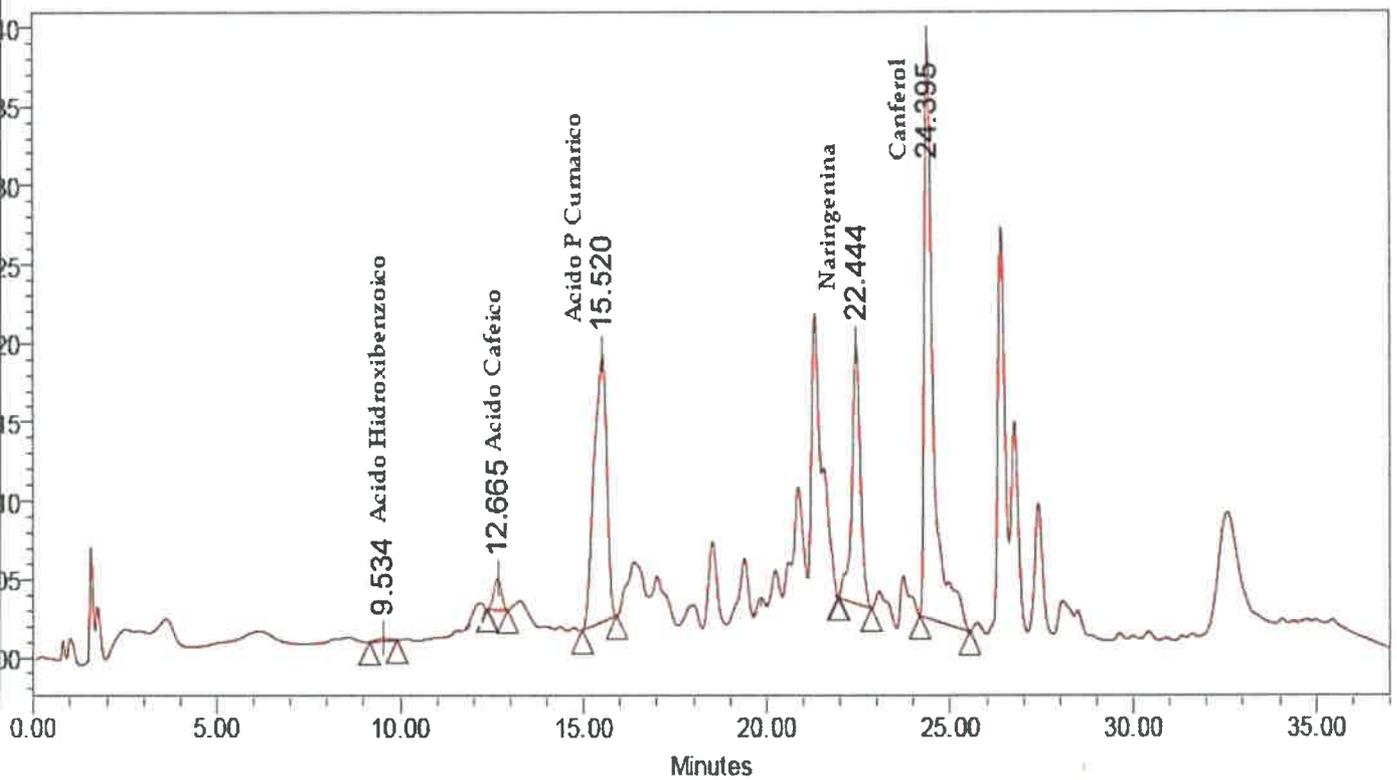
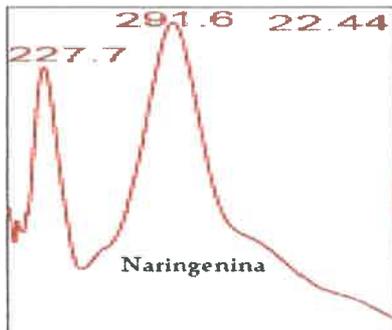
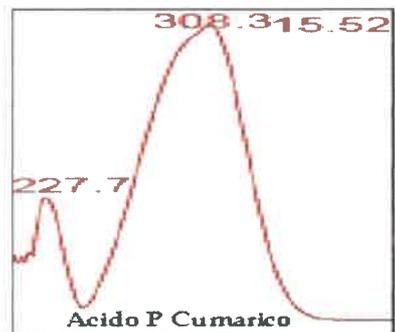
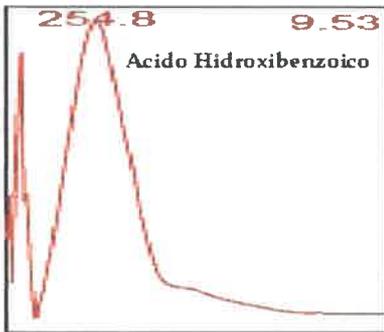


MUESTRA: Duarte 2- CODIGO: ABAP 2 Eter



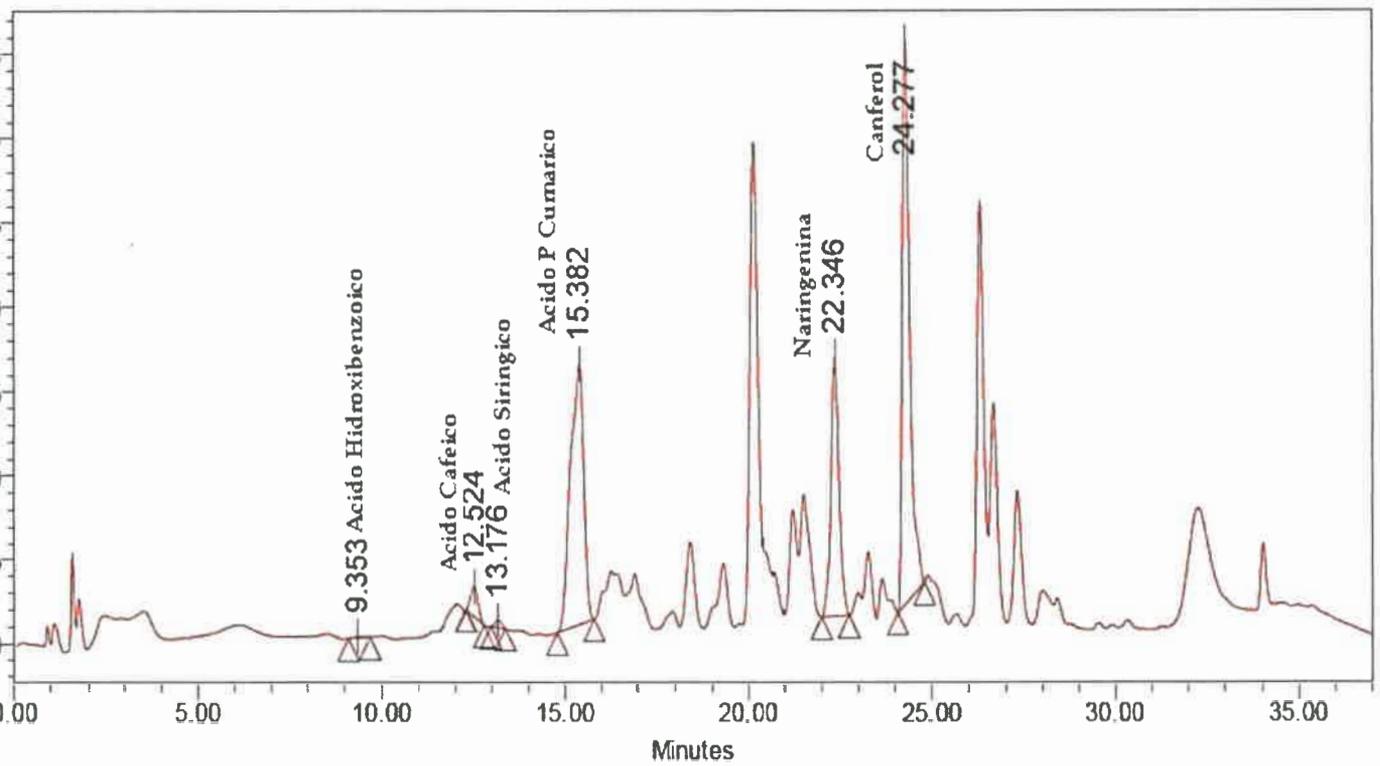
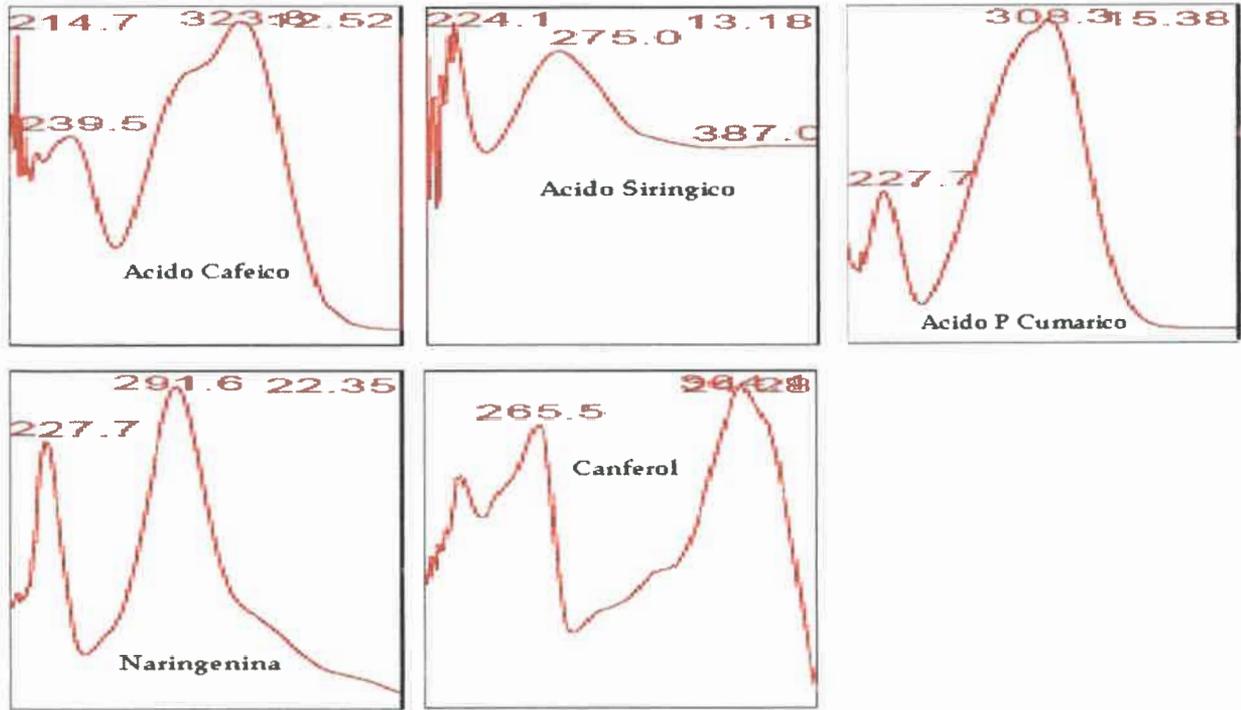


MUESTRA: Trotta- CODIGO: ABAP 3 Acetato



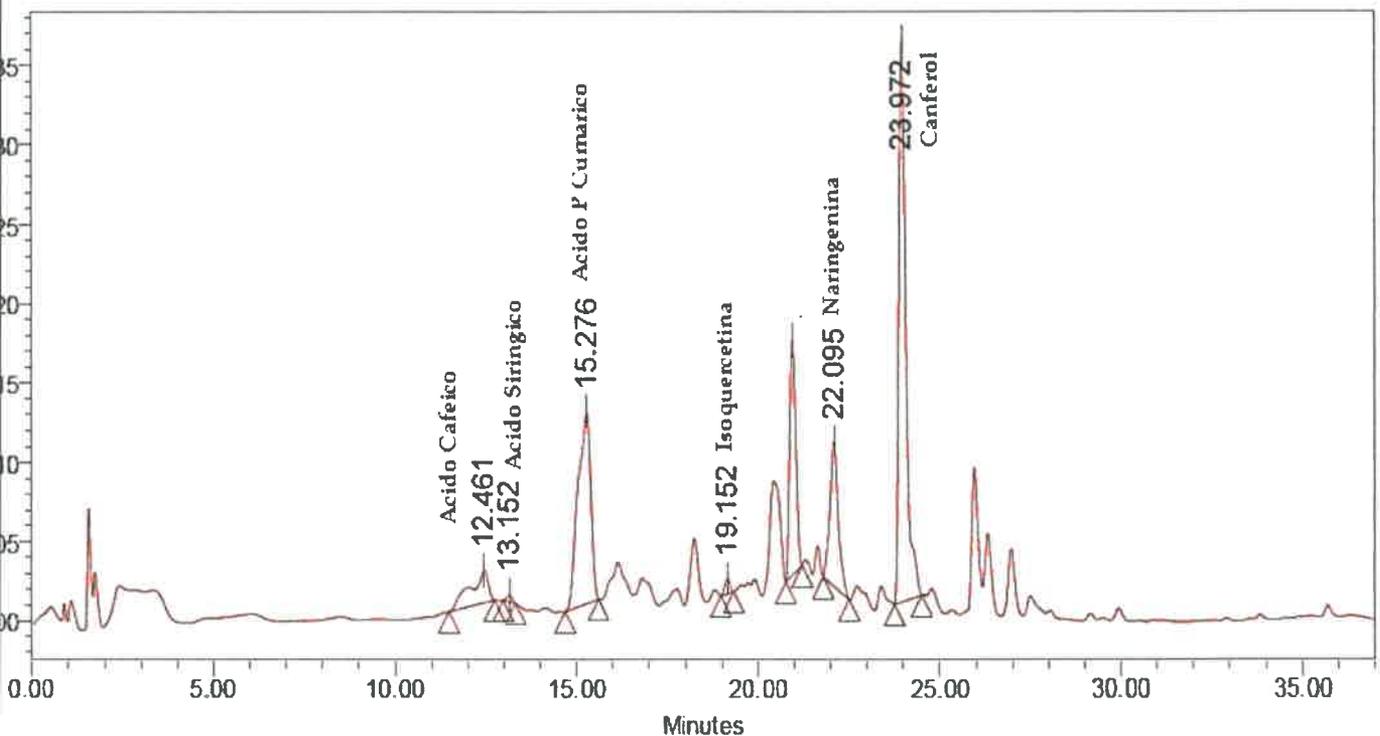
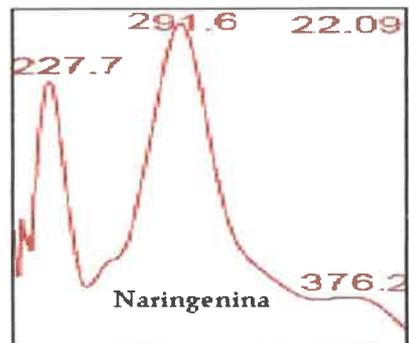
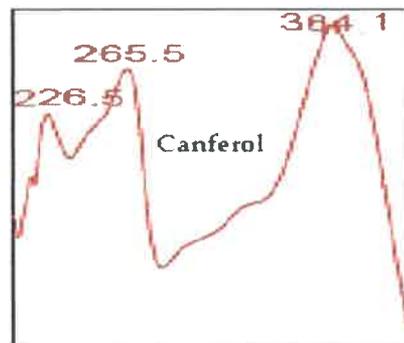
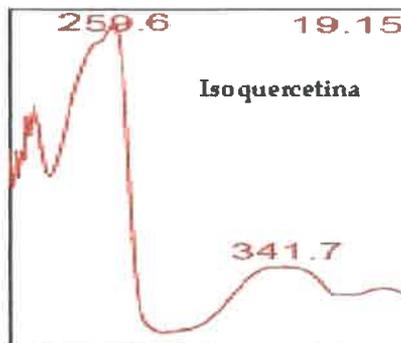
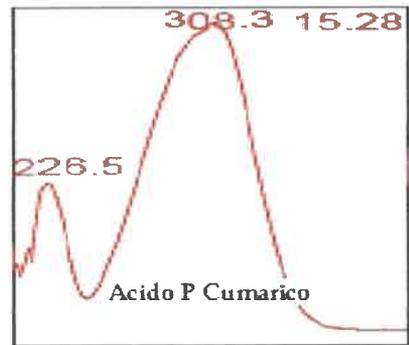
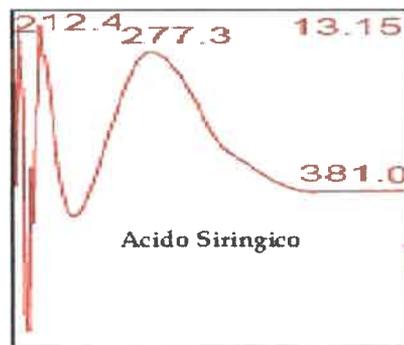
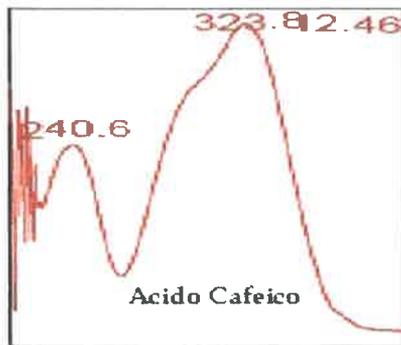


MUESTRA: Trotta- CODIGO: ABAP 3 Eter



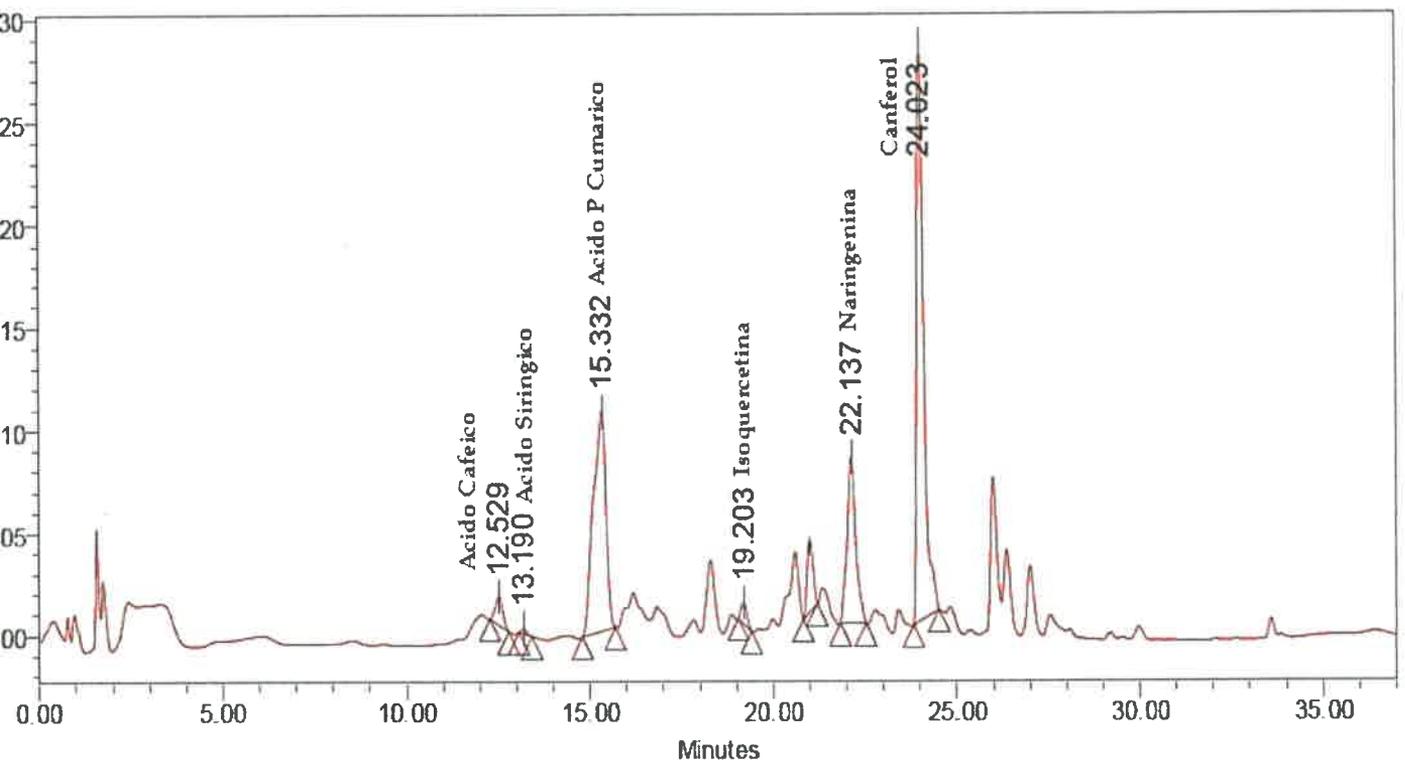
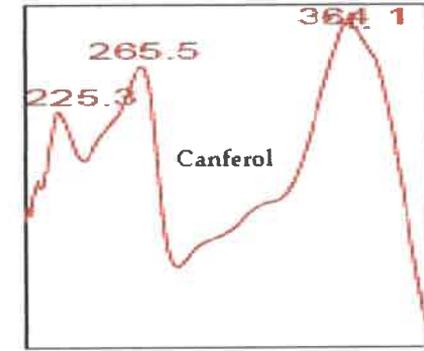
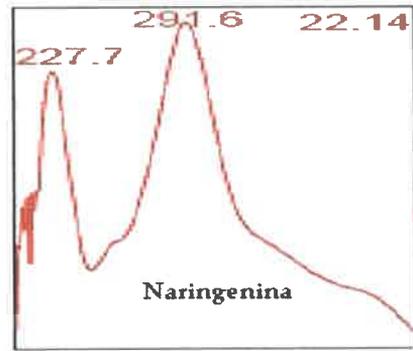
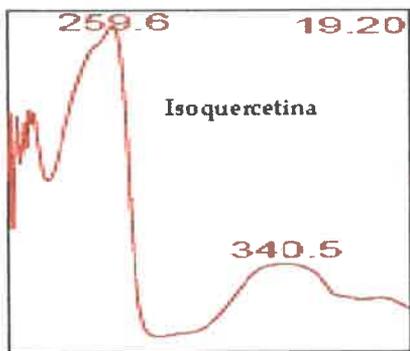
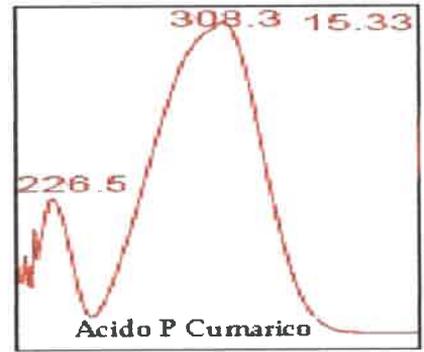
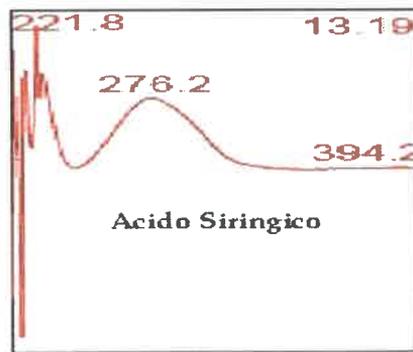
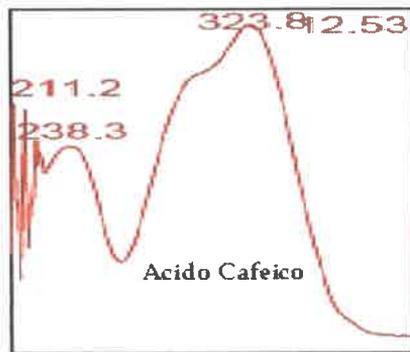


MUESTRA: Jeny 1- CODIGO: ABAP 4 Acetato



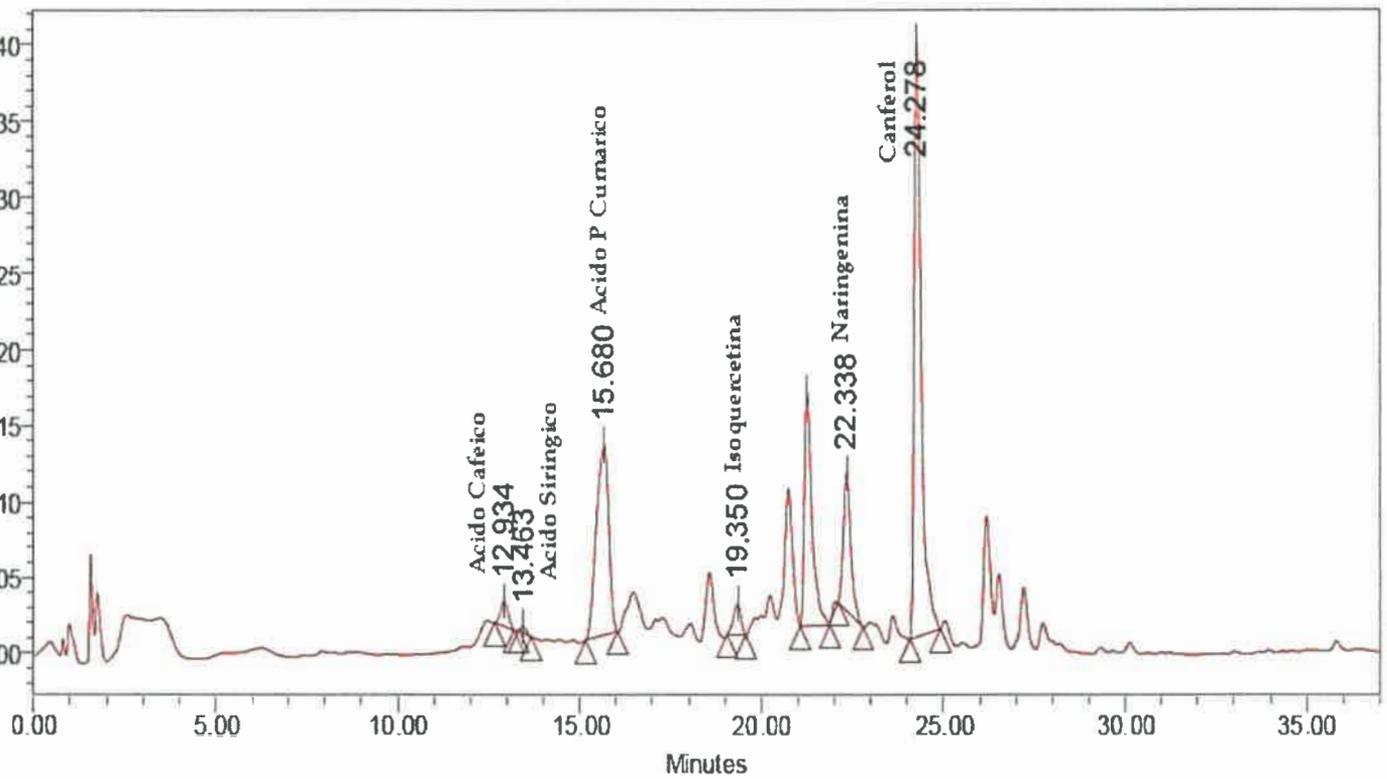
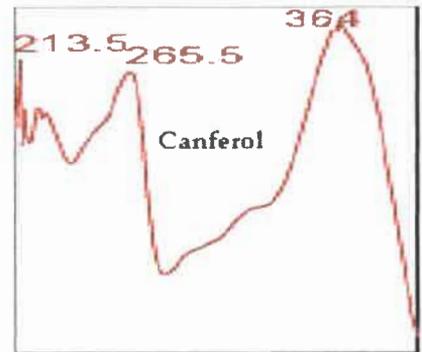
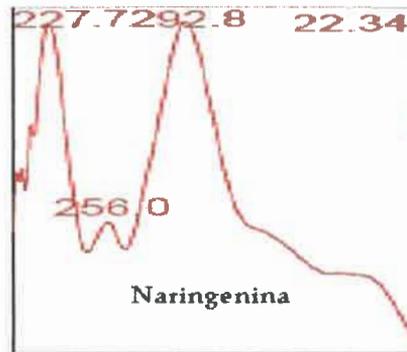
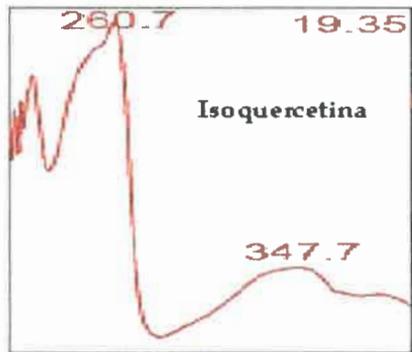
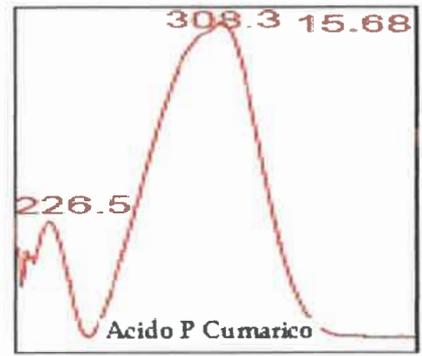
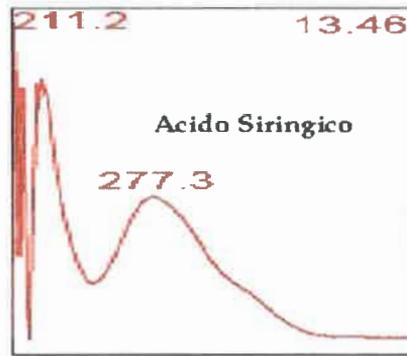
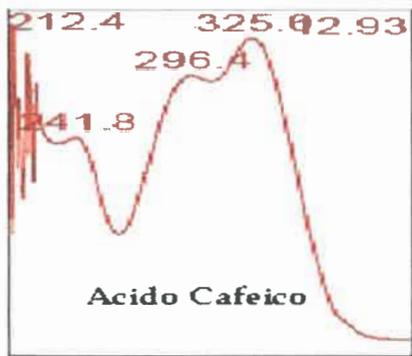


MUESTRA: Jeny 1- CODIGO: ABAP 4 Eter



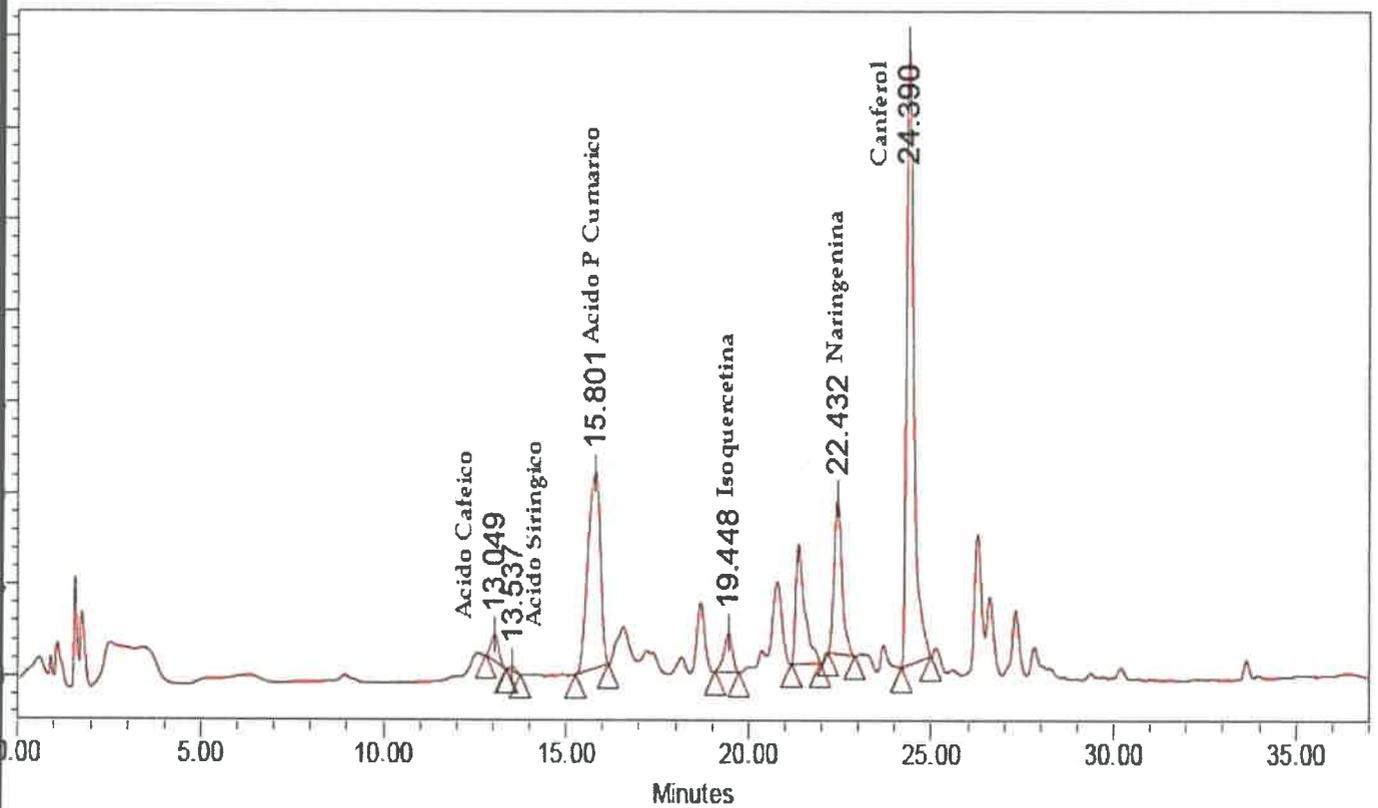
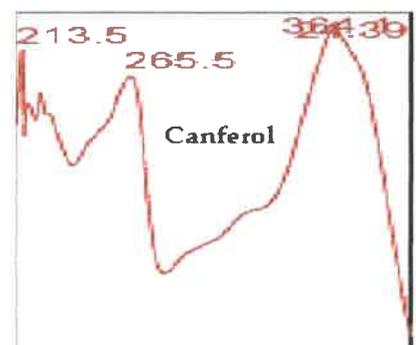
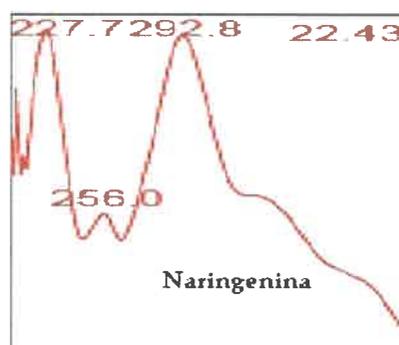
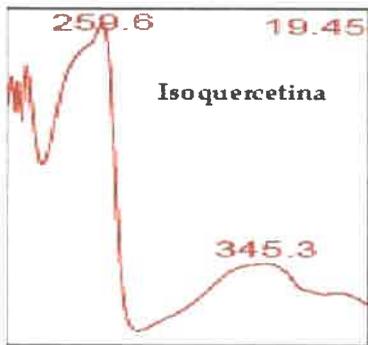
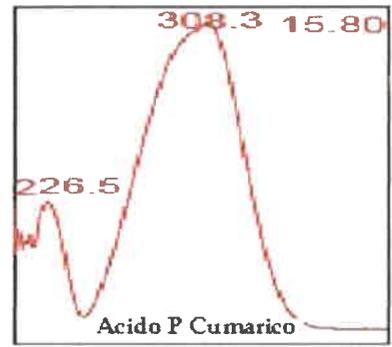
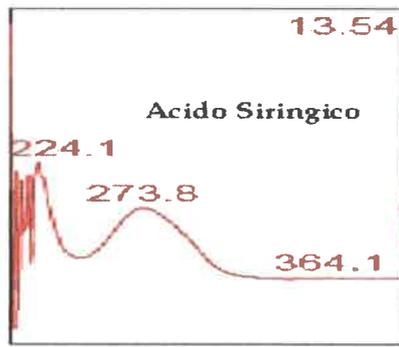


MUESTRA: Jeny 2- CODIGO: ABAP 5 Acetato



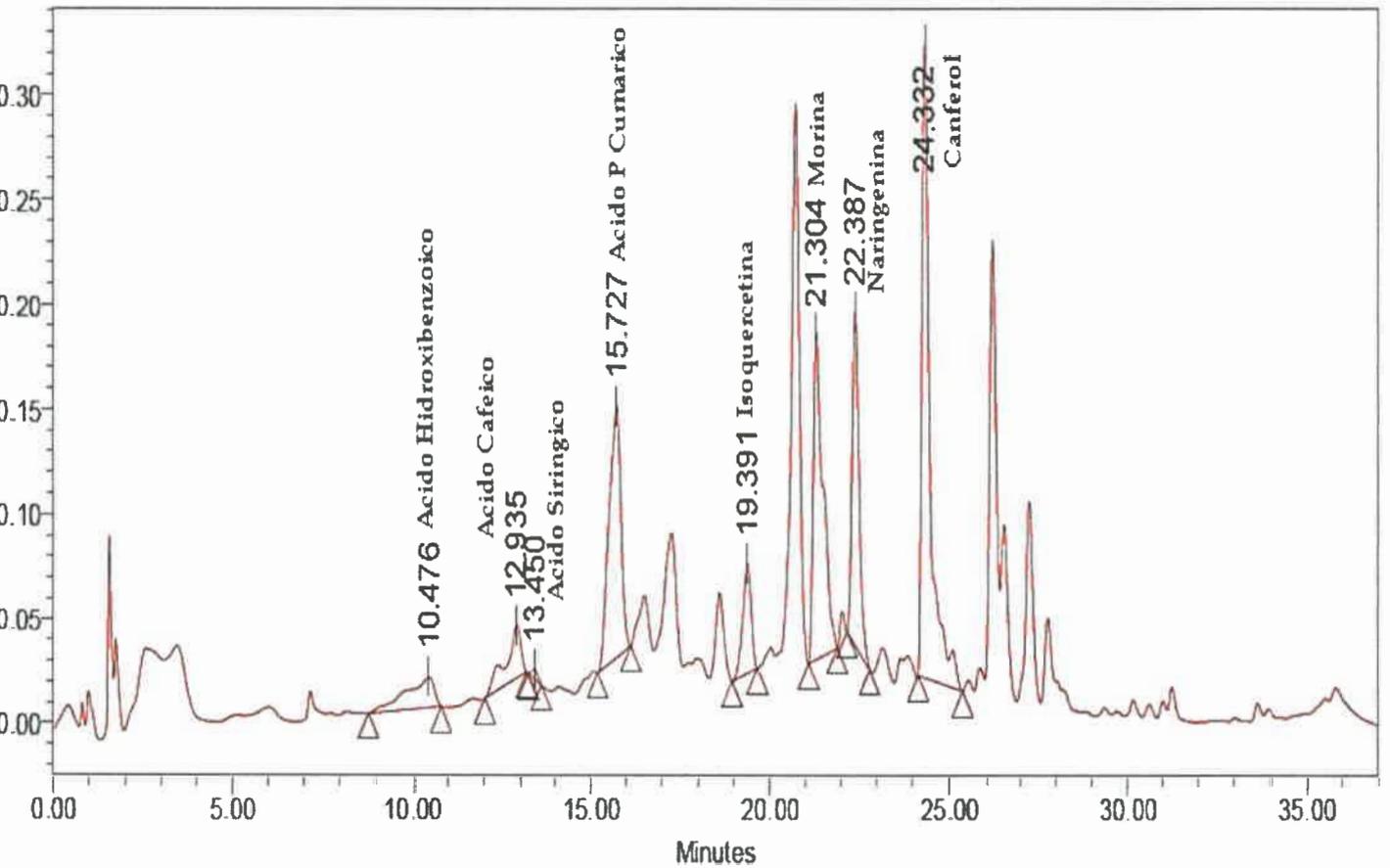
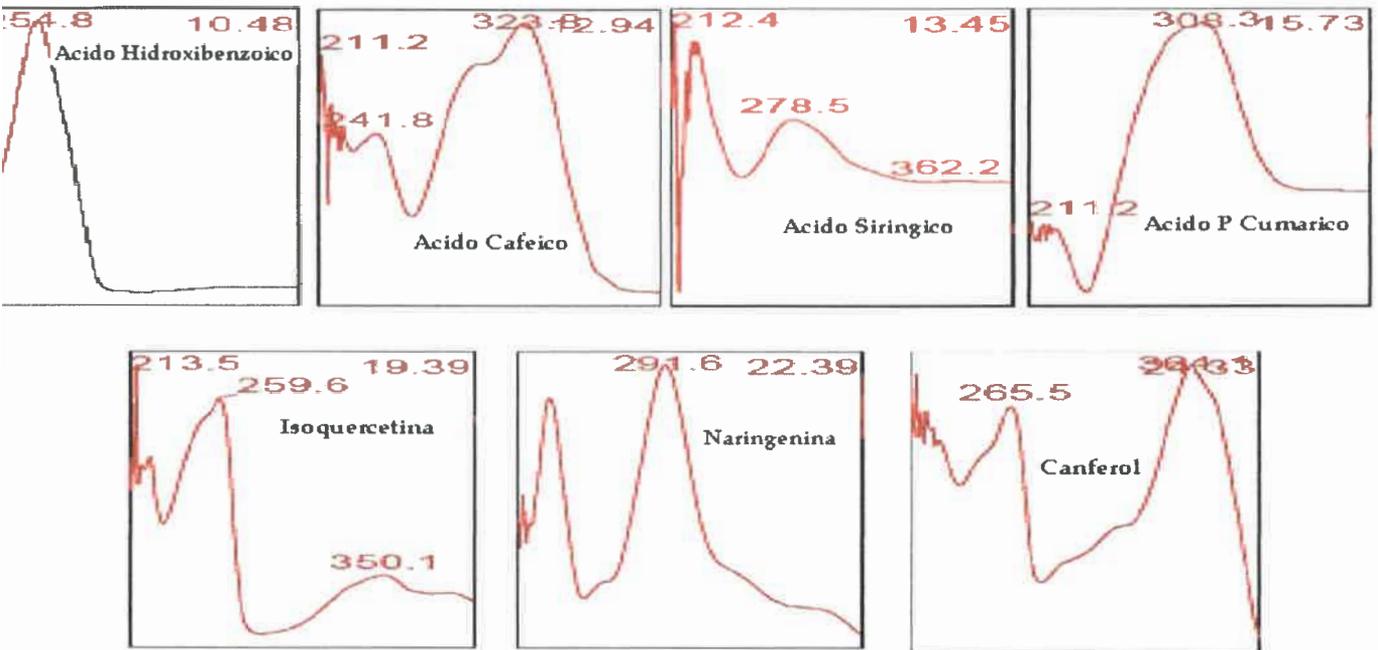


MUESTRA: Jeny 2- CODIGO: ABAP 5 Eter



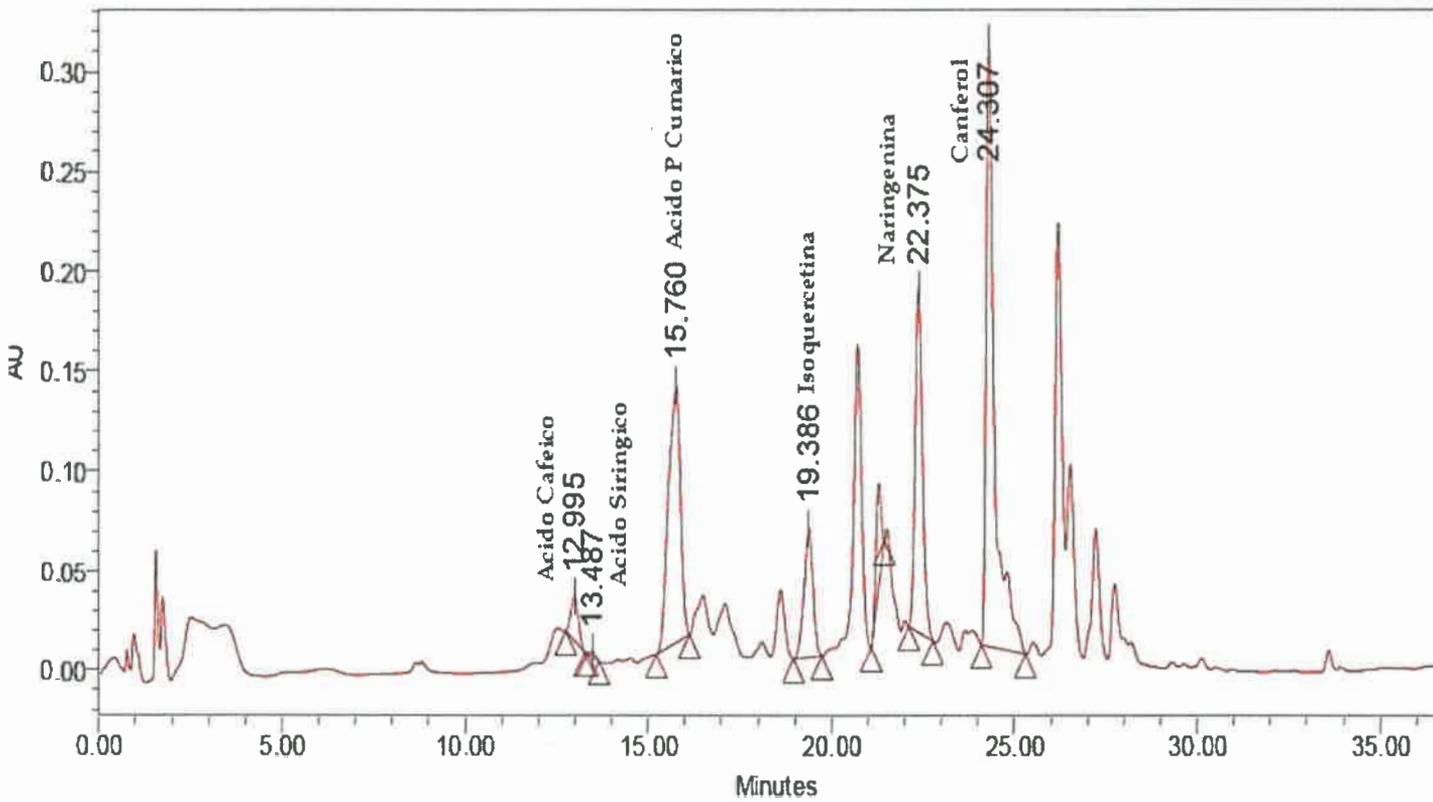
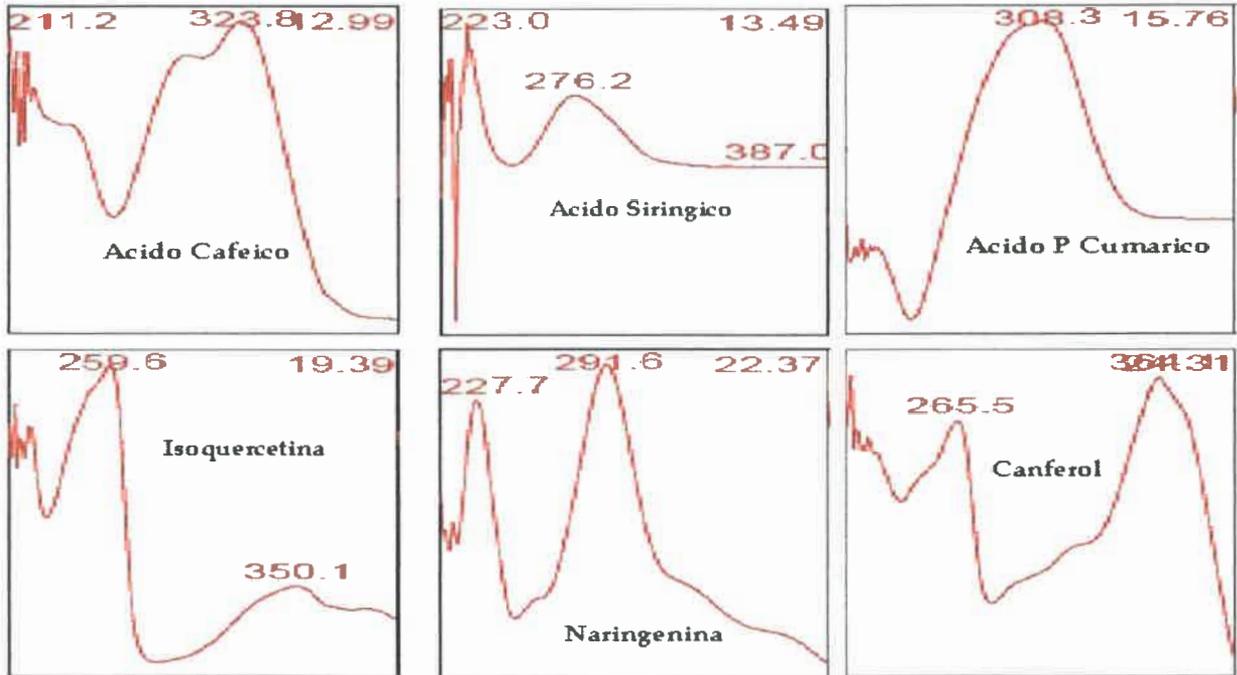


MUESTRA: Lher- CODIGO: ABAP 6 Acetato



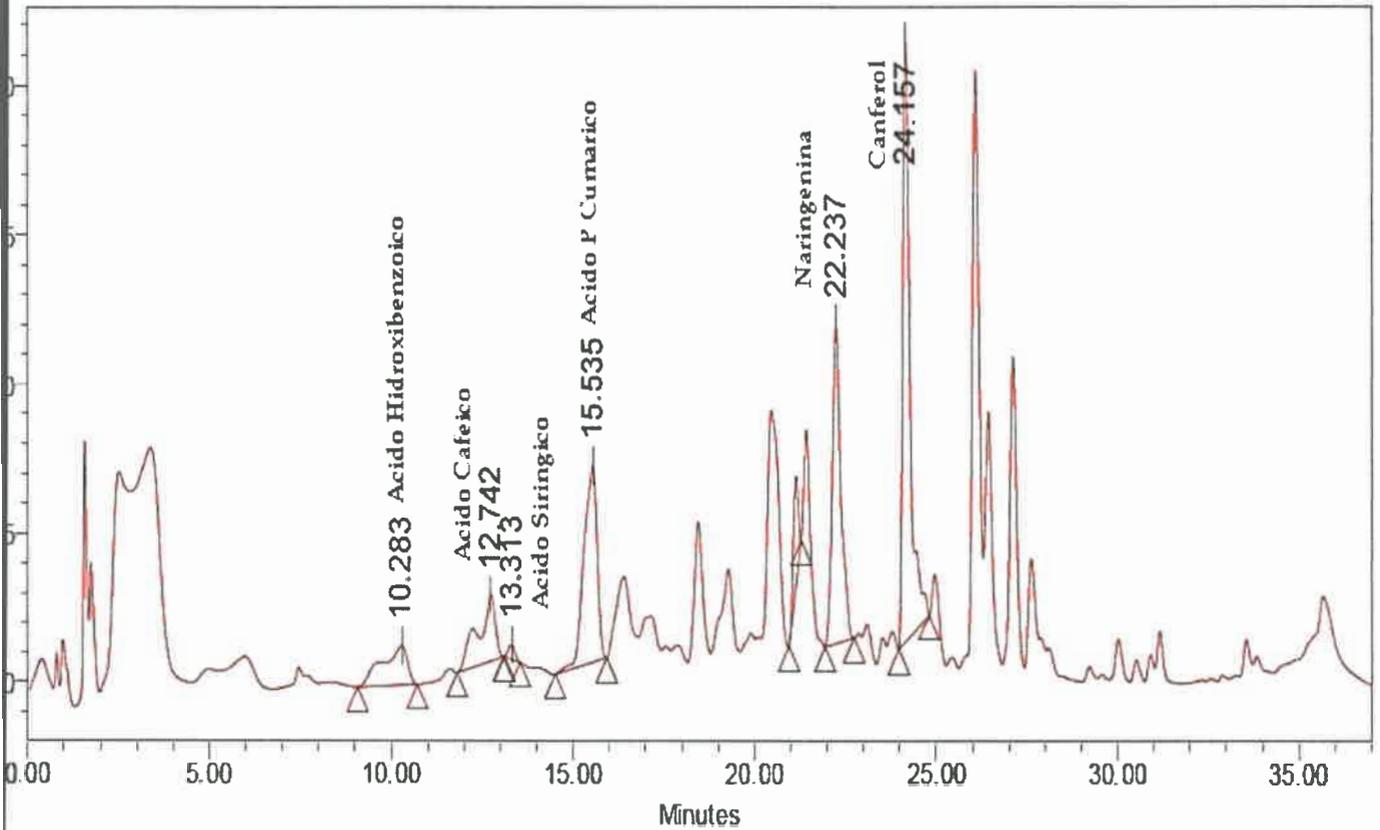
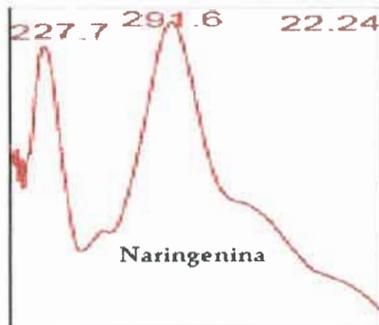
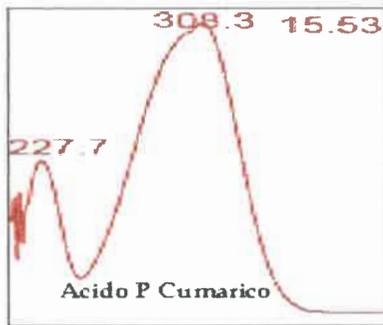
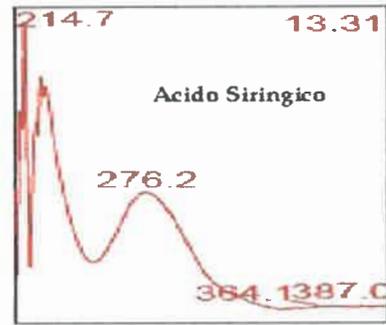
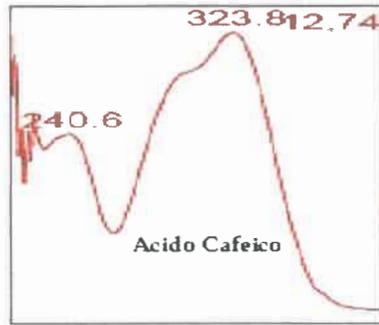
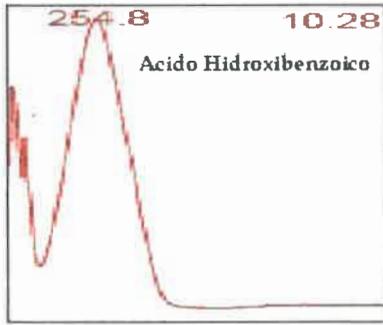


MUESTRA: Lher- CODIGO: ABAP 6 Eter



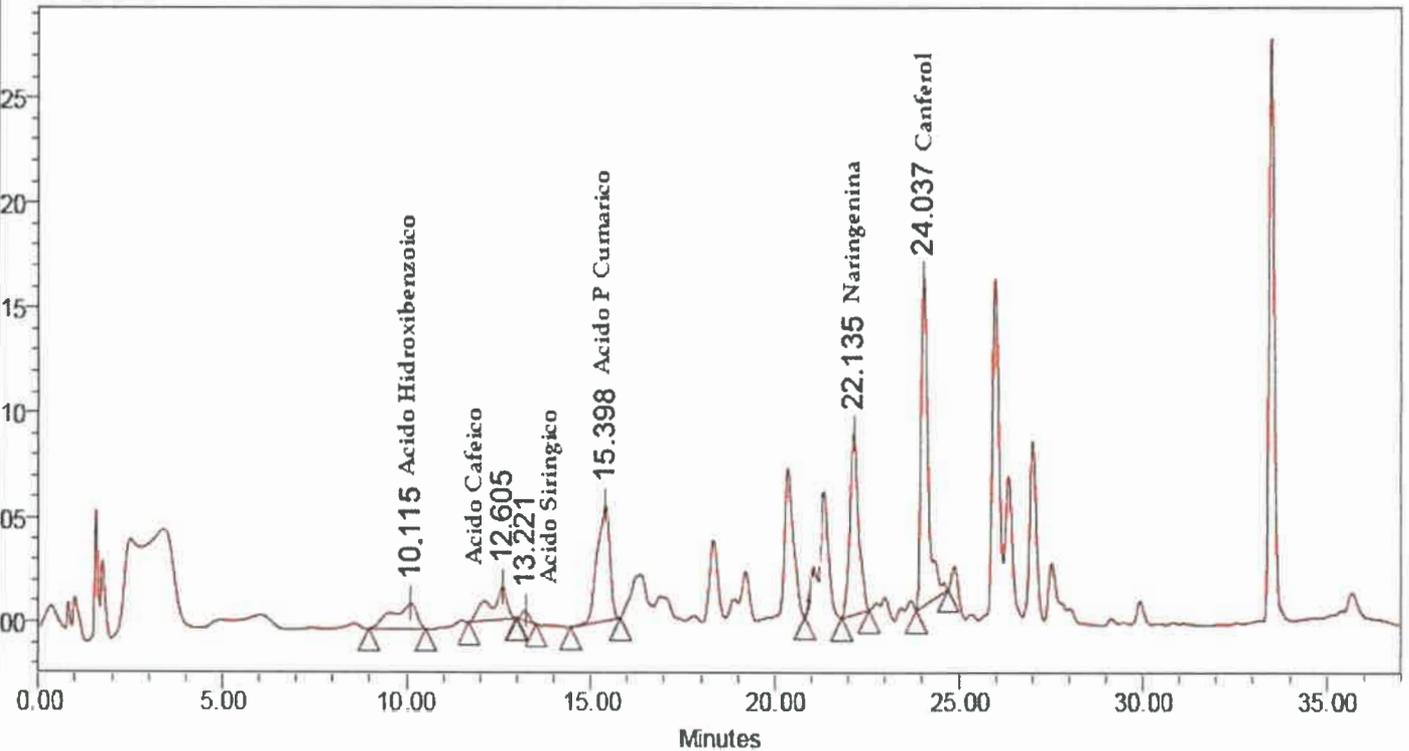
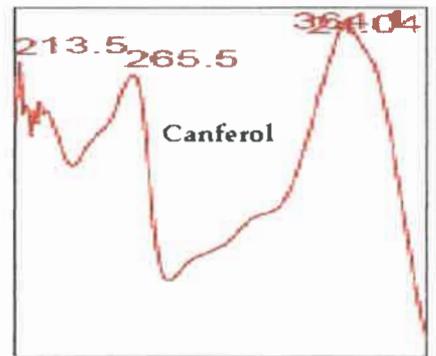
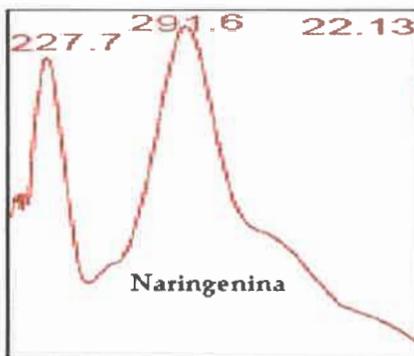
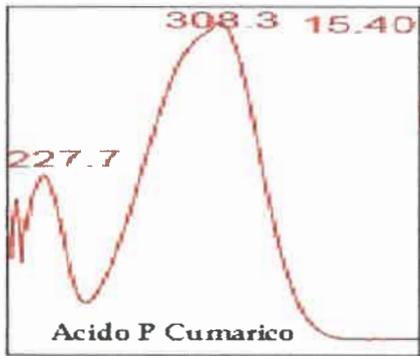
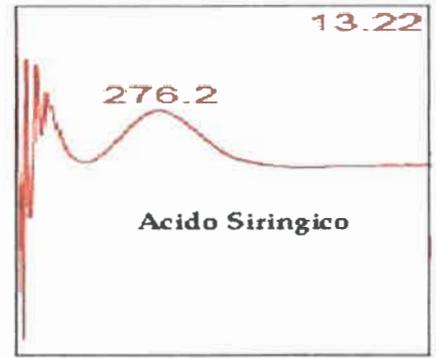
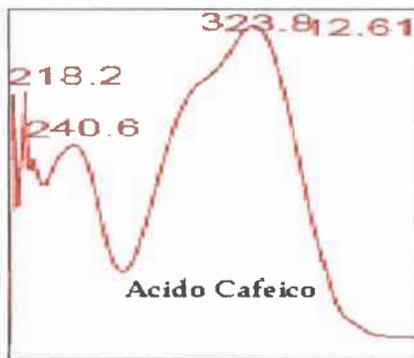
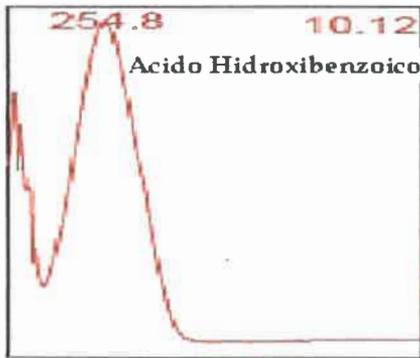


MUESTRA: M^a Teresa - CODIGO: ABAP 7 Acetato



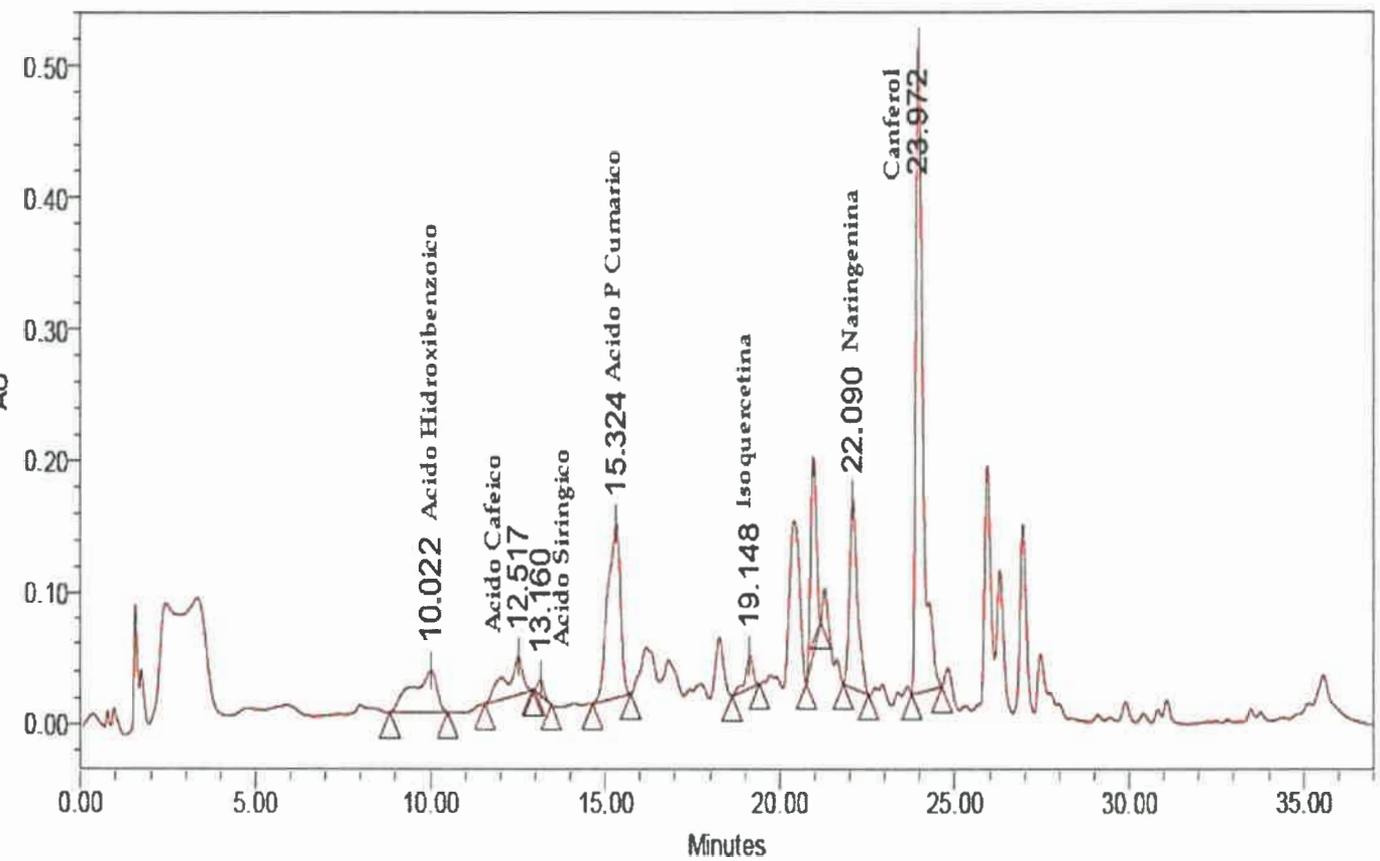
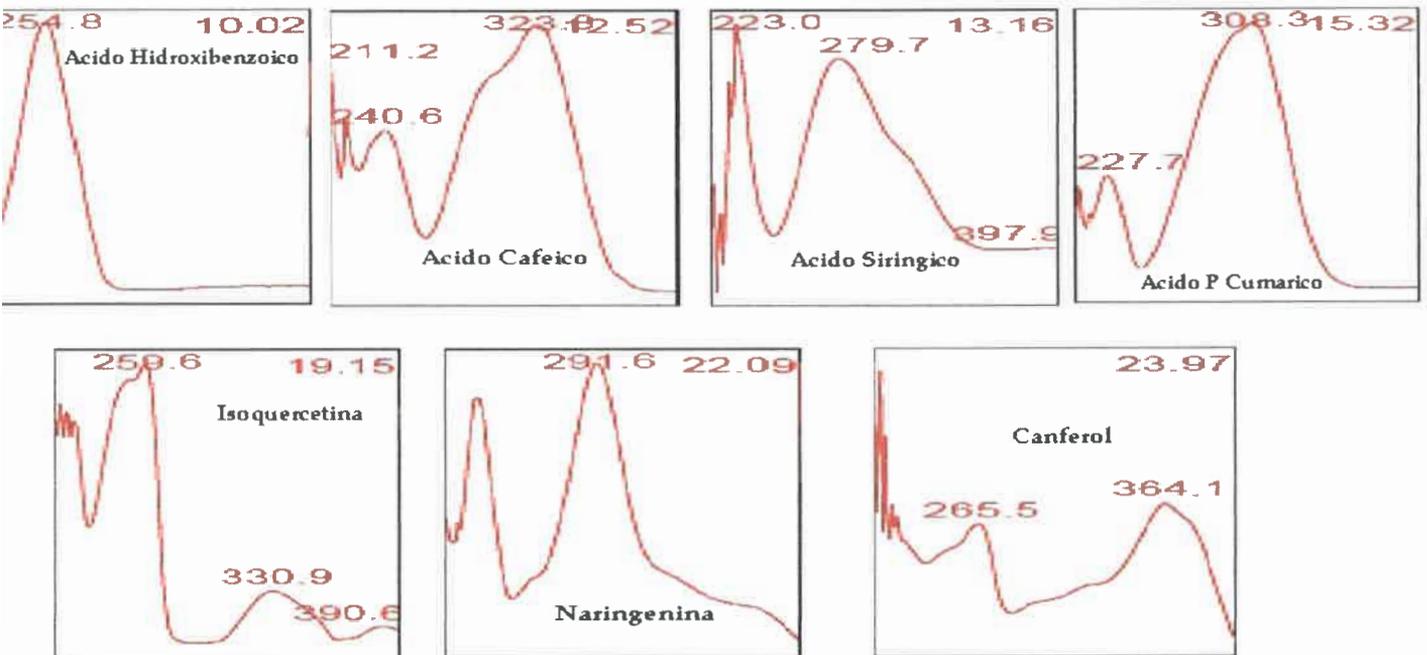


MUESTRA: M^a Teresa - CODIGO: ABAP 7 Eter



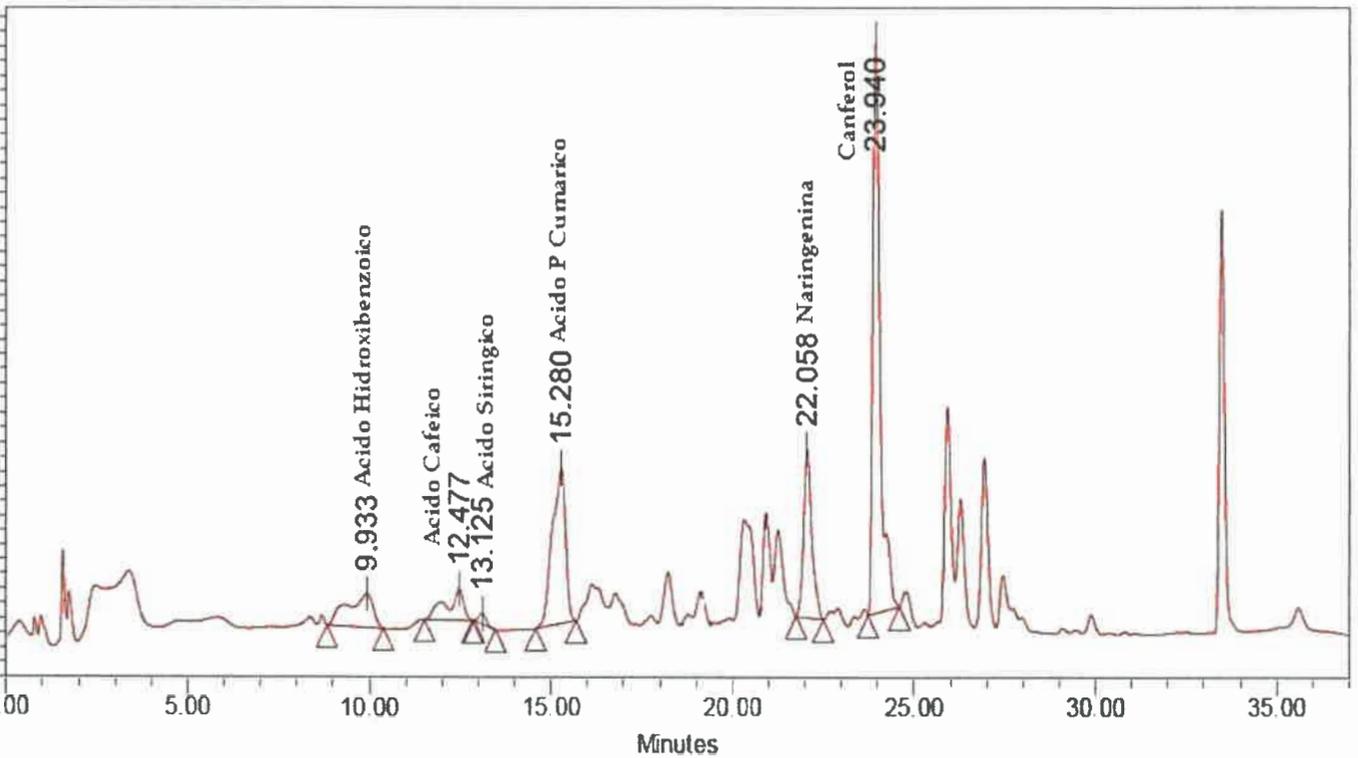
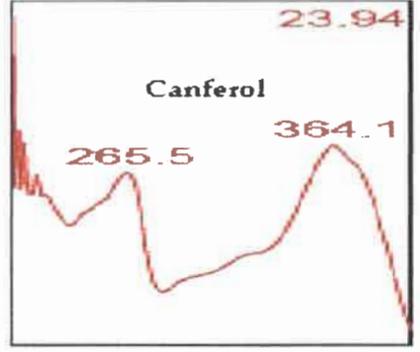
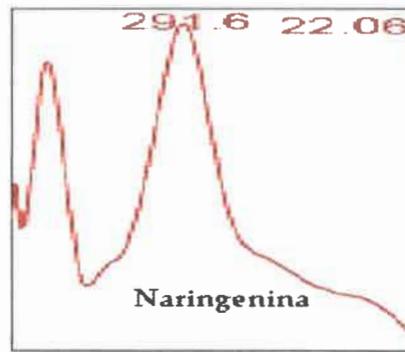
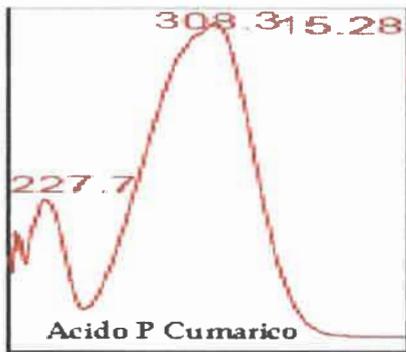
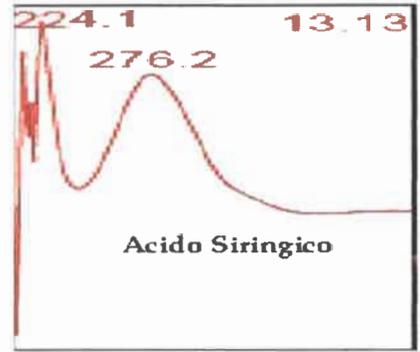
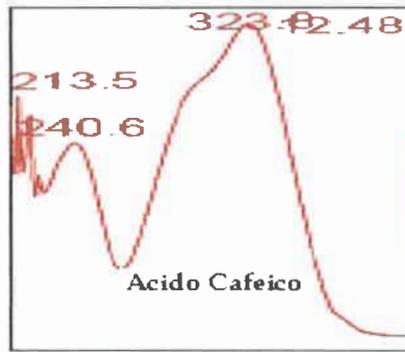
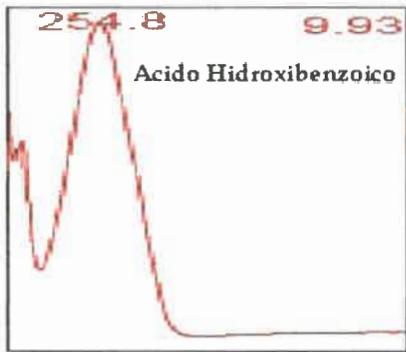


MUESTRA: Lopez - CODIGO: ABAP 8 Acetato



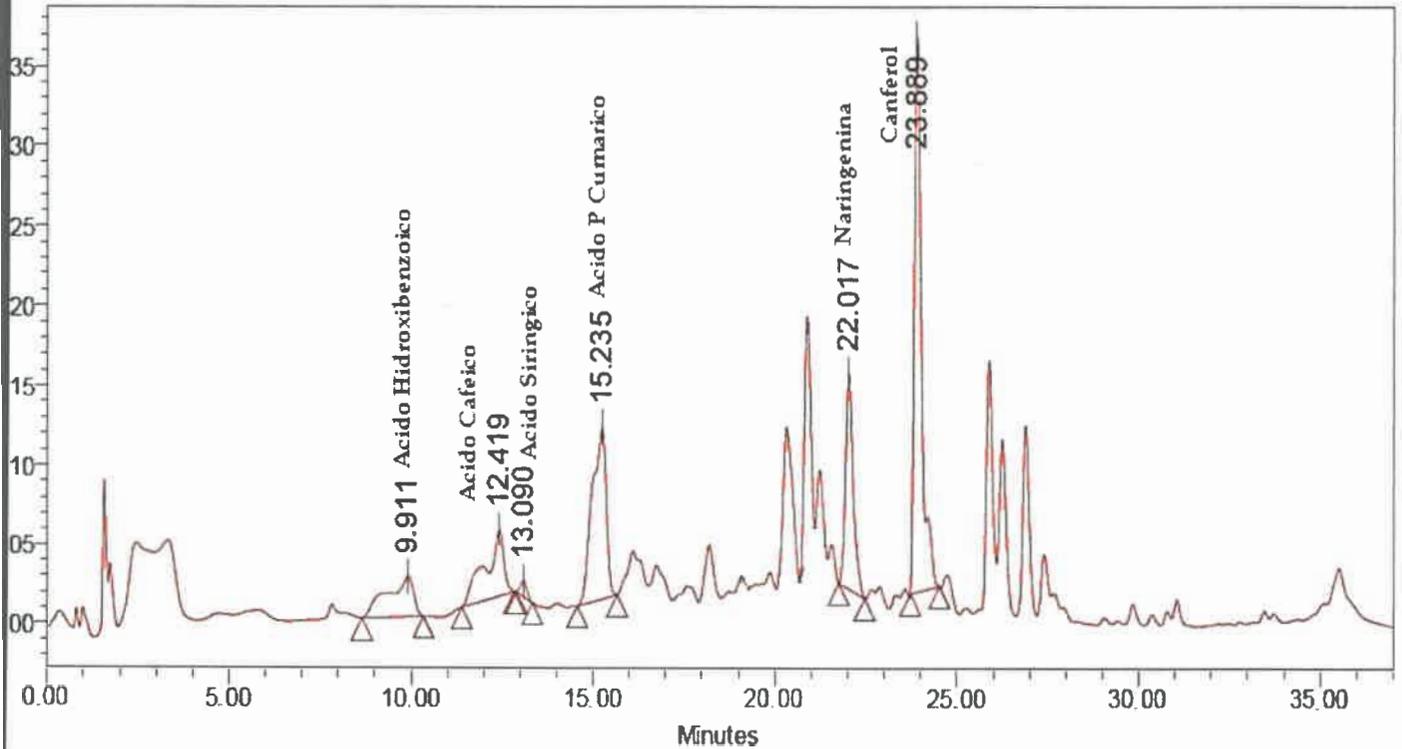
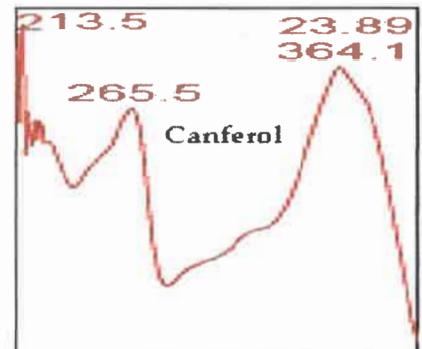
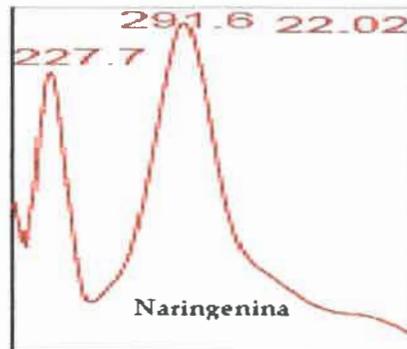
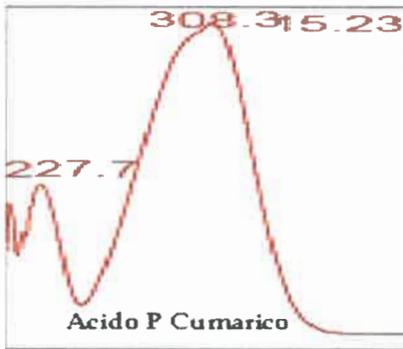
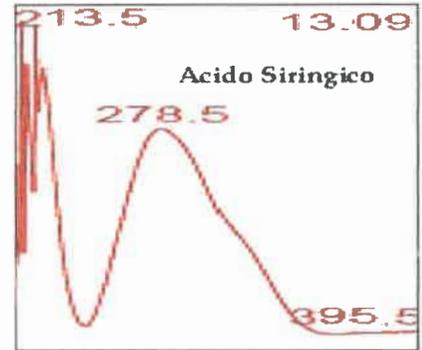
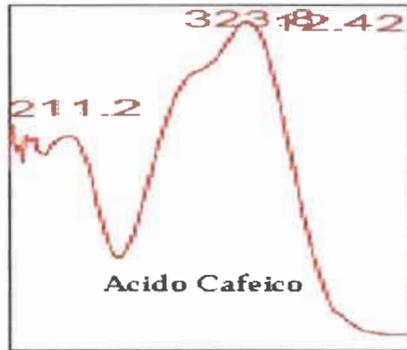
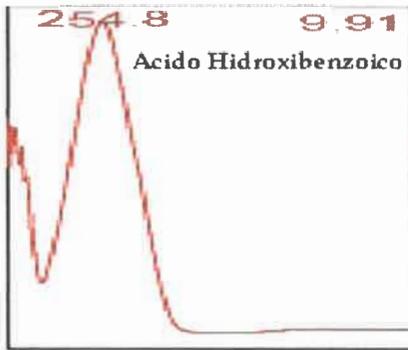


MUESTRA: Lopez - CODIGO: ABAP 8 Eter





MUESTRA: León - CODIGO: ABAP 9 Acetato





MUESTRA: León - CODIGO: ABAP 9 Eter

