



UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS", GALAȚI
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTEL



Rezumatul tezei de doctorat

STUDII PRIVIND AUTENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PRIN TEHNICI MODERNE A MIERII DE ALBINE DIN ROMÂNIA

Doctorand
Irina Dobre

Coordonator științific
Prof. Dr. Ing. Petru Alexe

Galați, 2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OIPOSDRU



Prezenta teză de doctorat a fost elaborată prin sprijinul financiar acordat de către proiectul POSDRU/88/1.5/S/61445, Id proiect: 61445- Eficientizarea activității studenților din cadrul ciclului de studii doctorale-EFICIENT, Universitatea "Dunărea de Jos", Galați. Perioada de implementare fiind: 1 octombrie 2009 - 30 septembrie 2012.

MULȚUMIRI

Dedic această lucrare mamei mele de care sunt legată nu doar prin legături de sânge ci și prin legături de iubire și prin rădăcinile ancestrale comune.

Doresc să-mi exprim gratitudinea față de persoanele care au avut impact în viața mea profesională în ordine cronologică:

Îmi exprim recunoștința față de doamna profesoară Rodica Segal, fiind prima călăuzitoare a pașilor mei pe cărarea cercetării în domeniul mierii de albine din anul II de studii universitare. Vă mulțumesc!

Aș dori să-mi exprim mulțumirea față de doamna profesoară Luminița Anca Georgescu care și-a consacrat timpul și energia, contribuind cu devotament și perseverență la formarea mea profesională încă din timpul facultății. Mulțumesc din suflet!

Sunt recunoscătoare domnului profesor Petru Alexe, conducătorul științific al tezei mele de doctorat, căruia îi mulțumesc pentru că m-a acceptat și mi-a oferit toată încrederea pe parcursul efectuării acestei lucrări.

Alese mulțumiri celor care mi-au fost alături pe perioada celor trei ani de studii doctorale, persoane care au reprezentat un reper pentru mine privind omenia și prietenia sinceră, pe lângă colegialitatea de care au dat dovadă. Astfel, mulțumesc colegilor Livia Patrascu, Ina Vasilean, Maricica Stoica, Ana Maria Simion, Loredana Dumitrașcu și Bria Vasile.

Mulțumesc proiectului EFICIENT POSDRU pentru susținerea financiară pe perioada celor 3 ani de doctorat, lucru care a favorizat formarea mea profesională în timpul celor 8 luni de mobilitate externă petrecute în laboratoarele Facultății de Științe din Ourense, Spania.

Quiero mostrar mi especial agradecimiento a Maria Carmen Seijo Coello que ha sido para mí como un segundo tutor, por dedicarme tanto su tiempo como su paciencia ante mis numerosas dudas, apoyándose en todo y confiar en mi desde el primer momento. Gracias por el apoyo profesional, financiero y también por tu sincera amistad.

A Olga Escuredo, mi compañera de laboratorio y de vivienda, por mostrar su interés desde el primer día, por su ayuda, por sus palabras, por sus cafés.

Y por supuesto, a mi amiga y compañera Shantal Rodríguez Pérez, por hacer que los largos días de laboratorio no fuesen tan largos, por su sincera amistad, por el tiempo compartido y las risas. Gracias!

Quiero dar las gracias a mis amigos dentro y fuera de la facultad: María, Montse, Estefanía, José Doncel, José Manuel, Begonia, Sandra y a los padres de Shantal por el tiempo compartido y el apoyo en mis días no tan buenas.

Gracias a todos, al resto de personas, que por algún motivo u otro en este momento no recuerdo.

Alese mulțumiri prietenei mele de suflet, Corina Afteni, pentru suținerea, sfaturile, înțelegerea și iubirea necondiționată de care a dat dovadă în pofida distanței fizice existente.

Mulțumesc din suflet lui Bogdan Constantinescu, cuvintele fiind prea mici pentru a exprima imensa mea recunoștință. Știu un singur lucru: creativitatea mea nu ar fi ajuns la acest nivel fără prezența și susținerea lui necondiționată.

Vă iubesc!

OBIECTIVE ȘTIINȚIFICE ȘI JUSTIFICAREA ALEGERII TEMEI

Mierea de albine este unul din produsele cele mai complexe din punct de vedere biologic, în compoziția căreia s-au descoperit substanțe foarte importante pentru organismul uman. Acest fapt sporește mult importanța mierii în alimentația omului, comparativ cu alte produse alimentare valoroase din punct de vedere nutrițional. Compoziția chimică, precum și importanța mierii pentru organism sunt determinate de natura ei.

Teza de doctorat intitulată **"Studii privind autentificarea și caracterizarea prin tehnici moderne a mierii de albine din România"** a vizat ca principal obiectiv studiul unor diferite tipuri de miere (salcâm, tei, rapiță, floarea-soarelui, Prunus, mană și polifloră), sub aspect melisopalinologic, fizico-chimic, biochimic, reologic și senzorial. Pentru autentificarea mierii românești s-au utilizat diferite metode moderne cuplate cu tehnici de chemometrie.

Astfel, în cadrul planului de lucru din programul doctoral au rezultat următoarele obiective specifice:

- ❖ Crearea unei bănci de mostre autentice de miere de albine din România din diferite surse florale și zone geografice.
- ❖ Autentificarea originii botanice și clasificarea pe tipuri de miere prin identificarea și cuantificarea spectrului polenic bazat pe aplicarea metodei microscopice (melisopalinologice) cuplată cu metoda chemometrică de prelucrare statistică.
- ❖ Caracterizarea fizico-chimică prin metode tradiționale și moderne (HPAEC-PAD), în vederea identificării compușilor predominanți din miere (spectrul glucidic, echipamentul enzimatic și etc.).
- ❖ Studiul proprietăților biologice active ale diferitelor tipuri de miere prin determinarea conținutului total de polifenoli, conținutului total de flavonoide, a capacității antiradicalice dar și a indicelui de oxidare.
- ❖ Evoluția în timp a comportamentului reologic al mierii de albine prin evaluarea diferiților parametri reologici.
- ❖ Caracterizarea senzorială a probelor de miere prin evaluarea descriptorilor organoleptici specifici.
- ❖ Clasificarea și autentificarea mierii prin combinarea metodelor chemometrice (Cluster ierarhic, Analiza Componentelor Principali, Analiza Discriminantă Factorială, Corelații canonice și Pearson) și crearea unei baze de date constituită din profilele palinologice, fizico-chimice, biochimice și senzoriale ale mierii românești.

Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți, astfel:

STUDIUL DOCUMENTAR

Capitolul 1, intitulat "Apicultura și importanța ei în România" este structurat în trei subcapitole care descriu diferite considerații teoretice privind istoria apiculturii în țara noastră, caracteristici ale albinei românești *Apis mellifera Carpatica* cât și potențialul apiculturii și producția de miere de calitate din România.

Capitolul 2, denumit "Baza meliferă" este structurat în două subcapitole alcătuite din considerații teoretice privind vegetația meliferă a României, clasificarea plantelor melifere cu impact și caracterizarea taxonomică a acestor plante.

Capitolul 3, intitulat "Melisopalinologia ca știință și preocupările ei moderne" cuprinde 2 subcapitole formate din considerente teoretice și stadiul actual al cercetării în domeniu dar și rolul și importanța aplicării metodei palinologice, cât și structura morfologică a granulei de polen cu importanță majoră în identificarea corectă a speciei unei plante melifere.

Capitolul 4, intitulat "Mierea de albine", care este format din 5 subcapitole, prezintă clasificarea mierii, tipurile de miere utilizate în prezentul studiu și caracteristicile sale, caracteristicile fizico-chimice ale mierii, însușirile terapeutice dar și stadiul actual al cercetărilor în domeniu.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

Capitolul 5, intitulat "Identificarea spectrelor polenice diferitelor tipuri de miere din România prin analiza melisopalinologică", prezintă rezultatele obținute prin trasarea spectrelor polenice pentru cele 54 de probe de miere analizate în urma aplicării metodei palinologice cantitative și calitative, identificarea tipurilor de miere luate în lucru dar și clasificarea acestora în funcție de originea botanică.

Capitolul 6, denumit "Contribuții privind controlul calității mierii românești" prezintă rezultatele obținute în urma identificării și cuantificării celor mai importanți parametri ai mierii precum: glucidele, proteinele, grăsimile, apa, echipament enzimatic, indicatori ai prospețimii (HMF, invertaza, diastaza), valoare energetică.

Capitolul 7, intitulat "Evoluția în timp a comportamentului reologic al mierii de albine" prezintă profilele reologice ale tuturor tipurilor de miere analizate prin diferite teste precum: testul de creștere progresivă a deformării, testul de creștere progresivă a frecvenței, testul de curgere în trepte și testul de creștere progresivă a temperaturii. În cea de-a doua parte a acestui capitol a fost evaluat efectul temperaturii asupra vâscozității mierii utilizând diferite modele matematice care descriu această influență. În urma analizei de clusterizare ierarhică, în funcție de vâscozitatea probelor evaluate, s-a obținut gruparea acestora pe tipuri de miere.

Capitolul 8, denumit "Studiul activității antioxidante a mierii românești analizate" prezintă rezultatele obținute în urma evaluării potențialului antioxidant prin diferite metode: estimarea conținutului total de polifenoli prin metoda Folin-Ciocalteu, estimarea conținutului total de flavonoide, estimarea activității antiradicalice (RSA-radical scavenging activity) și estimarea indicelui de oxidare. Prin prelucrare statistică a rezultatelor s-au obținut corelații canonice semnificative între diferitele metode de determinare a activității antioxidante. De asemenea, în urma analizei de clusterizare ierarhică a fost posibilă autentificarea originii botanice în funcție de capacitatea antioxidantă și discriminarea între mierea florală și cea de mană.

În capitolul 9, intitulat "Evaluarea calității mierii românești pe baza analizei senzoriale" este prezentat profilul senzorial al tipurilor de miere evaluate de un grup de degustători specialiști (împreună cu autorul lucrării care a fost pregătit în acest sens), din cadrul Institutului Técnica del Consejo Regulador Geográfica Protejida Miel de Galicia din Spania. S-au stabilit, prin aplicarea analizei componentelor principale, atributele senzoriale care discriminează puternic tipurile de miere precum și coeficienții de corelație Pearson pentru acești descriptori organoleptici. De asemenea, în funcție de culoare și gustul dulce, este posibilă autentificarea originii botanice a mierii aplicând analiza de clusterizare ierarhică.

Capitolul 10, intitulat "Autentificarea originii botanice a mierii românești bazată pe combinarea analizelor fizico-chimice și chemometrice" prezintă rezultatele obținute în urma autentificării prospețimii mierii prin identificarea posibilelor fraude, autentificarea originii botanice utilizând metode palinologice, fizico-chimice, biochimice și chemometrice. În partea a doua este prezentat profilul fizico-chimic, biochimic, palinologic și senzorial caracteristic fiecărui grup de miere evaluat.

În final, au fost prezentate contribuțiile originale ale actualei teze de doctorat, care prezintă impact asupra dezvoltării cunoașterii în acest domeniu dar și viitoarele perspective de continuare a cercetărilor și diseminarea rezultatelor pe perioada programului de studii doctorale (01.10.2009 - 14.09.2012).

Realizarea activităților de cercetare care au respectat și îndeplinit obiectivele științifice ale tezei de doctorat a avut loc în cadrul:

- ❖ Laboratorului de Analize Fizico-Chimice și Microbiologice ale Alimentelor acreditat RENAR al Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunărea de Jos, Galați, România.
- ❖ Laboratorului de Biologie Vegetală și Știința Solului din cadrul departamentului de Apicultură și Biologie, Facultatea de Științe, Universitatea de Vigo, Ourense, Spania.

CAPITOLUL 5. IDENTIFICAREA SPECTRELOR POLENICE ALE TIPURILOR DE MIERE DIN ROMÂNIA PRIN ANALIZA MELISOPALINOLOGICĂ

5.2. MATERIALE ȘI METODE

Ca referință pentru identificarea diferitelor specii de polen studiate s-au utilizat preparatele microscopice din palinoteca (biblioteca de polen) Departamentului de Biologie Vegetală și Apicultură din cadrul Facultății de Științe din Ourense, Spania. În paralel s-au folosit chei de identificare polenică.

Probele de miere supuse prezentului studiu (n=54) au fost achiziționate direct de la apicultor care a garantat originea sa botanică și geografică, dar și de la Asociația Crescătorilor de Albine din diferite localități. Probele au fost obținute din 2 culturi (culesuri) consecutive corespunzând anilor 2009 și 2010 (tabelul 5.1 și 5.2).

S-au utilizat în total 54 de probe de miere dintre care: 26 de probe din Moldova, 13 probe din Muntenia, 12 probe din Transilvania și 3 probe din Dobrogea (figura 5.1).

Tabelul 5.1. Originea geografică și botanică a probelor de miere conform declarației producătorului

Tip de miere	Număr probe	Origine geografică (localitate)
Salcâm	n=21	Argeș, Brașov, București, Galați, Ialomița, Iași, Cluj-Napoca
Tei	n=17	Argeș, Brașov, Tulcea, Bacău, Neamț, Galați, Brăila, Iași
Rapiță	n=4	Brăila, Slobozia, Vaslui, Galați, Bacău, Brașov, București, Timișoara, Tulcea
Floarea-soarelui	n=2	Vâlcea, București, Vaslui, Bihor
Pomi fructiferi (<i>Prunus</i>)	n=1	Brașov
Mană (brad, mană, fâneață)	n=3	Brașov, Bacău, Galați
Polifloră	n=5	Galați, Tulcea, București, Brașov, Oradea, Timișoara
Păpădie	n=1	Cluj-Napoca

Fiecare probă de miere a fost depozitată în recipiente de sticlă care au fost corect etichetate și transportate la laboratorul din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor pentru analizele ulterioare. Analizele parametrilor de calitate au fost efectuate la

data intrării în laborator a probelor de miere, restul fiind transferate în recipiente sterile de plastic păstrate în condiții de refrigerare.

Tabelul 5.2. Originea botanică și caracteristici apicole a probelor de miere conform declarației producătorului

Origine botanică	Număr probe	Nectar-Polen-Mană	Luna de înflorire	Producția de miere (kg/ha)
Salcâm	n=21	N,P	mai-iunie	1000
Tei	n=14	N,P	iunie-iulie	1200
Rapiță	n=4	N,P	mai-iunie	30-100
Floarea-soarelui	n=2	N,P	iunie-septembrie	35-100
<i>Pomi fructiferi (Prunus)</i>	n=1	N,P	martie-iunie	-
Mană (brad, mană, fâneață)	n=3	mană	aprilie-mai	20
Polifloră	n=5	N,P	aprilie-septembrie	1200
Păpădie	n=1	N,P	aprilie-septembrie	200

Reactivii, glicerină (87%) și gelatină glicerinată Kaiser pentru microscopie, au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germania) iar parafilmul și fuxina de la Merck (Darmstadt, Germania).

5.2.2. Analiza palinologică calitativă

Numărul granulelor de polen specifice mierii monoflore se determină prin examinarea microscopică a sedimentului obținut în urma centrifugării, iar procentul se stabilește prin raportarea numărului respectiv la numărul total de granule de polen găsite pe aceleași câmpuri microscopice. Prin această metodă se pot identifica diferitele tipuri polenice prezente în miere, lucru care permite apoi stabilirea polenului dominant ce reprezintă un indicator botanic.

Pentru investigarea spectrelor polenice ale celor 54 probe de miere, extracția polenului s-a realizat utilizând metodologia descrisă de Louveaux și colab. [6] cu mici modificări adoptate în ceea ce privește durata de centrifugare.

Astfel 20 g miere au fost dizolvate în 45 mL de apă distilată (la o temperatură de 45°C) până la dispariția cristalelor de zahăr. Apoi a avut loc centrifugarea acestora timp de 15 minute la 4500 rotații/minut. După ce s-a eliminat supernatantul din fiecare tub prin înclinare ușoară, în așa fel încât să nu se disloce sedimentul, peste acesta s-au adăugat 45 mL apă distilată, în scopul spălării sedimentului de impurități. Acestea au fost supuse apoi unei centrifugări timp de 10 minute la 4500 rotații/minut, după care supernatantul a fost îndepărtat din nou.

Examinarea a avut loc la un microscop optic (NIKON OPTIPHOT II) la grosimentul de 400x și 1000x, în funcție de dificultatea identificării polenului respectiv. S-au numărat și identificat circa 1000 granule de polen pentru fiecare spectru polenic.

Odată ce a fost identificat, polenul s-a clasificat în funcție de taxonomie în specie, gen sau tip și familie. Se clasifică corespunzător unei specii atunci când polenul identificat are caracteristici morfologice specifice acelei specii florale sau vegetale.

După obținerea acestor date, se calculează procente relative fiecărui tip de polen și se finalizează prin trasarea spectrului polenic al mierii supuse analizei palinologice.

Calcul și exprimarea rezultatelor:

$$GP = n/n_1 \cdot 100 (\%)$$

În care:

GP- granule de polen (se nominalizează specia);

n- numărul granulelor de polen aparținând speciei florale studiate;

n₁- numărul total de granule numărate (specia studiată și celelalte specii).

5.2.3. Analiza palinologică cantitativă

Pentru investigarea spectrelor polenice a celor 54 probe de miere, extracția polenului s-a realizat utilizând metodologia descrisă de Louveaux și colab. [6] cu unele modificări privind timpul centrifugării și viteza de centrifugare.

Obținerea preparatului microscopic a avut loc în aceleași condiții ca în cazul analizei calitative, cu modificarea că după îndepărtarea supernatantului din tubul de centrifugă (la finalul celor două centrifugări) sedimentul se aduce la un volum de 5 mL cu apă distilată și se omogenizează cu ajutorul unui Vortex.

S-au identificat toate granulele de polen dar și indicatorii de mană (spori, alge, hife) din întreg preparatul microscopic. Pentru aceasta s-a parcurs suprafața preparatului prin deplasarea lamei pe distanțe egale cu diametrul câmpului microscopic.

Pentru exprimarea rezultatelor s-a utilizat raportul HDE/P, în care HDE (honeydew elements- elemente de mană) reprezintă numărul indicatorilor de mană iar P reprezintă numărul total de granule de polen identificate.

5.2.4. Metode statistice de prelucrare și interpretare a rezultatelor

Analizele descriptive au fost efectuate pentru toate probele analizate. Cele mai frecvente tipuri de polen au fost comparate ținând cont de tipul de miere cu ajutorul unei analize de varianță (ANOVA) care determină prezența unor diferențe statistice semnificative ($p < 0,05$). Analiza componentelor principale (PCA) a fost efectuată în scopul determinării unor similitudini între probe în funcție de originea botanica, iar analiza de clusterizare în scopul clasificării/grupării acestora. Toate analizele statistice au fost efectuate cu programele de calcul Centurion STATGRAPHICS XVI și SPSS Version 17.0 pentru Windows. Determinările au fost realizate în duplicat.

5.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.3.1. Evaluarea analizei cantitative

Determinarea cantitativă palinologică s-a realizat cu scopul obținerii densității polenice pentru toate probele analizate. Probele de miere au fost incluse în următoarele clase de polen conform clasificării lui Maurizio [5]:

Clasa I, < 2000 GP/g miere- 37,04% (20 probe de miere).

Clasa II, între 2000-10000 GP/g miere- 59,26% (32 probe de miere).

Clasa III, între 10000-50000 GP/g miere- 3,7% (2 probe de miere).

Clasa IV, între 50000-100000 GP/g miere (0 probe).

Clasa V, mai mult de 100000 GP/g miere (0 probe).

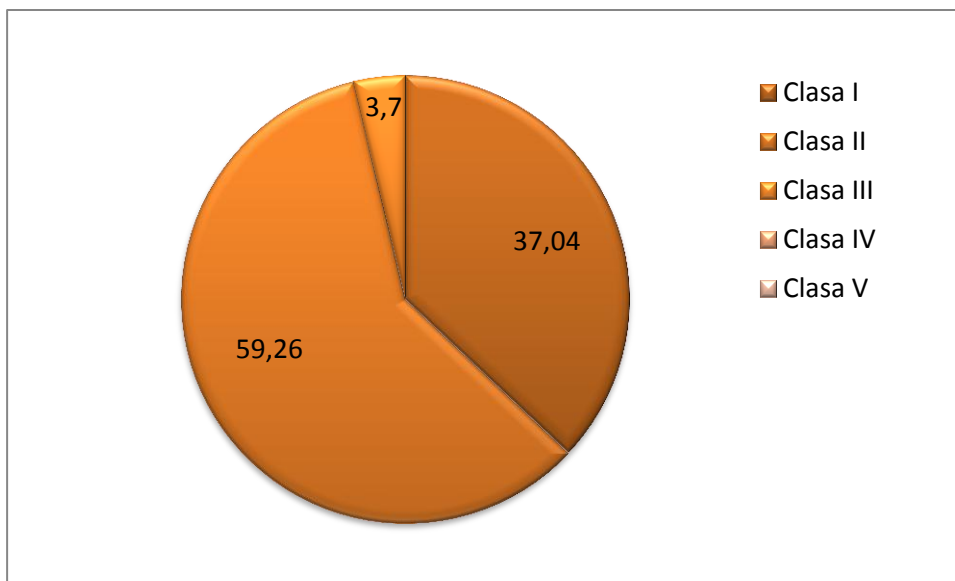


Figura 5.3. Distribuția probelor de miere în acord cu clasificarea lui Maurizio

Distribuția probelor de miere s-a realizat cu ajutorul clasificării lui Maurizio (figura 5.3). Rezultatele obținute indică faptul că probele de miere studiate au o densitate polenică medie, mai mult de 50% dintre probe situându-se în Clasa a II-a.

În cele ce urmează este reprezentată variația mediei densității polenice a fiecărui grup de miere în parte.

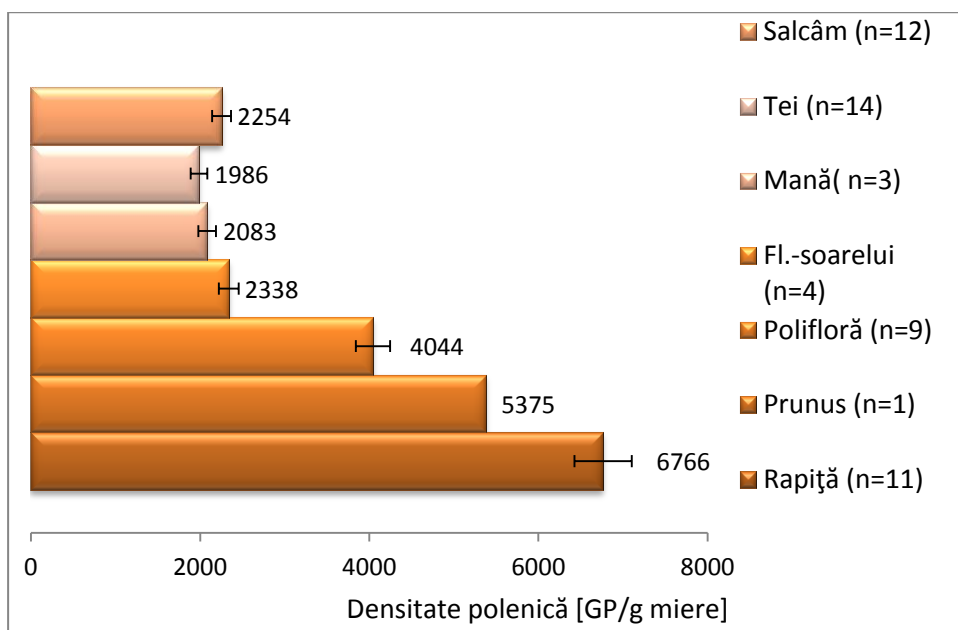


Figura 5.4. Densitatea polenică medie a fiecărui grup de miere

Grupul mierii de salcâm (n=12) a înregistrat un minimum de 525 GP/g și un maximum de 5475 GP/g, cu probe aparținând atât clasei I, cât și clasei a II-a, față de grupul rapiță (n=11) cu valori semnificative și foarte variate situate în intervalul 700-19525 GP/g miere. Anumite probe de rapiță (33 și 34) au aparținut clasei III, fiind singurele din toate probelor analizate care se situează în clasa relativ bogată în polen (tabelul 1- Anexe).

Din figura 5.4 se poate observa variația densității polenice între cele 7 tipuri diferite, care în cazul mierii de rapiță și Prunus este destul de ridicată comparativ cu mierea de mană și cea de tei. Concentrația în polen scăzută în cazul mierii de mană se datorează prezenței în compoziție în cea mai mare măsură a indicatorilor de mană și mai puțin a granulelor de polen.

În cazul mierii de tei, polenul *Tilia* este hiporeprezentat, ceea ce admite denumirea unei mieri ca fiind de tei, acesta fiind prezent cu un procent între 10-20% [3,16].

În studiul de caracterizare a mierii monoflore, Persano Oddo și colab. [8] afirmă că în cazul mierii de tei polenul aparținând genului *Tilia* poate chiar să fie absent datorită sterilității multor varietăți ale acestor plante cultivate. Acest fapt depinde, de asemenea, de flora fiecărei regiuni.

Analiza indicatorilor de mană (spori, hife, alge, etc.) s-a realizat pentru toate probele de miere, însă rezultate edificatoare a prezentat, în mod special, mierea de mană (3 probe din regiunea Transilvania) (figura 5.5).

Din clasa indicatorilor de mană întâlniți în probele de miere din România, fac parte spori ai mucegaiurilor aparținând genurilor: *Cladosporium* (identificat în majoritatea probelor de miere, nu doar în cele de mană), *Aspergillus*, *Stemphylium*, *Alternaria*, *Pleospora* iar în unele probe au fost prezente algele verzi precum *Chlorococcus* (figura 5.5). Un studiu recent din Spania bazat pe diferențierea mierii florale față de cea de mană confirmă, de asemenea, prezența unora din indicatorii de mană identificați în mierea românească [26].

Mierea comercializată cu denumirea miere de munte a avut cea mai mică valoare a HDE=175 pe gram de miere, fiind urmată de mierea de mană cu un HDE=275 pe gram de miere. Însă mierea de brad a înregistrat cea mai mare valoare a HDE=300 pe gram de miere. Aceste valori includ cele 3 probe de miere în categoria celor de mană, lucru dovedit ulterior și de anumite analize fizico-chimice care le diferențiază de tipurile de miere florală.

5.3.2. Evaluarea analizei calitative

Rezultatele obținute în urma analizei palinologice calitative arată că din cele 54 probe de miere, doar 9 intră în categoria mierii poliflorale, 3 sunt clasificate drept miere de mană și 42 probe sunt mieri monoflorale.

În cadrul mierii monoflorale, 12 probe de miere au fost clasificate ca fiind de salcâm (*Robinia pseudoacacia*), 14 probe de tei (tipul *Tilia*), 11 probe de rapiță (tipul *Brassica napus*), 4 probe de floarea-soarelui (*Helianthus annuus*) și o probă de Prunus (tipul *Prunus*).

S-au remarcat diferențe între denumirea comercială pe care a avut-o produsul în momentul achiziționării lui și clasificarea tipurilor de miere, obținută în urma examenului palinologic. Astfel, din 21 probe de miere de salcâm, achiziționate cu această denumire, doar 12 sunt din punct de vedere palinologic salcâm (*Robinia pseudoacacia*), restul intrând în categoria mierii de rapiță sau polifloră.

În cazul mierii de tei, a avut loc același fenomen (din 17 probe doar 14 fiind de tei), identificându-se ca făcând parte din acest grup o probă de floarea-soarelui și două poliflorale. Mierea achiziționată cu denumirea de păpădie a prezentat un procent de numai 5% *Taraxacum officinale*, fiind inclusă ulterior în grupul mierii poliflore.

Proporția de polen considerată necesară pentru a putea denumi o miere monofloră, utilizată în acest studiu pentru toate tipurile de miere este: pentru tipul *Brassica napus* (miere de rapiță) un procent >45% din totalul spectrului polenic, pentru *Helianthus annuus* (miere de floarea-soarelui) s-a ales un procent >45%, pentru tipul *Prunus* un procent mai mare decât 44%. *Robinia pseudoacacia* (miere de salcâm) și *Tilia* (miere de tei) fiind tipuri de polen hiporeprezentate s-au ales procente de minimum 5% respectiv 29%.

În prezentul studiu palinologic au fost identificate 77 tipuri polenice aparținând celor 35 de familii botanice corespunzătoare. Genul *Brassica napus* și *Rumex* prezintă o frecvență de apariție de 100% și respectiv 88,9% în probele de miere luate în lucru.

Tabelul 5.3. Frecvența de apariție a tuturor tipurilor polenice prezente în peste 50% din probe conform claselor de dominanță

Familie	Specie de polen	Frecvență de apariție (%)	P* (0-1%)	R* (1-3%)	I* (3-15%)	A* (15-45%)	D* >45%
Cruciferae	Tipul <i>Brassica napus</i>	100,0	1,9	7,4	25,9	37,0	27,8
Polygonaceae	<i>Rumex</i>	88,9	46,3	33,3	9,3	0,0	0,0
Rosaceae	<i>Prunus</i>	87,0	29,6	24,1	24,1	9,3	0,0
Rosaceae	<i>Rubus</i>	83,3	38,9	22,2	22,2	0,0	0,0
Fabaceae	Tipul <i>Trifolium repens</i>	81,5	40,7	22,2	16,7	1,9	0,0
Plantaginaceae	<i>Plantago</i>	81,5	48,1	25,9	5,6	1,9	0,0
Rosaceae	Tipul <i>Fragaria</i>	81,5	37,0	37,0	7,4	0,0	0,0
Fabaceae	<i>Robinia pseudoacacia</i>	77,8	33,3	5,6	31,5	5,6	1,9
Tiliaceae	<i>Tilia</i>	77,8	22,2	14,8	7,4	14,8	18,5
Fagaceae	<i>Quercus</i>	75,9	37,0	22,2	13,0	3,7	0,0
Rosaceae	Tipul <i>Crataegus monogyna</i>	75,9	44,4	27,8	3,7	0,0	0,0
Rosaceae	<i>Filipendula</i>	75,9	25,9	38,9	9,3	1,9	0,0
Asteraceae	Tipul <i>Taraxacum officinale</i>	74,1	57,4	14,8	1,9	0,0	0,0
Umbelliferae	Tipul <i>Daucus carota</i>	64,8	53,7	9,3	1,9	0,0	0,0
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	61,1	29,6	11,1	9,3	3,7	7,4
Boraginaceae	<i>Echium</i>	61,1	40,7	13,0	3,7	3,7	0,0
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	61,1	44,4	9,3	7,4	0,0	0,0
Chenopodiaceae	Tipul <i>Chenopodium</i>	57,4	51,9	5,6	0,0	0,0	0,0
Urticaceae	Tipul <i>Urtica</i>	57,4	51,9	5,6	0,0	0,0	0,0
Asteraceae	<i>Centaurea cyanus</i>	53,7	44,4	7,4	1,9	0,0	0,0
Rhamnaceae	<i>Frangula alnus</i>	51,9	38,9	9,3	3,7	0,0	0,0
Boraginaceae	Tipul <i>Symphytum officinalis</i>	50,0	38,9	7,4	3,7	0,0	0,0

Studii privind autentificarea originii botanice a mierii din Cehia relatează apariția într-o măsură semnificativă a polenului din genul *Brassica*, *Tilia*, *Robinia*, *Helianthus*, *Pomum* și mici cantități de *Phacelia*, *Taraxacum*, *Rubus* și *Trifolium*. Este evidentă similaritatea anumitor genuri de polen ce se găsesc în mierea cehă și cea românească, lucru demonstrat de asemănarea florei celor două țări.

Familiile botanice cu frecvența de apariție cea mai ridicată sunt: Cruciferae, Rosaceae, Fabaceae, Fagaceae, Umbelliferae, Boraginaceae, Chenopodiaceae și Poaceae. Cu toate că procentul de apariție a polenului din familia Chenopodiaceae și Poaceae a fost de peste 50% din totalul probelor analizate, acestea au fost prezente în cantități nesemnificativ de mici, nefăcând parte din grupul plantelor melifere.

Spectrul polenic al mierii monoflore prezintă între 12 și 42 tipuri polenice cu o valoare medie de 26 pe fiecare spectru.

Pentru un studiu detaliat al analizei palinologice calitative, tipurile de miere luate în lucru s-au împărțit în grupuri diferite, discutându-se fiecare în parte.

5.3.10. Interpretarea rezultatelor prin metoda PCA și CA

Grupurile de miere (salcâm, tei, rapiță, Prunus, floarea-soarelui, mană și polifloră) supuse analizei de varianță ANOVA au înregistrat diferențe semnificative pentru $p < 0,005$.

Pentru a demonstra grafic aceste diferențe, s-a recurs la aplicarea Analizei Componentelor Principale (analiză discriminantă) în care s-a urmărit clasificarea grupurilor de miere în funcție de cele mai importante specii de polen: *Robinia pseudoacacia*, *Tilia*, *Brassica napus*, *Prunus* și *Helianthus annuus* (figura 5.14). Procentele acestor tipuri polenice au fost ulterior integrate în software pentru toate probele de miere monoflorală, dar și pentru cea de mană.

Componentele principale sunt combinații liniare ale variabilelor originale (speciile de polen) extrase pe criteriul maximizării varianței (varianța fiind o măsură a cantității de informație reținută). Astfel, componenta 1 este reprezentată de *Tilia* și *Helianthus annuus*, componenta 2 de *Tilia* și *Brassica napus* iar componenta 3 de *Robinia pseudoacacia*, *Tilia* și *Prunus*.

Scopul analizei a fost acela de a obține un număr mic de combinații liniare din cele 5 variabile introduse (tipuri polenice), care să aibă puterea discriminatorie cea mai ridicată în probele de miere. În acest caz, 3 componente au fost extrase, deoarece 3 componente au avut valori proprii mai mare decât 1,0. Împreună, acestea reprezintă 78,76% din variabilitatea datelor originale.

În cazul clusterizării, problema constă în a grupa o colecție dată de probe neetichetate în grupuri semnificative.

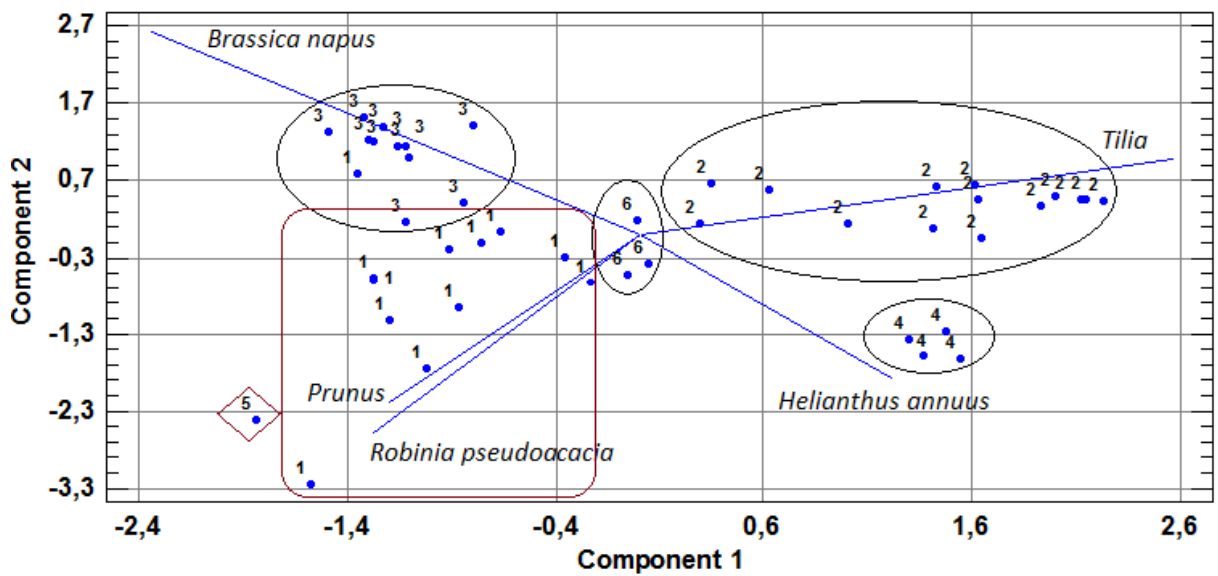


Figura 5.14. Grupurile de miere formate în urma PCA (1-salcâm; 2-tei; 3-rapiță; 4-floarea-soarelui; 5-Prunus; 6- mană)

Astfel, dendograma formează 5 grupuri diferite de miere monoflorală în funcție de variabilele cu putere discriminantă obținute în urma analizei componentelor principale (figura 5.15).

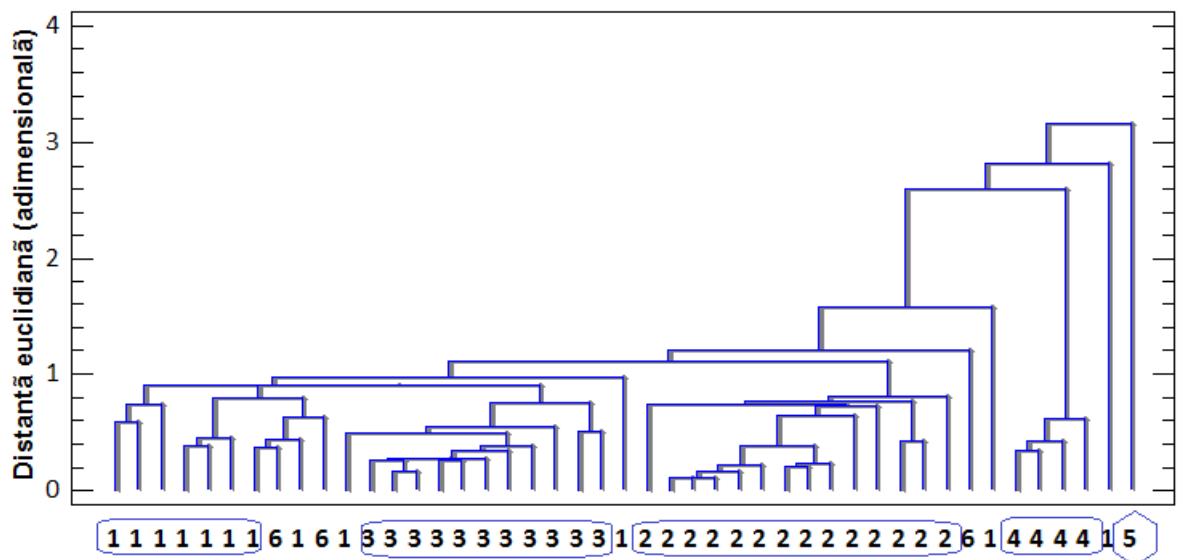


Figura 5.15. Dendograma pentru gruparea probelor de miere în funcție de originea botanică (1-salcâm; 2-tei; 3-rapiță; 4-floarea-soarelui; 5-Prunus; 6- mană)

5.4. CONCLUZII

În cazul analizei palinologice cantitative distribuția probelor de miere s-a realizat cu ajutorul clasificării lui Maurizio, probele de miere luate în lucru având o densitate polenică medie, mai mult de 50% din probe situându-se în Clasa a II-a (între 2000 și 10000 GP/g de miere).

Concentrația absolută de polen a tipurilor de miere analizate variază astfel: mierea de rapiță> mierea de Prunus> mierea polifloră> mierea de floarea-soarelui> mierea de salcâm> mierea de mană> mierea de tei.

Evidențierea indicatorilor de mană (spori, hife, alge etc.) s-a aplicat tuturor probelor de miere, însă rezultate edificatoare s-au înregistrat în mod special în cazul a 3 probe din regiunea de munte a României (declarate cu originea: brad, mană și fâneață). Mierea de brad a înregistrat cea mai mare valoare a HDE=300 pe gram de miere. Aceste 3 probe de miere au fost incluse în categoria celor de mană, lucru dovedit de anumite analize fizico-chimice efectuate ulterior.

Spectrul polenic în cazul mierii de mană înglobează în special spori de mucegai aparținând genurilor precum: *Cladosporium* (identificat în majoritatea probelor de miere, nu doar în cele de mană), *Aspergillus*, *Stemphylium*, *Alternaria*, *Pleospora*, *Leptosphaeria*, *Urediniospores* iar în unele probe au fost prezente algele verzi ca *Chlorococcus*.

Rezultatele obținute în urma analizei palinologice calitative arată că dintre cele 54 probe de miere, doar 9 au fost poliflore, 3 clasificate ca miere de mană și 42 probe intrând în categoria mierii monoflore.

În cadrul mierii monoflore, 12 probe de miere au fost clasificate ca fiind de salcâm (*Robinia pseudoacacia*), 14 probe de tei (tipul *Tilia*), 11 probe de rapiță (tipul *Brassica napus*), 4 probe de floarea-soarelui (*Helianthus annuus*) și o probă de Prunus (tipul *Prunus*).

În prezentul studiu palinologic au fost identificate 73 tipuri polenice aparținând celor 35 de familii. Tipul *Brassica napus* și *Rumex* au fost prezente în 100%, respectiv în 88,9% din totalul probelor de miere luate în lucru.

Singurul tip de polen prezent în toate cele 54 de probe (100%) a fost *Brassica napus* (rapița), acesta fiind urmat de anumite tipuri polenice din familia Rosaceae ca: *Prunus* (aici poate intra prunul, cireșul, vișinul, corcodușul, mălinul, porumbarul, migdalul pitic), *Rubus*, *Fragaria* și *Filipendula*.

Pe lângă *Robinia pseudoacacia* au fost prezente în toate probele de salcâm tipuri de polen ca *Brassica napus*, *Plantago*, *Rubus*, *Prunus*, *Fragaria*, *Filipendula*, *Rumex* și *Vitis vinifera*.

CAPITOLUL 6. CONTRIBUȚII PRIVIND CONTROLUL DE CALITATE AL MIERII ROMÂNEȘTI

6.2. MATERIALE ȘI METODE

6.2.1. Material de studiu

S-au utilizat în total 54 de probe de miere dintre care: 26 de probe din Moldova, 13 probe din Muntenia, 12 probe din Transilvania și 3 probe din Dobrogea.

6.2.2. Determinarea parametrilor fizico-chimici

Analizele fizico-chimice care s-au utilizat în controlul de calitate al mierii (pH, umiditate, conductivitate electrică, cenușă, indice colorimetric) au fost în conformitate cu metodologia oficială de analiză a mierii din Spania (standardul BOE- Boletín Oficial del Estado nr. 186/5.08.2003).

6.2.3. Determinarea parametrilor de prospețime ai mierii

Alți parametri ce au fost evaluați privind calitatea mierii au fost: HMF și activitatea invertazică și amilazică, care au fost determinați conform metodei propuse de European Honey Commission și de AOAC.

6.2.4. Determinarea compoziției nutriționale a mierii

6.2.4.1. Determinarea spectrului glucidic

Glucidele din miere au fost determinate prin metoda cromatografică de schimb anionic de înaltă performanță (HPAEC) cu un cromatograf ionic *DIONEX ICS-3000 SP* (Sunnyvale, California, E.E.U.U.) ce prezintă un detector amperometric cu pulsuri (PAD). Acest tip de cromatografie a fost dezvoltată pentru separarea glucidelor din diferite alimente [116], profitând de caracterul slab acid al carbohidraților cu scopul obținerii de separări extrem de selective la un pH ridicat, utilizând ca și faze staționare un schimbător de anioni puternic. Detecția cantitativă și calitativă depinde de caracteristicile coloanei utilizate, tipul detectorului și condițiile de lucru.

Pregătirea probei de miere pentru analiză

S-a dizolvat 1 g miere în 100 mL de apă ultrapură obținând o concentrație a soluției de miere de 10 mg/L. Apoi s-a diluat 1 mL din această soluție, cu apă ultrapură, până la un volum final de 100 mL, iar din aceasta s-au filtrat 5 mL cu ajutorul unui filtru cu diametrul

porilor de 0,45 μm , pentru a elimina orice posibilă impuritate sau granulă de polen care poate interfera în testare.

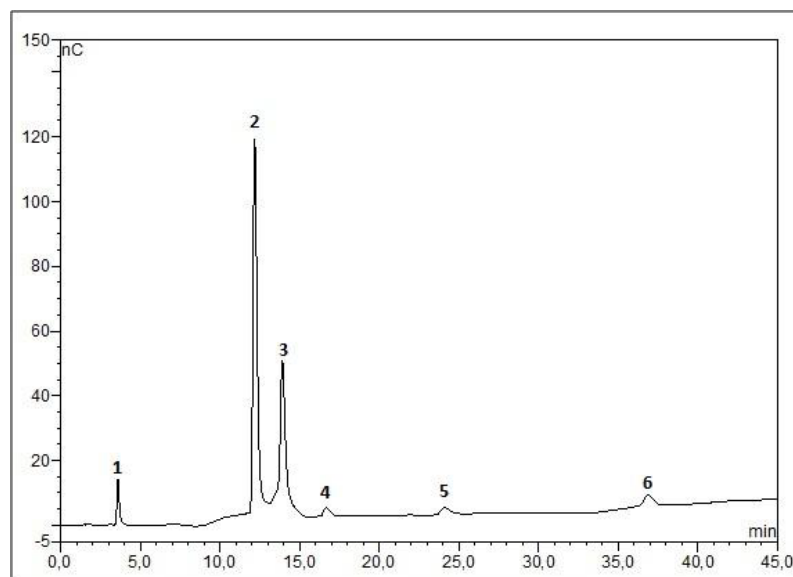


Figura 6.1. Cromatograma glucidelor standard, identificate și cuantificate cu cromatograful *DIONEX ICS-3000 SP*. 1: trehaloza; 2: glucoza; 3: fructoza; 4: zaharoza; 5: melezitoza; 6: maltoza

6.2.4.2. Determinarea lipidelor

Lipidele din miere provin în mare parte din plante și resturi de ceară, prezentând un conținut relativ scăzut. Acest nutrient a fost determinat prin metoda Soxhlet conform AOAC, care cuantifică lipidele din materia uscată cu ajutorul unui extractor automatic ce utilizează eter de petrol ca solvent.

6.2.4.3. Determinarea proteinelor

Conținutul de azot din miere provine majoritar din polen, chiar dacă și aminoacizii și enzimele aduc un aport de azot mierii [54]. Pentru determinarea proteinelor din miere s-a aplicat metoda Kjeldahl [117], care se bazează pe conversia azotului organic, prezent în proba de analizat, în sulfat de amoniu, care reacționează ulterior cu acidul sulfuric.

6.2.5. Determinarea valorii energetice

Prin valoarea energetică a unui aliment se înțelege potențialul nutrienților săi calorigeni de a furniza energie. Aceasta energie latentă din aliment se transformă în corpul uman în energie activă, pe care organismul o folosește în procesele sale (creștere,

metabolism, construcții etc.). În cazul mierii, principalele componente care furnizează energie sunt glucidele. Pentru determinarea valorii calorice a mierii românești s-a ținut cont de conținutul de proteine, lipide și carbohidrați.

6.2.6. Prelucrarea statistică a rezultatelor

În ceea ce privește prelucrarea statistică a rezultatelor obținute în urma analizelor fizico-chimice s-au utilizat două metode chemometrice multivariate: Analiza componentelor principale (PCA) și Analiza de clusterizare ierarhică (Cluster analysis). Pentru a descrie posibile corelații între parametri analizați s-a aplicat o analiză de corelație bivariată Spearman.

6.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

6.3.1. Evaluarea parametrilor fizico-chimici de apreciere a calității mierii

Mierea destinată comercializării trebuie să îndeplinească norma de calitate conform standardelor în vigoare. Calitatea mierii influențează compoziția sa, culoarea și aspectul, criterii importante în vederea achiziționării unui astfel de produs.

Primul parametru care trebuie analizat este umiditatea. Mierea este un produs foarte higroscopic iar conținutul său poate suferi modificări în timpul depozitării, cauzând o creștere în cantitatea de apă în straturile superioare. Valoarea medie a umidității probelor de miere analizate a fost de 18,7%, cu un interval de variație între 14,9 – 24,5%.

Un alt parametru analizat în prezentul studiu a fost pH-ul, a cărei valoare medie pentru cele 54 de probe analizate a fost de 4,1 variind în intervalul 3,3 – 5,7.

Pentru evidențierea grafică a diferențelor dintre grupuri privind conductivitatea electrică, s-au reprezentat într-o diagramă Box-Whisker medianele fiecărui grup de miere și limitele maxime și minime (figura 6.2).

În urma analizei ANOVA, a rezultat raportul F egal cu 15,8, fiind raportul de estimare între grupuri și în interiorul fiecărui grup. Deoarece $p < 0,005$, există o diferență statistică semnificativă între cele 7 variabile, la nivelul de încredere de 95,0%.

Este bine cunoscută corelația dintre conductivitatea electrică și cenușă în cazul mierii, astfel, acești doi parametri analizați în prezentul studiu au prezentat valori medii de 0,5 mS/cm și respectiv 0,320% iar coeficientul de corelație a fost de 0,903 (figura 6.3). O relație de linearitate între cei doi parametri studiați este susținută și de Saxena și colab. [94], obținând un coeficient de corelație egal cu 0,98. În cazul unor tipuri de miere produse în Algeria, de asemenea, s-a obținut o corelație ridicată (0,92) între conținutul de cenușă și conductivitatea electrică.

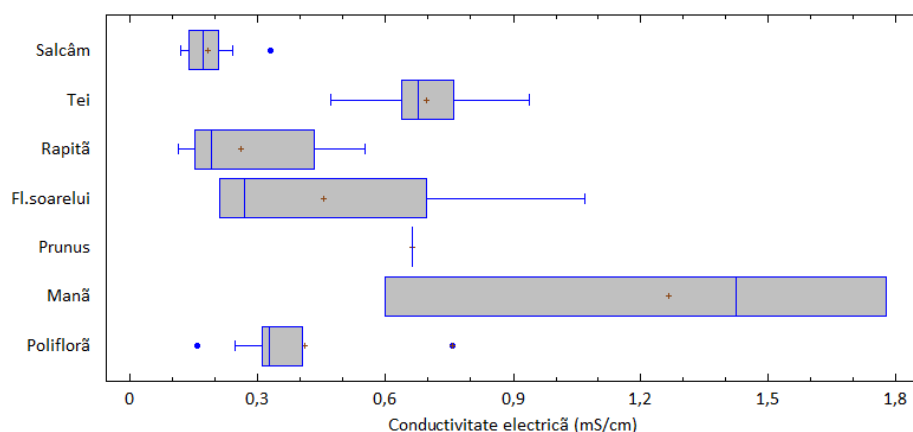


Figura 6.2. Diagrama Box-Whisker pentru conductivitatea electrică a celor 7 grupuri diferite de miere

În urma analizei ANOVA, a rezultat raportul F egal cu 15,8, fiind raportul de estimare între grupuri și în interiorul fiecărui grup. Deoarece $p < 0,005$, există o diferență statistică semnificativă între cele 7 variabile, la nivelul de încredere de 95,0%.

Este bine cunoscută corelația dintre conductivitatea electrică și cenușă în cazul mierii, astfel, acești doi parametri analizați în prezentul studiu au prezentat valori medii de 0,5 mS/cm și respectiv 0,320% iar coeficientul de corelație a fost de 0,903 (figura 6.3). O relație de linearitate între cei doi parametri studiați este susținută și de Saxena și colab. [94], obținând un coeficient de corelație egal cu 0,98. În cazul unor tipuri de miere produse în Algeria, de asemenea, s-a obținut o corelație ridicată (0,92) între conținutul de cenușă și conductivitatea electrică.

Este de remarcat conținutul ridicat de cenușă și respectiv al conductivității electrice în cazul probelor de mână. Rezultatele conductivității electrice variind, în acest caz, între 1,2 și 1,4 mS/cm, au clasat cele 3 probe ca fiind de mână. Valori destul de ridicate s-au obținut în cazul mierii de tei și a mierii de Prunus, ceea ce confirmă conținutul ridicat în săruri minerale al acestor tipuri de miere.

Probele din grupul mierii de salcâm au înregistrat cele mai scăzute valori ale conductivității, rezultat obținut și raportat într-un studiu recent și de către Mărghitaș și colab. [4] pentru mierea românească.

Culoarea, în funcție de originea florală a mierii și de compoziția sa, a avut o mare variabilitate în probele de miere analizate, de la o tonalitate de galben transparent la maro. Aceasta a fost, în principal, datorită diversității tipurilor de miere colectate din diferitele regiuni ale României.

Cu ajutorul analizei ANOVA au fost identificate diferențe semnificate între tipurile de miere în ceea ce privește culoarea la $p < 0,005$ și $F = 27,11$. Pentru evidențierea acestor

diferențe s-a utilizat diagrama Box-Whisker (figura 6.4). Din această diagramă reiese că acest parametru reprezintă un factor discriminant între mierea florală și cea de mană.

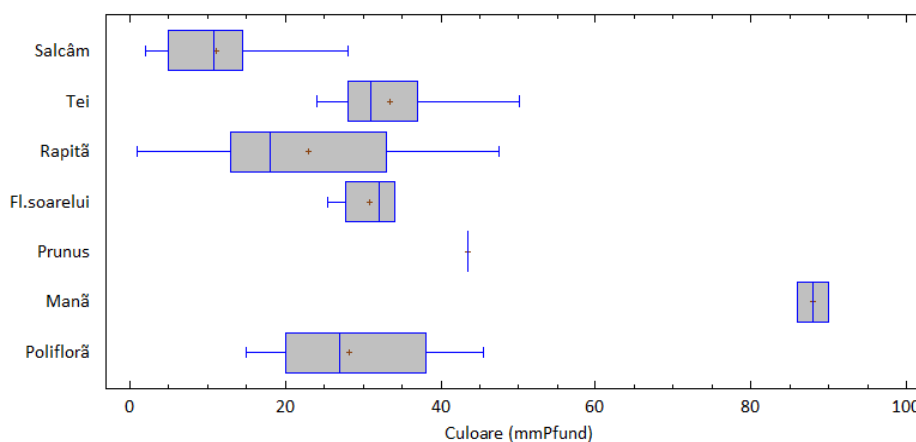


Figura 6.4. Diagrama Box-Whisker pentru culoare a celor 7 grupuri diferite de miere

Mai mulți autori au luat în considerare influența granulelor de polen (morfologie și culoare), în ceea ce privește culoarea mierii, în timp ce intensitatea de culoare a mierii se datorează pigmentilor, cum ar fi carotenoizii și unele flavonoide.

Pentru evidențierea amănunțită a rezultatelor s-au calculat parametrii statistici pentru fiecare tip de miere supus analizei (tabelul 6.7).

Conținutul de cenușă și conductivitatea electrică cele mai ridicate le-au avut mierea de mană. Aceasta este cunoscută pentru spectrul său mineral vast, dar și pentru potențialul antioxidant cel mai ridicat.

Valoarea medie a conductivității electrice în cazul mierii de salcâm (0,183 mS/cm) a fost semnificativ mai mică ($p < 0,05$) decât cea a mierii de mană (1,3 mS/cm).

Indicele colorimetric în cazul mierii românești de diferite origini florale a avut o valoare medie de 28,5 mmPfund variind între 2 mmPfund (miere de salcâm) și 90 mmPfund (miere de mană).

Conform analizei melisopalinologice a fost identificată o miere florală de Prunus. Aceasta nu a fost reprezentată în tabel deoarece nu reprezintă un grup format din mai multe probe. Aceasta a prezentat o umiditate relativ mare (20%), un indice colorimetric destul de ridicat (45 mmPfund) și un pH mediu (3,7). După mierea de tei, mierea de Prunus prezintă cel mai ridicat conținut de cenușă și conductivitatea electrică cea mai mare.

Tabelul 6.7. Analiza statistică descriptivă a parametrilor fizico-chimici studiați în diferitele tipuri de miere

Tip de miere	N	Parametri statistici	Umiditate (%)	pH	CE (mS/cm)	Cenușă (%)	Culoare (mm Pfund)
Salcâm	12	Medie ±DS	17,5 ± 0,9	3,8 ± 0,3	0,183 ± 0,05	0,05 ± 0,02	11 ± 0,4
		Min-Max	16,5 - 19,8	3,3 - 4,2	0,121-0,331	0,03 - 0,1	2,0 - 28
		Limită inf.(95%)	17,2	3,7	0,17	0,04	9
		Limităsup.(95%)	17,7	3,9	0,19	0,055	14
Tei	14	Medie ±DS	18,2 ± 1,1	4,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,05	33,5 ± 0,8
		Min-Max	14,9 - 20	3,7 - 5,7	0,5 - 0,9	0,2 - 0,4	24 - 50
		Limită inf.(95%)	17,2	4,2	0,65	0,29	28
		Limităsup.(95%)	18,4	4,6	0,73	0,31	35
Rapiță	11	Medie ±DS	18,5 ± 1,1	4 ± 0,4	0,26 ± 0,1	0,09 ± 0,01	23 ± 0,9
		Min-Max	14,9 - 20	3,5 - 4,9	0,115-0,551	0,08 - 0,12	1,0 - 48
		Limită inf.(95%)	18	3,8		0,09	21
		Limităsup.(95%)	18,8	4,1		0,1	25
Floarea-soarelui	4	Medie ±DS	22,4 ± 0,7	3,9 ± 0,2	0,454 ± 0,1	0,17 ± 0,02	31 ± 0,4
		Min-Max	19,2 - 24,5	3,6 - 4,1	0,210-1,070	0,15 - 0,2	26 - 34
		Limită inf.(95%)	19,2	3,8	0,4	0,16	29
		Limităsup.(95%)	19,4	4	0,5	0,17	32
Polifloră	9	Medie ±DS	19,2 ± 0,1	4 ± 0,4	0,4 ± 0,02	0,14 ± 0,02	28 ± 0,9
		Min-Max	16,9 - 23,1	3,4 - 4,6	0,16 - 0,76	0,11 - 0,18	15 - 45
		Limită inf.(95%)	3,9	3,8	0,38	0,13	26
		Limităsup.(95%)	3,9	4,2	0,42	0,15	30
Mană	3	Medie ±DS	17,4 ± 0,9	4,4 ± 0,3	1,3 ± 0,05	1,2 ± 0,1	88 ± 0,7
		Min-Max	15,8 - 18,7	3,8 - 4,8	0,6 - 1,8	1 - 1,5	86 - 90
		Limită inf.(95%)	17	4,3	1	1	87
		Limităsup.(95%)	17,6	4,5	1,4	1,3	89

6.3.2. Evaluarea parametrilor de caracterizare a prospețimii mierii

Activitatea amilazică și conținutul de HMF sunt parametrii care sunt folosiți în principal pentru a evalua gradul de prospețime al mierii.

Valoarea amilazei variază foarte mult între tipurile de miere analizate, normele legislative permițând un minim de 8 pe scara Gothe. În cazul valorilor mai mici, poate fi considerat că mierea a fost supusă unui tratament termic (cu excepția mierii cu un conținut scăzut de enzime care permite un minim de 3 ID, cu condiția ca valoarea de HMF să fie mai mică de 15 mg/kg).

Conținutul amilazei a fost mai mic decât 8 ID în cazul a 5 probe de miere, acestea prezentând valori ale HMF mai mari de 15 mg/kg (salcâm, tei, rapiță, polifloră). Se presupune că aceste probe au fost supuse unui tratament termic inadecvat.

Cele 3 probe de mană au înregistrat cele mai mari valori ale conținutului de HMF. În cazul uneia din probele de salcâm, aceasta a fost eliminată din grup datorită conținutului de HMF de 56,2 mg/kg de miere, ceea ce depășește cu mult limita maximă admisă de standardele în vigoare (atât la nivel național, cât și internațional). După eliminarea acestei probe, grupul de salcâm a atins un conținut mediu de HMF de 3,8 mg/kg. După mierea de mană s-a situat mierea de rapiță, cu un conținut mediu de HMF de 5,5 mg/kg. Acest lucru se explică prin faptul că unele probe de rapiță au fost colectate în anul 2009 și implicit au un conținut mai ridicat în HMF, fiind depozitate o perioadă mai mare de timp. În rest, după cum se observă în grafice, conținutul de HMF s-a menținut constant, prezentând valori inferioare lui 40 mg/kg, chiar apropiate de zero.

Valoarea medie a indicelui amilazic a celor 54 probe de miere luate în lucru a variat între 3,5 Gothe și 19,4 Gothe. Media indicelui amilazic pe grupurile de miere a variat între 16,7 Gothe pentru mierea de Prunus și 9,5 Gothe pentru mierea de floarea-soarelui. Trei din totalul probelor au fost eliminate ca fiind suspecte de falsificare prin adaos de sirop de zahăr dar supuse și unui tratament termic brutal, acestea înregistrând valori nule (două probe de tei și una polifloră).

O altă enzimă cuantificată în prezentul studiu a fost invertaza. Pentru ca o miere să nu fie suspectă de falsificare, indicele invertazic poate lua valori în intervalul 4 - 26 IN, însă International Honey Commission propune valori minime ale invertazei în cazul unei mieri de calitate.

Toate grupurile de miere s-au încadrat în norma prevăzută de legislația în vigoare în ceea ce privește activitatea invertazică, cu excepția a 2 probe ce au prezentat valori nule ale activității acestei enzime.

În concluzie, șase probe de miere au prezentat valori aberante ale indicatorilor de prospețime studiați și ca urmare acestea au fost eliminate din grupul de miere supuse analizelor, suspectate ca fiind falsificate prin adaosuri ilicite și/sau supuse unor tratamente termice brutale.

6.3.3. Evaluarea valorii energetice a mierii

6.3.3.1. Spectrul glucidic al mierii

S-au identificat și cuantificat prin metode cromatografice șase zaharuri: glucoza, fructoza, zaharoza, maltoza, trehaloza și meleziatoza. Zaharurile constituie componentul principal al mierii iar valoarea medie a zaharurilor totale pentru probele de miere analizate a fost 76,5%, intervalul variind între 53,2% și 89,7%.

Fructoza și glucoza reprezintă glucidele majoritare ale mierii de albine, fiind întotdeauna peste 50% din totalul zaharurilor. În cazul probelor de miere analizate, concentrația medie a fost de 73,2%, având o valoare minimă de 48,8% și cea maximă de 87,5%. Restul zaharurilor precum maltoza, zaharoza, trehaloza și meleziatoza constituie glucidele minoritare ale mierii, acestea prezentând o valoare medie de 3,2%. De subliniat este faptul că meleziatoza și trehaloza au fost identificate în foarte puține probe analizate.

Tabelul 6.7. Analizele descriptive ale glucidelor identificate

Zaharuri	Analize statistice	Salcâm (n=12)	Tei (n=14)	Rapiță (n=11)	Floarea-soarelui (n=4)	Polifloră (n=9)	Mană (n=3)	Valoarea p*
Glucoză [%]	Medie±DS	29,74±1,8	33,27±3,58	37,2±5,56	38,7±2,0	32,83±2,21	28,22±6,9	0,000
	Min - Max	27,26-33,47	24,62-37,26	28,81-46,84	36,77-41,68	29,05-36,47	21,35-35,18	
Fructoză [%]	Medie±DS	40,37±2,8	38,70±3,08	41,13±1,84	39,49±3,05	41,63±5,22	37,66±5,45	0,054
	Min - Max	19,33-45,46	31,75-45,52	38,53-43,82	36,54-43,63	33,5-51,61	31,90-42,73	
Zaharoză [%]	Medie±DS	2,26±1,51	1,47±0,17	1,46±0,13	1,43±0,01	1,5±0,2	1,82±0,69	0,059
	Min - Max	1,34-5,41	1,33-1,97	1,35-1,80	1,43-1,44	1,38-1,97	1,41-2,61	
Maltoză [%]	Medie±DS	1,92±0,54	1,37±0,54	1,21±0,45	1,27±0,28	1,63±0,35	1,50±0,79	0,053
	Min - Max	1,19-3,02	0,77-2,20	0,70-1,81	1,10-1,70	1,10-2,16	0,9-2,39	
Melezitoză [%]	Medie±DS	0	0	0	0	0	0,63±0,57	0,000
	Min - Max	0	0	0	0	0	0-1,10	
Trehaloză [%]	Medie±DS	0	0	0	0	0	0,33±0,58	0,003
	Min - Max	0	0	0	0	0	0-1,0	
G+F [%]	Medie±DS	70,11±5,20	71,97±6,03	78,32±5,06	78,19±4,79	74,46±6,24	65,88±12,34	0,002
	Min - Max	48,76-74,46	58,10-81,41	70,79-87,53	74,93-85,31	62,55-84,45	53,25-77,91	
Zaharuri totale [%]	Medie±DS	74,29 ± 5,2	74,81 ± 5,95	81 ± 4,81	80,9 ± 5,08	77,6 ± 6,3	70,16 ± 5,1	0,004
	Min - Max	53,19-80,83	60,92-83,66	73,97-89,74	77,47-88,45	65,3-87,3	55,8-81,03	
F/G	Medie±DS	1,36±0,15	1,17±0,11	1,13±0,20	1,02±0,06	1,27±0,15	1,36±0,14	0,005
	Min - Max	0,66-1,67	1,03-1,49	0,87-1,51	0,95-1,08	1,07-1,57	1,21-1,49	
G/Apă	Medie±DS	1,7±0,13	1,81±0,31	2,03±0,4	1,74±0,18	1,74±0,25	1,62±0,36	0,058
	Min - Max	0,45-1,98	1,27-2,41	1,41-2,88	1,55-1,92	1,26-2,04	1,21-1,88	

Următorul glucid ca pondere este glucoza care a prezentat variații importante, prezentând o valoare medie de 33,2%.

Mierea de salcâm a prezentat o valoare medie a acestor două zaharuri predominante de 70,11% cu o valoare medie a glucozei de 29,74% și a fructozei de 40,37%. În cazul unei singure probe de salcâm zaharurile majoritare au prezentat cele mai scăzute valori: glucoza fiind de 29,42% și fructoza de 19,33%. Această probă a fost singura care a înregistrat cea mai mare valoare a maltozei și anume 3%, iar conținutul de HMF a depășit limitele impuse de normele în vigoare fiind de 56,2 mg/kg. Proba a fost supusă unui tratament termic brutal, fapt dovedit de concentrația foarte scăzută în fructoză, care a fost transformată în HMF în urma încălzirii la temperaturi ridicate (mai mari de 50°C), mai mult aceasta a fost falsificată prin adaos ilicit de sirop de porumb, dovada fiind conținutul ridicat în maltoză.

Glucidele minoritare cuantificate (zaharoză, maltoză, trehaloză și melezitoză) au fost prezente în mierea de salcâm într-o concentrație medie de 4,18% - această valoare fiind cea mai ridicată dintre toate tipurile de miere florală analizate. În cazul acestui tip de miere, spectrul glucidelor a fost format din toate glucidele identificate mai puțin melezitoză și trehaloză. Conținutul mediu de zaharoză din mierea de salcâm a prezentat o valoare medie de 2,26% cu un minim de 1,34% și un maxim de 5,41%. Aceste valori clasează din nou mierea de salcâm ca fiind mierea cu cel mai ridicat conținut de zaharuri minoritare.

Mierea cu cel mai ridicat conținut al zaharurilor predominante a fost reprezentată de grupul rapiță. Valoarea medie a sumei dintre glucoză și fructoză a fost de 78,33% cu o valoare medie a glucozei de 37,2% și a fructozei de 41,13%. În cazul unei probe de rapiță care a prezentat cele mai ridicate valori, conținutul de glucoză a fost de 46,84%, mult mai mare decât conținutul de fructoză care a prezentat valoarea 40,69%. Această probă, ca majoritatea celor de rapiță, a prezentat fenomenul de cristalizare și consistență cremoasă datorită dimensiunii mici a cristalelor. Concentrația maximă de glucoză detectată în urma acestui studiu pentru mierea românească a fost prezentă în cazul unei mieri de rapiță având valoarea 46,84%. Conținutul în glucide minoritare a fost relativ mediu, de 2,67%.

Mierea ce a urmat celei de rapiță în ceea ce privește conținutul ridicat al celor două glucide majoritare a fost mierea de floarea-soarelui. Valoarea medie a sumei dintre glucoză și fructoză a fost de 76,19% cu o valoare medie a glucozei de 38,7% și a fructozei de 39,49%. Proba cu cea mai ridicată valoare în conținut glucidic predominant a prezentat o concentrație a glucozei de 41,62% și a fructozei de 46,84%. În cazul acestui grup, cristalizarea a avut loc în timp, însă cristalele formate au prezentat dimensiuni mari (peste 0,5 mm). Concentrația glucidelor minoritare a avut o valoare medie de 2,7%, similară cu cea a mierii de rapiță studiată.

Mierea polifloră a urmat ca și valoare mierii de floarea-soarelui, concentrația medie a glucozei și fructozei fiind de 74,46%. Concentrația maximă de fructoză detectată în urma acestui studiu pentru mierea românească a fost prezentă în cadrul unei mieri poliflore, având valoarea de 51,6%. Mierea polifloră a prezentat un conținut relativ ridicat față de celelalte tipuri de miere în ceea ce privește conținutul de glucide minoritare, anume 3,13%.

Mierea de mană a prezentat cele mai scăzute valori ale glucidelor majoritare și cele mai ridicate valori ale glucidelor minoritare. Acest tip de miere, față de mierea florală, a prezentat în spectrul glucidic toate zaharurile analizate. Spre exemplu, melezițoza a fost detectată doar în mierea de mană, prezentând o valoare medie de 0,63%. Valoarea medie a sumei dintre glucoză și fructoză a fost de 65,88%, cu o valoare medie a glucozei de 28,22% și a fructozei de 37,66%.

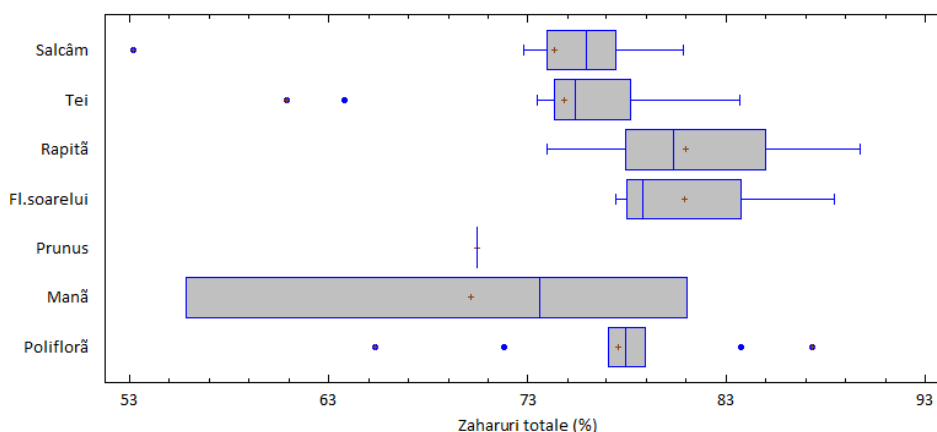


Figura 6.7. Diagrama Box-Whisker pentru conținutul de zaharuri totale a celor 7 grupuri diferite de miere

6.3.3.2. Conținutul în proteine și lipide

Conținutul mediu de proteine al probelor de miere analizate a fost de 0,66% prezentând variații în intervalul 0,25%, în cazul unei mieri de rapiță, și 1,3%, aparținând unei mieri de mană. Media conținutului proteic pe grup de miere a prezentat variații importante după cum urmează: miere de mană (1,05%), miere de tei (0,86%), miere de Prunus (0,85%), miere de floarea-soarelui (0,72%), miere polifloră (0,66%), miere de salcâm (0,52%), miere de rapiță (0,42%).

Conținutul proteic, deși este prezent în concentrații joase, a prezentat variații între tipurile de miere analizate. Astfel, conform analizei de varianță ANOVA, mierea de mană a prezentat diferențe semnificative ($p < 0,05$) față de tipurile de miere florală.

Conținutul de lipide din miere depinde în primul rând de urmele de ceară pe care aceasta le poate conține. În orice caz, această valoare este întotdeauna foarte aproape de zero.

În cazul mierii românești supuse analizei, conținutul lipidic a prezentat o valoare medie de 0,03%, cu un minimum de 0 (pentru majoritatea probelor) și un maximum de 0,35% (pentru o probă de rapiță). Lipidele au putut fi cuantificate în 11% din totalul probelor (6 probe). Nu s-au găsit diferențe semnificative pentru conținutul lipidic între tipurile de miere analizate.

6.3.3.3. Valoarea energetică a mierii românești

Valoarea calorică a mierii se bazează pe conținutul de glucide, grăsimi și proteine, în principal. Variațiile în compoziția mierii pentru acești compuși influențează în mod direct valoarea energetică.

Valoarea calorică medie a fost de 309 kcal/100 g, cu valori minime și maxime cuprinse în intervalul 214,1 și 360,4 g kcal/100g. Intervalul de încredere de 95% pentru medie s-a situat între 280,8 și 320,8 kcal/100g.

Diferențe semnificative ($p < 0,05$) pentru valoarea calorică au prezentat grupurile de salcâm, Prunus și mană, cu cele mai scăzute valori medii față de mierea de rapiță și cea de floarea-soarelui. Acest fapt este datorat conținutul ridicat de glucide din aceste două tipuri de miere. Mierea de mană, față de mierea florală, a înregistrat cea mai mică valoare medie, de 284,8 kcal/100g, acest parametru putând discrimina mierea florală de cea de mană.

Tabelul 6.9. Valoarea energetică (Kcal/100g) calculată pentru tipurile de miere analizate

Tip miere	N	Valoare energetică (kcal/100g)				
		Medie	DS	Min	Max	Lim inf-lim sup (95%)
Salcâm	12	299,4	0,9	214,1	325,2	290,2-300,6
Tei	14	303,1	0,7	250,2	337,8	300,4-308,4
Rapiță	11	326	0,6	297,1	360,4	320,8-328,2
Floarea-soarelui	4	326,5	0,6	311,7	356,5	321,4-329,8
Prunus	1	287,1	-	-	-	-
Polifloră	9	313,1	0,9	266,3	352,1	305,2-316,6
Mană	3	284,8	1	227,8	327,1	278,8-292,6

6.4. CONCLUZII

Mierea testată a prezentat un grad de prospețime și o calitate corespunzătoare. Doar șapte probe au avut un conținut de umiditate de peste 20%, care este limita stabilită de către standardul de calitate de miere pentru acest parametru. Umiditatea fiind unul dintre parametrii care oferă informații despre calitatea mierii, în special existența sau nu a unei posibile fermentații. Un alt parametru important, care, de data aceasta, nu doar caracterizează diferite tipuri de miere, ci informează asupra autenticității sursei florale, este conductivitatea electrică. Astfel, în cazul unei mieri monoflorale, conductivitatea electrică are valori inferioare lui 0,8 mS/cm, în timp ce mierea de mană înregistrează doar valori mai mari decât 0,8 mS/cm. Variația pH-ului s-a situat în intervalul 3,8 și 4,6, respectând cerințele standardelor europene și internaționale.

Probele de mană (n=3) au înregistrat cele mai mari valori ale conținutului de HMF. Pe locul al 2 lea, după mierea de mană, s-a situat mierea de rapiță cu un conținut mediu de HMF de 5,5 mg/kg. În cazul uneia din probele de salcâm, aceasta a fost eliminată din grup datorită conținutului de HMF de 56,2 mg/kg de miere, ceea ce depășește cu mult limita maximă admisă de standardele în vigoare.

Toate grupurile de miere s-au încadrat în norma prevăzută de legislația în vigoare în ceea ce privește indicele invertazic. Însă trebuie subliniat faptul că în cazul unei probe de tei, valoarea indicelui invertazic a depășit cu mult limita legală fiind, de 33,6 IN (243 U/kg). Acest fapt a condus ulterior la eliminarea acestei probei din grupul de tei supus analizelor, considerându-se ca fiind supusă unui tratament termic brutal.

Media indicelui amilazic pe grupurile de miere a variat între 16,7 U Gothe pentru mierea de Prunus și 9,5 U Gothe pentru mierea de floarea-soarelui, respectând legislația în vigoare. Trei din totalul probelor au fost eliminate ca fiind suspecte de a fi falsificate prin adaos de sirop de zahăr dar și supuse unui tratament termic brutal, acestea înregistrând valori nule (doua probe de tei și una polifloră).

Carbohidrații sunt componentele majore nutritive care oferă cea mai mare valoare energetică mierii, aceasta situându-se în intervalul 214,1 kcal/100g pentru proba de salcâm suspectată de a fi falsificată și 360,4 kcal/100g pentru o miere de rapiță. Glucidele cuantificate (fructoza, glucoza, zaharoza, maltoza, trehaloza și meleziatoza), ajung la o valoare medie de 76,5%. Mierea de mană a avut cel mai scăzut conținut de monozaharide, însă aceasta a prezentat cel mai ridicat nivel de oligozaharide. Conținutul mediu de lipide este de 0,01%, acesta nu prezintă nicio dependență față de originea botanică sau geografică. Conținutul mediu al proteinelor prezente în mierea din România a fost de 0,66%.

CAPITOLUL 7. EVOLUȚIA ÎN TIMP A COMPORTAMENTULUI REOLOGIC AL MIERII DE ALBINE ANALIZATE

7.2. MATERIALE ȘI METODE

În prezentul studiu s-au utilizat 54 de probe de miere de diferite origini florale dintre care: 26 de probe din Moldova, 13 probe din Muntenia, 12 probe din Transilvania și 3 probe din Dobrogea.

Tehnica de analiză

Proprietățile reologice dinamice și comportamentul la curgere al probelor de miere au fost determinate cu reometrul TA AR 2000 (TA Instruments Inc., New Castle, DE, USA), utilizând o geometrie paralelă cu diametrul de 40 mm și unghiul de 2° iar distanța dintre cele două plăci (geometrie și placa Peltier) a fost setată la 1000 μm. Temperatura a fost reglată cu ajutorul unei băi de apă recirculantă JULABO AWC100 și un sistem Peltier. Datele

experimentale ale măsurătorilor reologice au fost obținute cu ajutorul unui program de calcul TA Data Analysis software V 4.8.3.

În prima parte a studiului s-au aplicat teste de dinamică oscilatorie, urmând ulterior să fie evaluat comportamentul mierii de albine la curgere pentru diferite temperaturi și într-un domeniu vast de viteze de deformare.

De obicei proprietățile vâscoelastice ale unui material sunt independente de deformare până la un nivel critic de deformare.

7.2.1. Testul de creștere progresivă a deformării (engl. Strain Sweep Test, baleiaj de deformare)

7.2.2. Testul de creștere progresivă a frecvenței (engl. Frequency Sweep Test, baleiaj de frecvență)

7.2.3. Testul de curgere în trepte (engl. Flow Step)

7.2.4. Testul de creștere progresivă a temperaturii

7.2.5. Metode statistice de prelucrare și interpretare a rezultatelor experimentale

- ❖ Analiza de clusterizare ierarhică (Cluster analysis)
- ❖ Analiza de varianță dispersională ANOVA

7.3. REZULTATE SI DISCUȚII

Având în vedere importanța tot mai mare a calității în etape precum manipularea, depozitarea, procesarea (centrifugarea fagurilor, filtrarea mierii), controlul de calitate și analiza senzorială a mierii, s-a realizat evoluția în timp a comportamentului reologic prin aplicarea a trei determinări.

Primul test reologic aplicat a fost testul de baleiaj de deformare în urma căruia a fost obținută amplitudinea parametrului $\tan \delta$ (G''/G'), aceasta reflectând puterea forțelor coloidale existente. În cazul în care $\tan \delta$ este subunitar, se înțelege că particulele sunt aglomerate datorită forțelor coloidale iar sedimentarea poate apărea cu ușurință. În prezentul studiu $\tan \delta$ a înregistrat valori între 55 și 161, lucru ce demonstrează faptul că particulele intermoleculare ale mierii sunt neasociate, fără posibile aglomerări sau sedimentări, acest fapt fiind raportat și de către Franck, în cercetările sale.

Cu ajutorul celei de-a doua metodă, baleiajul de frecvență, s-au determinat valorile lui G' și G'' și unghiul δ în funcție de frecvența aplicată. S-a utilizat o frecvență între 0,4775 - 47,75 Hz echivalentul lui 3 - 300 rad/s.

Modulul vâscos G'' (modul de pierdere a energiei) a înregistrat valori mult mai mari decât cel elastic G' (modul de înmagazinare a energiei) determinând astfel caracterul fluid al mierii, acestea clasându-se în categoria fluidelor vâscoase atât în cazul analizei aplicate în 2010, cât și în 2011, asupra aceluiași probe de miere.

Se poate observa în figura 7.3 următoarea ordine descrescătoare în ceea ce privește modulul de vâscozitate pentru fiecare grup de miere supus analizei în anul 2010: mană, salcâm, rapiță, polifloră, floarea-soarelui și tei. De asemenea, este de remarcat suprapunerea, ca și valori a lui G'' , în cazul mierii de rapiță și cea polifloră (3155 respectiv 3245 Pa). Valorile modulului de vâscozitate cele mai ridicate le-a înregistrat mierea de mană (4220 Pa), în timp ce mierea de tei a avut cele mai scăzute valori (1217 Pa). La un prim examen vizual, mierea de mană și cea de salcâm au prezentat cea mai ridicată vâscozitate, pe când cea de rapiță a prezentat fenomenul de cristalizare cu granule foarte fine. Se știe că mierea de rapiță poate cristaliza direct în fagure dacă nu este extrasă la timp, acest fapt datorându-se conținutului de glucide destul de ridicat (în cazul prezentului studiu, în medie 37,2% glucoză și 41,13% fructoză).

În cazul aceleiași analize, însă după un an și jumătate, s-au obținut rezultate edificatoare care au confirmat faptul că mierea de albine este un aliment viu. Se observă din figura 7.4 o creștere a modulului de vâscozitate de aproape 2 ori comparativ cu G'' al probelor de miere analizate în anul 2010.

Modificarea vâscozității în cazul probelor de miere analizate în acest studiu la diferență de 18 luni sugerează prezența unor transformări continue atât la nivel molecular cât și structural, sub aspect fizico-chimic și biochimic.

Această afirmație este întărită științific prin studiul diferiților parametri fizico-chimici care au condus la această observație, cum ar fi: spectrul glucidic analizat prin tehnici moderne cromatografice, dar și activitatea enzimatică (amilazică, invertazică) a probelor de miere.

Se observă ordinea descrescătoare, cu unele modificări privind G'' , a unor grupuri de miere: mană, salcâm, polifloră, tei, rapiță și floarea-soarelui.

Valorile lui G'' au fost cele mai ridicate în cazul mierii de mană (6990 Pa), pe când mierea de floarea-soarelui, de această dată, a înregistrat cele mai scăzute valori (1645 Pa). De asemenea la examenul vizual în ceea ce privește mierea de mană, vâscozitatea acesteia a fost destul de crescută (fără prezența vreunui fenomen de cristalizare), pe când mierea de floarea-soarelui cristalizase puternic, prezentând o granulație avansată.

Mierea de rapiță a prezentat un comportament reologic special față de restul probelor de miere analizate, G'' s-a modificat în cazul acesteia de la o valoare maximă de 3155 Pa (în anul 2010) la o valoare maximă de 1737 Pa (2011). S-a observat că mierea de rapița este singura din grupul celor studiate sub aspect reologic care a prezentat un modul de vâscozitate mult mai scăzut, după un an și jumătate, comparativ cu celelalte grupuri, care au prezentat o creștere semnificativă privind vâscozitatea.

În tot acest timp, au loc procese de transformare continuă a zaharurilor, dar și a enzimelor, fapt ce explică existența unei corelații între zaharuri și vâscozitate chiar și după 1 an și jumătate de la extragerea mierii din fagure. Grupul mierii de rapiță a fost singurul din acest punct de vedere care a prezentat cele mai ridicate valori ale glucidelor identificate și cuantificate prin HPAEC-PAD: glucoză, fructoză, zaharoză, maltoză, trehaloză, melelitoză.

Valoarea medie a sumei dintre glucidele majoritare (glucoză și fructoză) în cazul mierii de rapiță, s-a situat între minimum 70,79 – maximum 87,53%.

7.3.1. Profilul reologic al mierii de salcâm

În urma analizei denumită baleiaj de frecvență s-a observat valoarea destul de ridicată a modului vâscos G'' (cu un maxim de 3987 Pa în anul 2010 și 5545 Pa în anul 2011), comparativ cu modulul de elasticitate care a înregistrat valori medii între 7,99 Pa (anul 2010) și 72 Pa (cea mai mare valoare medie dintre toate tipurile de miere analizate în anul 2011). Prezența elasticității ridicate în cazul mierii de salcâm se poate datora unei cantități aproape duble de fructoză (valoarea medie 42,3%) comparativ cu glucoza (valoarea medie 29,7%). Acest fenomen apare predominant în cazul mierii de salcâm.

În cea de-a doua parte a studiului s-au trasat reogramele (curbe de curgere) probelor de salcâm la diferite temperaturi: 10°C, 20°C, 30°C și respectiv 40°C, pentru anul 2011, iar pentru anul 2010, doar 20°C, 30°C și 40°C.

S-a observat ulterior că în cazul temperaturii de 10°C, structura moleculară a unor probe de miere a fost distrusă la viteza de forfecare utilizată (care a crescut de la 0,1 la 500 forfecări/s).

Mierea de salcâm analizată în anul 2010 a prezentat comportament reologic newtonian, dovada fiind reprezentată de suprapunerea curbelor de curgere la încărcare și descărcare. Răspunsul materialului la gradientul de deformare aplicat cu o viteză de forfecare de la 0,1 la 500 forfecări/s și viceversa a urmat același traseu, fapt ce confirmă existența memoriei materialului studiat.

La temperatura de 20°C, valoarea maximă a tensiunii de deformare a fost de 3381 Pa la încărcare și 4021 Pa la descărcare. În timp ce, la temperatura de 40°C, valoarea tensiunii de deformare a scăzut până la 0,09 Pa la încărcare, respectiv 121,7 Pa la descărcare.

Atât vâscozitatea cât și tensiunea de deformare scad odată cu creșterea temperaturii datorită unei dizolvări ale cristalelor de zahăr din miere.

Mierea de salcâm analizată în anul 2011 a prezentat comportament reologic diferit, și anume newtonian dovada fiind apariția buclei de histerezis care confirmă prezența fenomenului de tixotropie.

Comportarea tixotropă este evidențiată în figura 7.6, manifestându-se printr-o descreștere izotermă a vâscozității la creșterea progresivă a vitezei de forfecare, ca urmare a destructurării probelor analizate. La descreșterea progresivă a vitezei de forfecare are loc o restructurare a mierii. Dar viteza de restructurare este mai mică decât cea de destructurare motiv pentru care reogramele probelor de salcâm prezintă bucle de histerezis.

La temperatura de 20°C valoarea maximă a tensiunii de deformare a fost de 4256 Pa la încărcare și 4195 Pa la descărcare. În timp ce, la 40°C, valoarea tensiunii de deformare a scăzut până la 0,1 Pa la încărcare, respectiv 0,19 Pa la descărcare.

În figurile 7.5 și 7.6 poate fi observată diferența comportamentului reologic al mierii de salcâm după 1 an și jumătate, fapt datorat spectrului polenic și spectrului glucidelor.

Acest mecanism de destructurare-restructurare al mierii de salcâm este interpretat de Smanalieva și Senge [22] ca fiind datorat solubilității mono- și dizaharidelor și gradului de saturație al soluțiilor ce se formează în intervalul de temperatură la care au avut loc analizele.

Juszczak și Fortuna [23] au studiat comportamentul reologic al unor tipuri de miere (salcâm, tei, hrișcă, rapiță, polifloră și mană) din Polonia, și au conchis că toate probele de miere au manifestat comportament newtonian, fără apariția vreunui fenomen de tixotropie sau dilatanță.

De asemenea, Lazaridou și *colab.* [21] au evaluat comportamentul reologic dar și proprietățile termale ale mierii de albine (mană și florală). Din nou, s-a înregistrat un caracter newtonian specific tuturor probelor supuse analizei.

7.3.2. Profilul reologic al mierii de tei

Din acest grup au făcut parte 14 probe de miere de tei din diferite regiuni ale României, predominând zona Moldovei.

În urma analizei denumită baleiaj de frecvență se observă valoarea destul de ridicată a modulului vâscos G'' (cu un maxim de 1217 Pa în anul 2010 și 3925,4 Pa în anul 2011) comparativ cu modulul de elasticitate care a înregistrat valori medii între 13,8 Pa (anul 2010) și 33,3 Pa (anul 2011).

Din reograma mierii de tei analizată în anul 2010 se observă prezența comportamentului reologic newtonian, dovada fiind suprapunerea curbelor de curgere la încărcare și descărcare. Răspunsul materialului la deformarea aplicată cu o viteză de forfecare de la 0,1 la 500 1/s și viceversa a urmat același traseu, fapt ce confirmă existența memoriei materialului studiat (atât în cazul mierii de tei, cât și a celei de salcâm).

La temperatura de 20°C, valoarea maximă a tensiunii de deformare a fost de 845,9 Pa la încărcare și 845,4 Pa la descărcare (mult mai scăzută comparativ cu tensiunea de deformare a mierii de salcâm). În timp ce, la temperatura de 40°C, valoarea tensiunii de deformare a scăzut până la 0,03 Pa la încărcare, respectiv 0,04 Pa la descărcare.

Mierea de tei analizată în anul 2011 a prezentat comportament reologic diferit, și anume neneutronian, formând buclă de histerezis.

Comportarea tixotropă a mierii păstrate 18 luni este evidențiată în figura 7.8, manifestându-se printr-o descreștere izotermă a vâscozității la creșterea progresivă a vitezei de forfecare, ca urmare a deștrurării probelor analizate (ca și în cazul mierii de salcâm). La descreșterea progresivă a vitezei de forfecare are loc o restructurare a mierii.

7.3.3. Profilul reologic al mierii de rapiță

În urma analizei denumită baleiaj de frecvență s-a observat o valoare destul de ridicată a modulului vâscos G'' (cu un maxim de 3155 Pa în anul 2010 și 1737 Pa în anul 2011) comparativ cu modulul de elasticitate care a înregistrat valori medii între 222,9 Pa (anul 2010) și 16,5 Pa (anul 2011).

Mierea de rapiță analizată în anul 2010 a prezentat proprietăți reologice diferite față de cele studiate anterior, fiind tipul de miere care a manifestat comportament nenewtonian.

Se poate observa prezența curbei de tixotropie formată la temperatura de 20°C, ceea ce include mierea de rapiță în categoria fluidelor nenewtoniene. Acest fapt poate fi explicat atât din perspectivă palinologică, cât și a compoziției chimice. De exemplu, în prezentul studiu, în spectrele polenice ale mierii de rapiță, tipul *Brassica napus* a fost hiper-reprezentat, fiind prezent în concentrații foarte ridicate comparativ cu celelalte tipuri de miere (80-95%). Abundența polenului de rapiță a condus ulterior la concluzia că densitatea polenică influențează concentrația de zaharuri din miere, deoarece mierea de rapiță a înregistrat cele mai ridicate valori ale zaharurilor, ajungând până la 90%.

Mierea de rapiță analizată în anul 2011 s-a comportat ca un fluid nenewtonian. Prezența buclei de histerezis din figura 7.10 confirmă apariția fenomenului de tixotropie.

În acest caz însă, mierea de rapiță posedă un comportament diferit față de celelalte 5 tipuri de miere studiate. Se poate observa, cum la temperatura de 10°C atât la creșterea progresivă a vitezei de forfecare cât și la descreștere, structura moleculară a mierii de albine este distrusă, refăcându-se foarte lent. În acest caz, o viteză de forfecare mai mare de 180 1/s conduce la destructurarea totală a mierii de rapiță, în condiții similare.

În schimb, în cazul temperaturii de 20°C, probele de rapiță analizate prezintă o buclă perfectă de histerezis, valoarea maximă a tensiunii de deformare fiind în acest caz de 1426 Pa la încărcare și 1385 Pa la descărcare (valori mult mai scăzute față de cele din anul 2010).

Aceste diferențe între valorile tensiunilor de deformare obținute în 2010 și 2011 ne conduc la concluzia că deformarea mierii de rapiță, ca răspuns asupra unui efort aplicat din exterior, scade odată cu trecerea timpului.

Comportamentul nenewtonian al mierii de rapiță a fost raportat de diferiți cercetători în domeniu.

7.3.4. Profilul reologic al mierii de floarea-soarelui

În urma analizei de baleiaj de frecvență, s-a observat valoarea destul de ridicată a modulului vâscos G'' (cu un maxim de 2510 Pa în anul 2010 și 1565 Pa în anul 2011) comparativ cu modulul de elasticitate care a înregistrat valori medii între 13,8 Pa (anul 2010) și 47,5 Pa (anul 2011).

Astfel în anul 2010, probele de floarea-soarelui analizate au prezentat la $T=20^\circ\text{C}$ bucle de histerezis, însă cu o arie nesemnificativ de mică. În acest caz, acest tip de miere a fost introdus în categoria fluidelor newtoniene.

După un an și jumătate, reogramele (figura 7.12) evidențiază caracterul nenewtonian a mierii de floarea-soarelui, manifestându-se prin apariția fenomenului de tixotropie atât la 10°C, 20°C și, foarte puțin vizibil, la temperatura de 30°C.

Acest tip de miere, a urmat mierii de rapiță, cu cel mai mare conținut de zaharuri. Diferența față de mierea de rapiță este că mierea de floarea-soarelui a cristalizat, prezentând granulație avansată.

7.3.5. Profilul reologic al mierii poliflorale

În urma primei proceduri aplicate (baleiaj de frecvență), s-a observat valoarea destul de ridicată a modulului vâscos G'' (cu un maxim de 3245 Pa în anul 2010 și 4820 Pa în anul 2011) comparativ cu modulul de elasticitate care a înregistrat valori medii între 60,4 Pa (anul 2010) și 29,5 Pa (anul 2011).

Astfel în anul 2010, probele de miere polifloră analizate au prezentat la $t=20^{\circ}\text{C}$ comportament newtonian.

După 18 luni, reogramele au evidențiat caracterul nenewtonian al mierii poliflorale, manifestându-se prin prezența buclelor de histerezis la 10°C, 20°C și, foarte puțin vizibil, la temperatura de 30°C.

De remarcat a fost faptul că în cazul mierii poliflore, tensiunea de deformare la 20°C a prezentat valori apropiate pentru anul 2010 (cu o valoare medie de 1963 Pa pentru curba de încărcare) și respectiv 2011 (cu o valoare medie de 2566 Pa la încărcare). Mierea polifloră analizată a prezentat un comportament nenewtonian în anul 2011, transformările ce au avut loc la nivel molecular fiind destul de mici și implicit deformarea apărută în urma aplicării unei forțe exterioare.

7.3.6. Profilul reologic al mierii de mană

În urma analizei melisopalinologice, din întregul grup de probe, doar trei s-au dovedit a aparține mierii de mană, datorită prezenței indicatorilor de mană (hife, alge etc) în preparatele microscopice.

Acest tip de miere a prezentat cele mai ridicate valori ale modulului de vâscozitate studiat prin procedura de baleiaj de frecvență. Astfel, modulul de vâscozitate a înregistrat o valoare maximă de 4220 Pa în anul 2010 și 6990 Pa în anul 2011 comparativ cu modulul de elasticitate, care a înregistrat valori medii între 64 Pa (anul 2010) și 82,3 Pa (anul 2011).

Mierea de mană analizată în anul 2010 a prezentat comportament reologic newtonian (figura 7.14). Răspunsul materialului la deformarea aplicată cu o viteză de forfecare de la 0,1 la 500 1/s și viceversa confirmă, din nou, existența memoriei materialului studiat (în cazul mierii de tei, salcâm și mană).

Mierea de mană analizată în anul 2011 a prezentat comportament reologic diferit, și anume nenewtonian dovada fiind apariția buclei de histerezis care confirmă prezența fenomenului de tixotropie (figura 7.15).

De asemenea, la temperatura de 20°C valoarea maximă a tensiunii de deformare a fost de 4523 Pa la încărcare și 4471 Pa la descărcare. În timp ce, la temperatura de 40°C, valoarea tensiunii de deformare a scăzut până la 663 Pa la încărcare, respectiv 663 Pa la descărcare.

Diferența de vâscozitate dintre probele studiate a fost explicată prin următorii parametri: umiditate, temperatură, conținut polenic și zaharuri, grad de cristalizare.

7.3.8. Prelucrarea statistică a rezultatelor

Privind prelucrarea statistică a rezultatelor s-au utilizat două analize (Analiza de varianță unifactorială ANOVA și Analiza de clusterizare ierarhică-metoda celui mai apropiat vecin), în scopul obținerii unor diferențieri, respectiv clasificări, a tipurilor de miere de diferite origini botanice.

Din figurile 7.19 și 7.20 se observă clasificarea probelor de miere analizate în funcție de valoarea vâscozității înregistrate a fost observată. Inițial s-au obținut două clase principale diferite în care clusterul împarte: în prima clasă- mierea de mană (deoarece aceasta a înregistrat cea mai mare valoare în anul 2010, 24,3 Pa.s), iar din cea de-a doua clasă, mierea polifloră și cea monoflorală (Figura 7.19).

Mierea de floarea-soarelui a fost singura care nu a format un grup specific, valorile acesteia aparținând mierii de salcâm și rapiță.

În funcție de această clasificare bazată pe algoritmi matematici ai metodei celui mai apropiat vecin putem prezice originea botanică a mierii în funcție de vâscozitatea acesteia.

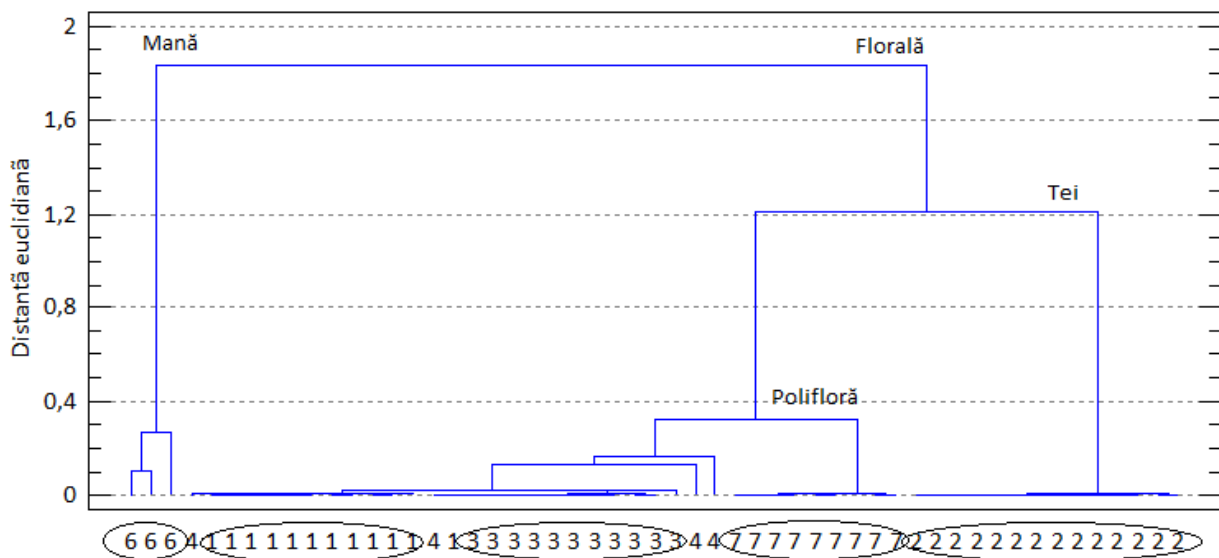


Figura 7.19. Reprezentarea grafică a clusterului format în funcție de vâscozitatea înregistrată de probele de miere analizate în anul 2010 (1-salcâm, 2- tei, 3-rapiță, 4- floarea-soarelui, 5- polifloră, 6- mană)

7.4. CONCLUZII

În urma evoluției în timp a comportamentului reologic, probele de miere analizate au prezentat un modul de vâscozitate (G'') mult mai mare decât modulul de elasticitate (G'). Acest fapt clasează mierea de albine în categoria fluidelor vâscoase (comportament obținut pentru probele de miere analizate atât în anul 2010, cât și în 2011).

Ordinea descrescătoare a probelor de miere supuse analizei în anul 2010, în funcție de G'' , a fost: mană, salcâm, rapiță, polifloră, floarea-soarelui și tei. Mierea de mană a înregistrat valoarea maximă pentru modulul de vâscozitate, pe când mierea de tei a prezentat cea mai joasă valoare.

În cazul aceleiași analize, însă după un an și jumătate, s-a observat o creștere dublă a modulului de vâscozitate comparativ cu G'' al probelor de miere analizate în anul 2010. Ordinea descrescătoare privind G'' a fost: mană, salcâm, polifloră, tei, rapiță și floarea-soarelui.

Modificarea vâscozității în cazul probelor de miere analizate la diferență de 1 an și jumătate sugerează prezența unor transformări continue la nivel molecular și structural, sub aspect fizico-chimic și biochimic ce au loc în miere. Această afirmație este întărită științific prin studiul unor diferiți parametri fizico-chimici care au condus la această observație, cum ar fi: conținutul de apă, spectrul glucidic analizat prin tehnici moderne cromatografice, dar și activitatea enzimatică (amilazică, invertazică) a probelor de miere.

În cea de-a doua parte a studiului au fost evaluate curbele de curgere la diferite temperaturi. Astfel, în urma analizei aplicate în anul 2010 toate tipurile de miere au prezentat comportament newtonian, cu excepția probelor de rapiță și floare-soarelui (au prezentat fenomenul de tixotropie). Acestea s-au comportat precum fluidele nenenewtoniene, fapt datorat concentrației ridicate de zaharuri din compoziție dar și a unor procente mari de polen în spectrul lor polenic (tipul *Brassica napus*, respectiv *Helianthus annuus*). În cazul tipurilor de miere care au manifestat un comportament newtonian acesta s-a datorat vâscozității. Datorită vâscozității iau naștere forțe de frecare internă care interzic deformarea; în timp, s-a stabilit un echilibru între forțele de solicitare exterioară și forțele interioare de frecare vâscoasă, ceea ce a determinat curgerea cu reopantă constantă.

În urma evaluării reogramelor după un an și jumătate de la prima analiză, se observă prezența comportamentului nenenewtonian al tuturor probelor de miere luate în lucru.

Mierea de floarea-soarelui care a prezentat comportament nenenewtonian atât în anul 2010, cât și în anul 2011, a avut cel mai ridicat conținut de zaharuri, după mierea de rapiță, iar în anul 2011 probele erau cristalizate cu granule de dimensiuni mari (peste 0,5 mm). Structura mierii fiind deja modificată, glucoza cristalizând la un nivel foarte avansat, s-a demonstrat existența corelației dintre: tipul polenic, compoziția chimică (spectrul glucidelor, dar și al enzimelor) și comportamentul reologic.

Factorii care conduc la același comportament reologic ca al mierii de floarea-soarelui, pentru mierea de rapiță, sunt: cristalizarea (în cazul mierii de rapiță are loc o cristalizare timpurie, uneori chiar în fagure, dar cu granule fine prezentând o consistență cremoasă), conținutul ridicat în zaharuri (în special glucoză), procentajul tipului de polen dominant ridicat, conținutul de apă.

S-a remarcat prezența unei scăderi a vâscozității și a tensiunii de deformare odată cu creșterea temperaturii (10°C, 20°C, 30°C și 40°C). Pentru a demonstra corelația dintre vâscozitate și temperatură s-a recurs la aplicarea modelelor matematice (Arrhenius și Herschel Bulkley).

Creșterea vâscozității mierii în timp a prezentat următoarea evoluție: în anul 2010, valoarea maximă a vâscozității a fost înregistrată de mierea de mană, pe când în anul 2011, această valoare a crescut destul de mult în cazul mierii poliflorale.

În urma aplicării analizei Cluster bazată pe algoritmi matematici a putu fi prezisă originea botanică a tipurilor de miere în funcție de vâscozitate.

Prin aplicarea analizei statistice multivariate (Cluster analysis), s-au format 6 grupuri diferite de miere în funcție de vâscozitatea acestora. Probele de miere analizate au fost clasificate după metoda celui mai apropiat vecin în funcție de distanțele euclidiene calculate cu ajutorul software-ului. Astfel, ordinea grupurilor formate a fost: mană, polifloră, floarea-soarelui, rapiță, salcâm și tei.

Pentru a verifica diferențele existente între grupurile formate de miere s-a aplicat analiza de varianță dispersională (ANOVA). S-a constatat că valoarea lui p a testului F-statistic a fost mai mică de 0,05, astfel a existat o diferență semnificativă între grupurile de miere formate în ceea ce privește vâscozitatea acestora, la un nivel de încredere de 95,0%.

CAPITOL 8. STUDIUL ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A MIERII ROMÂNEȘTI ANALIZATE

8.2. MATERIALE ȘI METODE

8.2.1. Material de lucru

În prezentul studiu s-au utilizat 54 probe de miere de diferite origini florale dintre care 3 probe de miere de mană, de pe teritoriul României. Probele au fost achiziționate direct de la apicultori sau de la ACA care au garantat pentru originea lor botanică.

8.2.2. Determinarea conținutului total de polifenoli prin metoda Folin-Ciocalteu

Conținutul de polifenoli totali s-a determinat pe baza metodei Folin-Ciocalteu propusă de Singleton și Rossi [19] și adoptată ulterior de Singleton și colab. [20].

Ținând cont de cantitatea de miere luată în lucru, rezultatele s-au exprimat în mg acid galic/100g miere.

Tabelul 8.2. Ecuația dreptei etalon trasată cu acid galic pentru determinarea polifenolilor totali

Ecuția dreptei etalon (acid galic)	R ²	Interval de concentrații (mg/mL)
A = 84,64C + 0,0152	0,998	0,02-0,2
A-Absorbanță (nm), C-concentrație (mg/mL)		

8.2.3. Determinarea conținutului total de flavonoide

Pentru trasarea dreptei etalon cu quercetină s-au utilizat diferite volume (mL) de soluție standard de quercetină.

Conținutul total de flavonoide s-a determinat prin metoda propusă de Dowd și adaptată ulterior de Arvouet-Grand și *colab.* [23]. Conținutul de flavonoide s-a exprimat în mg quercetină/100g miere.

Tabelul 8.4. Ecuația dreptei etalon trasată cu quercetină la determinarea flavonoidelor

Ecuția dreptei etalon (quercetină)	R ²	Interval de concentrații (mg/mL)
A = 73,66C + 0,0009	0,999	0,00008-0,008
A-Absorbanță (nm), C-concentrație (mg/mL)		

8.2.4. Determinarea activității antiradicalice cu DPPH⁻

Activitatea antiradicalică a mierii de albine a fost determinată cu ajutorul metodei de decolorare a reactivului DPPH. Această metodă implică măsurarea capacității antiradicalice a antioxidanților din miere prin captarea radicalului liber, stabil 2,2-difenil-1-picrylhidrazil, prezentând o intensă culoarea violet [24,25].

Modul de calcul utilizat a fost:

$$RSA\% = (A_B - A_P) / A_B \times 100$$

În care

A_B reprezintă absorbanța probei martor măsurată la 520 nm după 30 minute,

A_P reprezintă absorbanța probei de miere citită la 520 nm după 30 minute,

RSA- activitatea de îndepărtare a radicalilor liberi.

8.2.5. Determinarea indicelui de oxidare

Indicele de oxidare (IO) reprezintă timpul de decolorare, în secunde, a unei soluții de permanganat de potasiu 0,1 N, prin acțiunea compușilor antioxidanți ai mierii. Pentru

determinarea indicelui de oxidare s-a utilizat metodologia propusă de Bedascarrasbure [26] pentru propolis, cu unele modificări.

8.2.6. Tehnici statistice

În ceea ce privește prelucrarea statistică a rezultatelor obținute în urma determinărilor s-au utilizat două metode statistice precum: ANOVA și Clusterizarea ierarhică (Cluster analysis). Pentru a descrie posibile corelații între metodele diferite de determinare a activității antioxidante s-a aplicat o analiză de corelație bivariată canonică, iar pentru a evidenția diferențele dintre grupurile de miere s-au utilizat reprezentările grafice Box-Whisker.

8.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.3.1. Evaluarea conținutului total de polifenoli

Conținutul de polifenoli în probele de miere analizate a înregistrat o variație semnificativă. Cel mai scăzut conținut de polifenoli l-a prezentat una din probele de rapiță (4,5 mg/100g miere), iar cel mai ridicat conținut a aparținut unei mieri de mană (98,1 mg/100g miere).

Grupul mierii de salcâm a reprezentat tipul de miere cu cel mai scăzut potențial antioxidant, acesta înregistrând valori minime de 9,7 mg/100g miere și maxime de 31,4 mg/100g miere. Studii recente prezintă rezultate similare în ceea ce privește mierea de salcâm produsă în Slovenia, obținute de către Bertoneclic și colab. [9].

Grupul mierii de floarea-soarelui și de rapiță reprezintă tipuri de miere cu o capacitate antioxidantă relativ scăzută, cu valori medii ale conținutului de polifenoli de 20,5 mg/100g miere, respectiv 21,9 mg/100g miere.

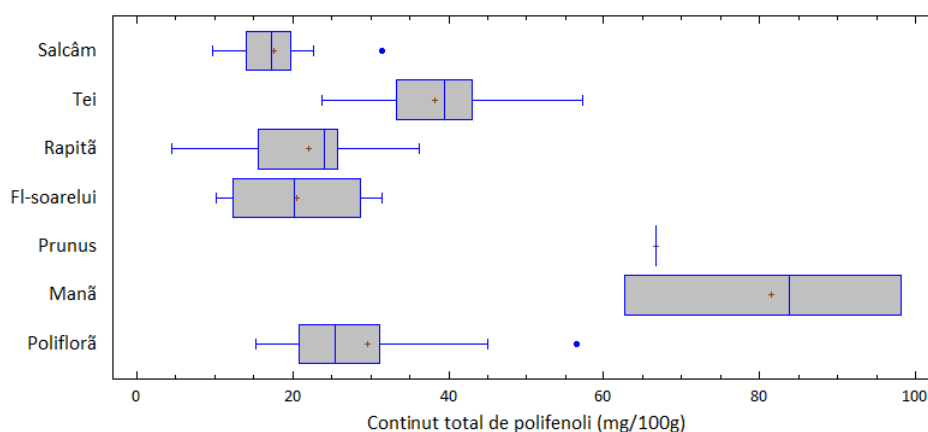


Figura 8.1. Diagrama Box-Whisker pentru conținutul total de polifenoli al celor 7 grupuri de miere

Dintre toate tipurile de miere florală din România, cel mai ridicat conținut polifenolic l-a înregistrat mierea de tei, cu valori cuprinse între 23,7 și 57,2 mg/100g miere.

De asemenea, mierea ce a prezentat cea mai ridicată valoare medie a concentrației de polifenoli din compoziție a fost cea de mană, conținutul total de polifenoli al mierii de mană fiind de 5 ori mai mare față de cel al mierii de salcâm.

Cu ajutorul analizei de varianță dispersională ANOVA au fost identificate diferențe semnificate între tipurile de miere, în ceea ce privește conținutul de polifenoli la $p < 0,005$ și $F = 22,56$. Pentru evidențierea acestor diferențe s-a utilizat diagrama Box-Whisker (figura 8.1).

Din această diagramă reiese că polifenolii reprezintă un factor discriminant între mierea florală și cea de mană.

8.3.2. Evaluarea conținutului total de flavonoide

Rezultatele obținute (tabelul 8.6) evidențiază diferența între tipurile de miere analizate în ceea ce privește conținutul total de flavonoide (mg quercetină/100g miere).

În tabelul 8.6 sunt prezentate rezultatele medii, minime, maxime dar și alți parametri statistici descriptivi pentru conținutul total de flavonoide din probele de miere analizate (pe grupuri).

Utilizând ecuația dreptei de calibrare cu quercetină ($R^2 = 0,999$), conținutul total de flavonoide al probelor de miere analizate a variat între 0,6-2,5 mg/100g miere pentru mierea de salcâm, 2,4-5,5 mg/100g miere pentru mierea de tei, 1,0-4,0 mg/100g miere pentru cea de rapiță, 2,6-3,8 mg/100g pentru mierea de floarea-soarelui. Probele de salcâm analizate au prezentat valori mai ridicate față de cele obținute de Meda și colab. [7].

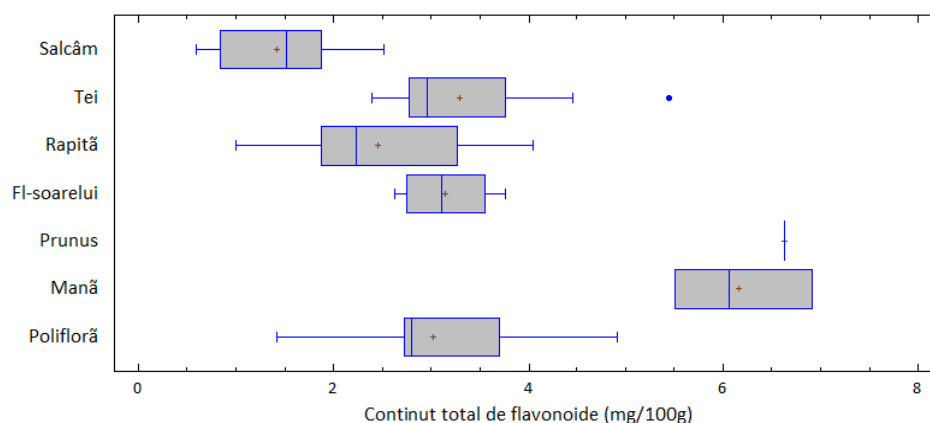


Figura 8.2. Diagrama Box-Whisker pentru conținutul total de flavonoide a celor 7 grupuri de miere

Un conținut ridicat de flavonoide a prezentat mierea de mană, variind între 5,5-6,9 mg/100g miere dar și în cazul mierii poliflorale s-au înregistrat valori destul de mari: 1,4-4,9 mg/100g miere.

Ordinea crescătoare în care a variat conținutul total de flavonoide pentru cele 7 grupuri diferite de miere este următoarea: Salcâm < Rapiță < Polifloră < Floarea-soarelui < Tei < Mană < Prunus. Cele mai ridicate valori au fost obținute pentru mierea de Prunus și cea de mană, fapt confirmat și de alți autori [5,9,12].

Cu ajutorul analizei de varianță dispersională ANOVA au fost identificate diferențe semnificate între tipurile de miere în ceea ce privește conținutul de flavonoide la $p < 0,005$ și $F = 18,46$. Pentru evidențierea acestor diferențe s-a utilizat diagrama Box-Whisker (figura 8.2).

8.3.3. Evaluarea procentului de RSA (engl. *radical scavenging activity*)

Cea mai mică valoare a RSA a înregistrat-o mierea de salcâm (cu o valoare medie de 10,5%), în timp ce mierea de mană a avut cea mai mare valoare (cu o valoare medie de 62,3%).

Cu ajutorul analizei de varianță dispersională ANOVA au fost identificate diferențe semnificate între tipurile de miere în ceea ce privește procentul de inhibiție a radicalului DPPH pentru $p < 0,005$ și $F = 21,24$. Pentru evidențierea acestor diferențe s-a utilizat diagrama Box-Whisker (figura 8.3).

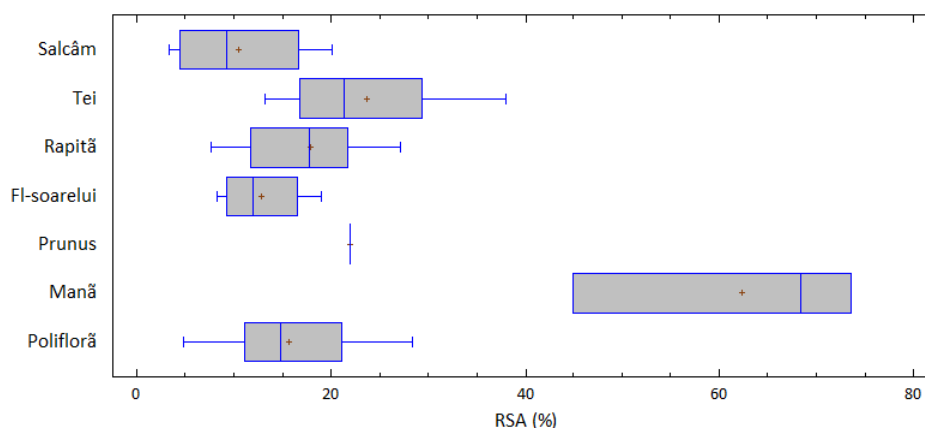


Figura 8.3. Diagrama Box-Whisker pentru activitatea antiradicalică (RSA) a celor 7 grupuri de miere

Din această diagramă reiese că activitatea antiradicalică reprezintă un factor discriminant între mierea florală și cea de mană.

8.3.4. Evaluarea indicelui de oxidare

Timpul mediu de decolorare a unei soluții de permanganat de potasiu 0,1 N de către antioxidanții din mierea analizată a fost de 9 s, cu o valoare minimă de 1 s (pentru o probă de mană), și o valoare maximă de 20 s (pentru o probă de salcâm).

Grupurile de salcâm, rapiță, floarea-soarelui și polifloră au prezentat cele mai ridicate valori ale indicelui de oxidare ceea ce se explică prin activitatea antioxidantă relativ mică a acestor probe de miere analizate.

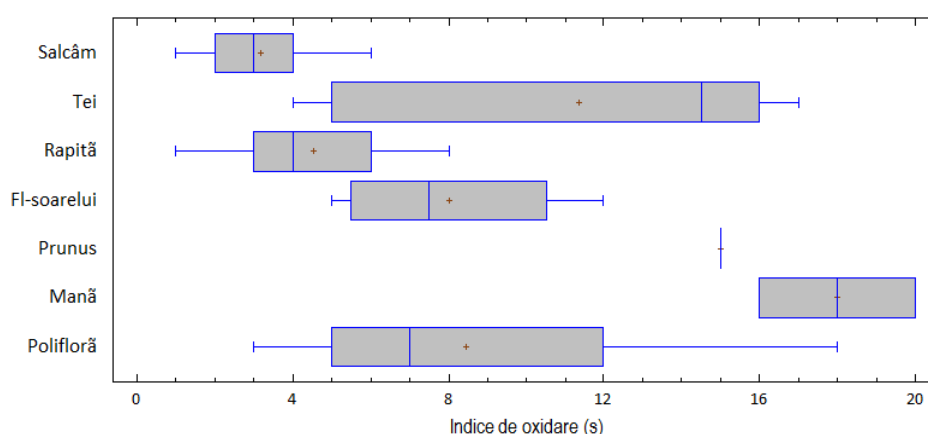


Figura 8.4. Diagrama Box-Whisker pentru indicele de oxidare a celor 7 grupuri de miere

Tabelul 8.9. Mărimile statistice ale corelațiilor canonice între cele 4 metode de determinare a activității antioxidante

Corelații	Valoare proprie	Corelații canonice	Wilks Lambda	Chi-Square	D.F.	p
Polifenoli-Flavonoide	0,6	0,800	0,359	52,757	1	0,0000
Polifenoli-RSA	0,7	0,817	0,331	56,789	1	0,0000
Flavonoide-RSA	0,4	0,664	0,557	30,050	1	0,0000
Indice de oxidare-RSA	0,3	0,603	0,636	23,285	1	0,0000

Din nou, cele mai scăzute valori ale timpului de decolorare le-au prezentat probele de tei și mană. Grupul de tei a prezentat o valoare medie a indicelui de oxidare de 5 s, luând valori în intervalul 1-9 s. Grupul de mană a înregistrat cea mai mică valoare dintre toate grupurile de miere studiate (valoare medie de 3 s), ceea ce confirmă încă o dată potențialul antioxidant cel mai puternic.

Cu ajutorul analizei de varianță dispersională ANOVA au fost identificate diferențe semnificative între tipurile de miere în ceea ce privește timpul de decolorare pentru $p < 0,005$ și $F = 10,29$. Pentru evidențierea acestor diferențe s-a utilizat diagrama Box-Whisker (figura 8.4).

Pentru a observa interdependența celor 4 parametri studiați ce stabilesc activitatea antioxidantă a mierii s-a recurs la reprezentarea tabelară (tabelulul 8.9) și grafică (figura 8.5) a corelațiilor canonice, pentru toate cele 7 grupuri de miere analizate.

Cele mai semnificative corelații identificate au fost între conținutul total de polifenoli și activitatea antiradicalică (0,817), conținutul total de flavonoide și polifenoli (0,800) dar și între activitatea antiradicalică și conținutul total de flavonoide (0,664).

Cu ajutorul clusterizării ierarhice în funcție de cei mai importanți parametri ce stabilesc capacitatea antioxidantă, s-au format 2 grupuri distincte (figura 8.9). Unul dintre grupuri a fost reprezentat de mierea de mană (care a prezentat cel mai puternic potențial antioxidant), iar celălalt grup, de cea florală. În funcție de centrozii fiecărei probe și de distanța euclidiană calculată cu ajutorul software-ului Statgraphics Centurion XVI, unele din probele de miere monoflorală au fost grupate (salcâm-1, tei-2, rapiță-3, fl-soarelui-4).

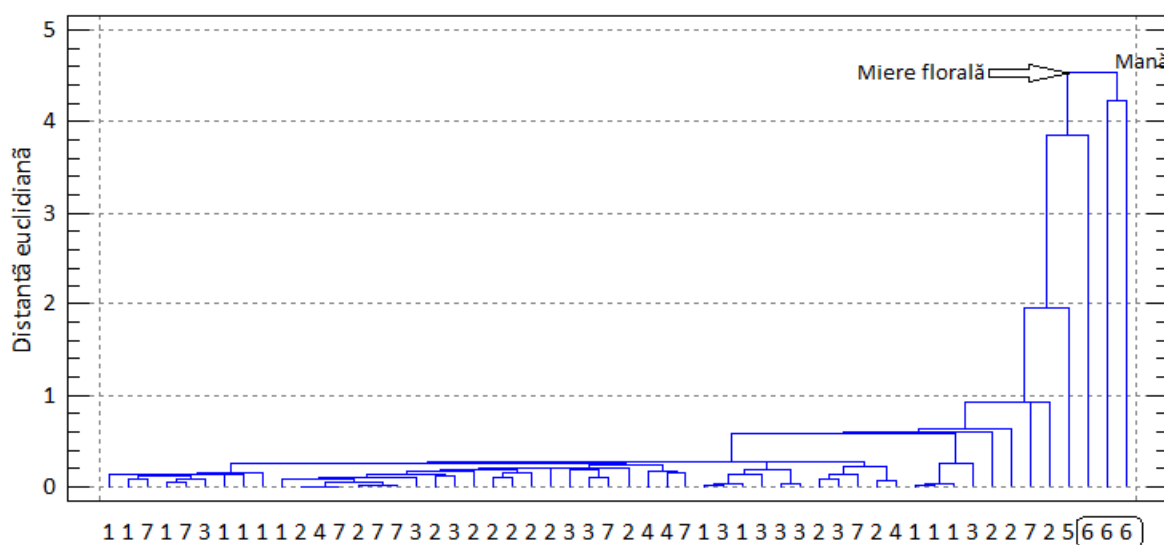


Figura 8.9. Reprezentarea grafică a clusterului format în funcție de conținutul total de polifenoli, de flavonoide și RSA ale probelor de miere analizate (1-salcâm, 2- tei, 3-rapiță, 4- floarea-soarelui, 5-polifloră, 6- mană)

8.4. CONCLUZII

În ceea ce privește conținutul total de polifenoli, cele mai ridicate valori au fost obținute pentru mierea de mană, mierea Prunus și cea de tei, conținutul fenolic al mierii de

mană fiind de 5 ori mai mare față de cel al mierii de salcâm. Aceeași situație a fost înregistrată și în cazul conținutului total de flavonoide.

Rezultate comparative obținute privind evaluarea capacității antioxidante clasează diferitele tipuri de miere analizate, din acest punct de vedere, în următoarea ordine crescătoare: salcâm < floarea-soarelui < rapiță < polifloră < tei < Prunus < mană.

CAPITOLUL 9. EVALUAREA CALITATIVĂ A MIERII ROMÂNEȘTI PE BAZA ANALIZEI SENZORIALE

9.2. MATERIALE ȘI METODE

9.2.1. Materiale

S-au utilizat în total 54 de probe de miere din diferite regiuni ale României, obținute din 2 culturi consecutive (2009/2010). Probele de miere au fost achiziționate direct de la apicultor care a garantat originea lor botanică și geografică și de la Asociația Crescătorilor de Albine (ACA).

9.2.2. Mediul ambiant

Sala în care au avut loc degustările a prezentat următoarele caracteristici:

- izolată fonic,
- lipsită de mirosuri străine,
- temperatura de aproximativ 20°C,
- umezeala relativă a aerului de aproximativ 60%,
- foarte luminoasă,
- culoarea pereților albă (neutră).

9.2.3. Grupul de degustători

Grupul de degustători a fost format din 8 paneliști specializați care profesază în acest domeniu în cadrul institutului Técnica del Consejo Regulador Geográfica Protejida Miel de Galicia, Spania.

Au fost îndeplinite anumite norme de igienă:

- nu s-a fumat, nu s-au consumat: cafea, băuturi alcoolice sau băuturi ce conțin substanțe aromatice puternice înainte cu o oră de începerea analizei senzoriale,
- nu s-au utilizat săpunuri puternic parfumate, deodorante sau parfumuri,

- nu s-au degustat mai mult de 7 probe de miere per sesiune (între degustări s-au consumat pâine fără sare și apă).

9.2.4. Pregătirea probelor

Recipientele cu miere au fost anonime pentru degustători, primind doar coduri specifice: 1A, 2A...1B...7C. Masa de miere utilizată pentru fiecare recipient a fost de 30-40 g, iar în cazul în care aceasta a prezentat fenomenul de cristalizare, transferul a avut loc cu grijă pentru a păstra intactă structura produsului.

Probele astfel pregătite au fost duse în sala de degustare înainte cu două ore de începerea sesiunii pentru ca mierea să fie în echilibru cu temperatura mediului.

9.2.5. Tehnica de lucru

Degustarea se efectuează în trei faze succesive: examen vizual, olfactiv și gustativ.

În cadrul examenului vizual se ține cont de o serie de atribute precum:

- Culoare: (pe o scală de la 1 la 10): incolor, alb, galben pai, galben foarte deschis, galben deschis, galben, galben închis, galben-brun, brun, brun închis.
- Fluiditate: (pe o scală de la 1 la 10): foarte fluid (atunci când umiditatea evaluată vizual este mai mare decât 19%), fluid (atunci când umiditatea este mai mică decât 19%), prezența cristalelor fine, medii și groase.
- Turbiditate: pură, turbiditate slabă, turbiditate importantă.
- Omogenitatea conținutului
- ❖ Pentru mierea fluidă: foarte omogenă, omogenă, slabă prezență a straturilor de diferite culori, prezența abundentă a straturilor de diferite culori (poate fi menționată existența bulelor de aer în masa de miere).
- ❖ Pentru mierea cristalizată: cristalizare incompletă, fracționată, separare în două faze (peliculă fină și lichidă la suprafață, strat gros important la suprafață).

Examenul olfactiv care are loc prin inspirarea lentă a probei timp de câteva secunde subliniază unele aspecte importante precum:

- Caracteristici generale: vegetal, floral, fructat, animal.
- Intensitatea mirosului (pe o scală de la 1-10).
- Persistența mirosului (pe o scală de la 1-10).
- Defecte: miros de fum, saci vechi, prezența fermentației.

Examen gustativ: cu ajutorul unei lingurițe de plastic de unică folosință se introduc 1-2 g de miere în cavitatea bucală și se menține câteva secunde până la mestecare. Se urmăresc următoarele atribute senzoriale:

- Caracteristici generale: vegetal, floral, fructat, animal.
- Intensitate (pe o scală de la 1-10).
- Persistență (pe o scală de la 1-10).
- Gust dulce (pe o scală de la 1-10).
- Gust acid (pe o scală de la 1-10).
- Aftertaste: intensitate și persistență
- Astringență: intensitate și persistență.
- Defecte: gust de fenol, migdală amară, miere încălzită (caramel), aciditate ridicată (fermentație), arome străine.

9.2.6. Prelucrarea statistică a rezultatelor

Datele senzoriale obținute au fost prelucrate cu software-ul statistic StatGraphics Centurion Versiunea XVI pentru Windows. La interpretarea rezultatelor s-au folosit metode precum: Analiza clusterizării/clasificării ierarhice (Cluster Analysis), Analiza componentelor principale (PCA), corelații Pearson și diagrame radar.

9.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

9.3.1. Grupul mierii de salcâm

Paneliștii specializați au evaluat pentru fiecare probă 17 atribute senzoriale prezentate în partea de "Tehnică de lucru".

Culoarea mierii de salcâm a variat de la incolor la galben pai, unele probe prezentând fluiditate destul de ridicată (minimum 3 - maximum 7), iar intensitatea mirosului a înregistrat valori destul de scăzute față de celelalte tipuri de miere analizate. Atributul caracteristic acestui grup de miere a fost reprezentat de gustul dulce. Acesta a prezentat o valoare medie de 6,7 cu un minim de 6 și un maxim de 7 (figura 9.1). Niciuna din probele supuse analizei senzoriale nu a prezentat astringență.

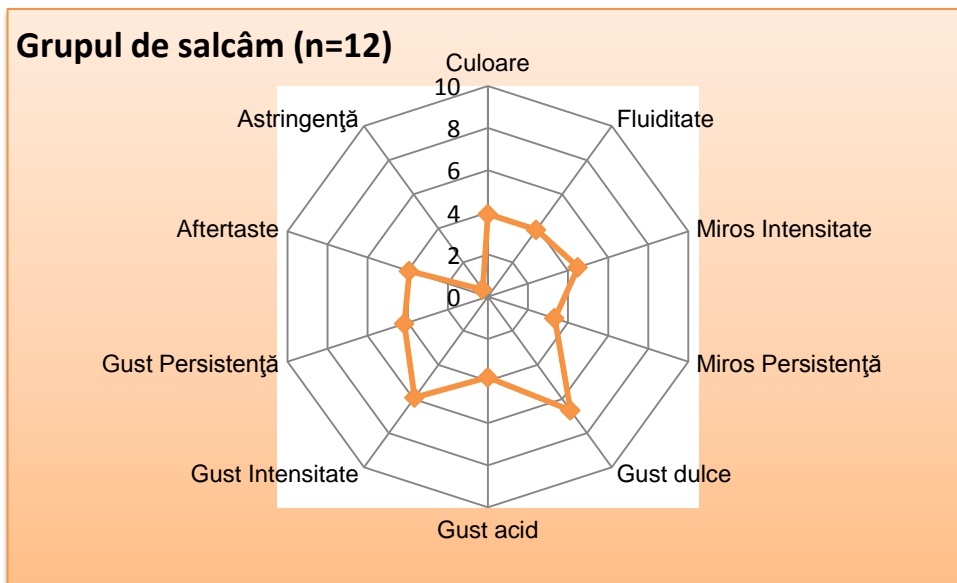


Figura 9.1. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru grupul mierii de salcâm

9.3.2. Grupul mierii de tei

Cele mai edificatoare atribute senzoriale evaluate sunt prezentate în diagrama radar (figura 9.2).

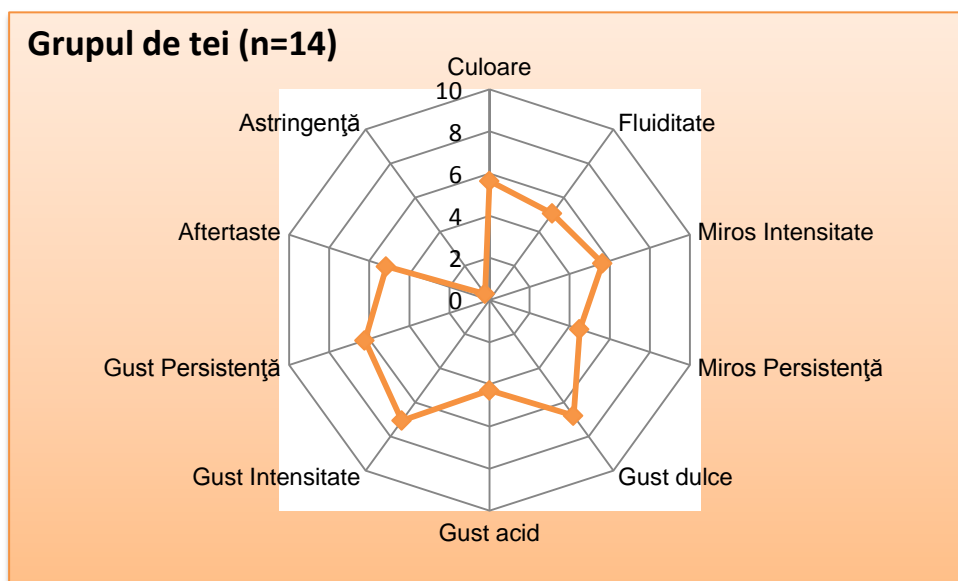


Figura 9.2. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru grupul mierii de tei

Se observă intensitatea culorii mult mai proeminentă față de cea a mierii de salcâm (galben deschis- galben -galben închis), dar și intensitatea florală a mirosului care a prezentat

valori între 5 și 7. Mierea de tei prezintă un miros specific și puternic datorită compușilor aromatici, volatili din compoziție.

De asemenea, acest tip de miere a prezentat aftertaste cu valori cuprinse în intervalul 5-6.

9.3.3. Grupul mierii de rapiță

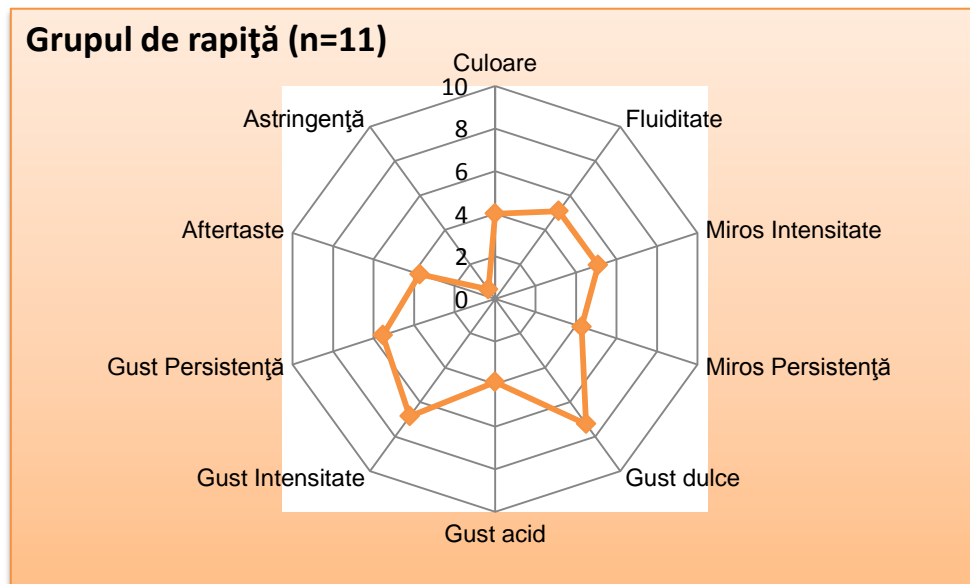


Figura 9.3. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru grupul mierii de rapiță

Acest tip de miere a prezentat intensități scăzute ale culorii (alb-galben deschis), fiind în general cristalizată cu dimensiunea granulelor mică, cristalizare care a avut loc în toată masa produsului, prezentând o structură cremoasă (figura 9.3). Acest fapt este explicat de existența unei fluidități relativ scăzute. De remarcat însă intensitatea puternică a gustului dulce care a variat între 7 și 8. Acest tip de miere a prezentat în compoziție cele mai ridicate concentrații de zaharuri identificate, ajungând în unele probe până la 90%.

Majoritatea degustătorilor au evidențiat un gust dulce mentolat relativ persistent în timp.

9.3.4. Grupul mierii de floarea-soarelui

Patru probe au făcut parte din componența acestui tip de miere, identificarea botanică bazându-se pe tehnicile melisopalinologice efectuate în prealabil.

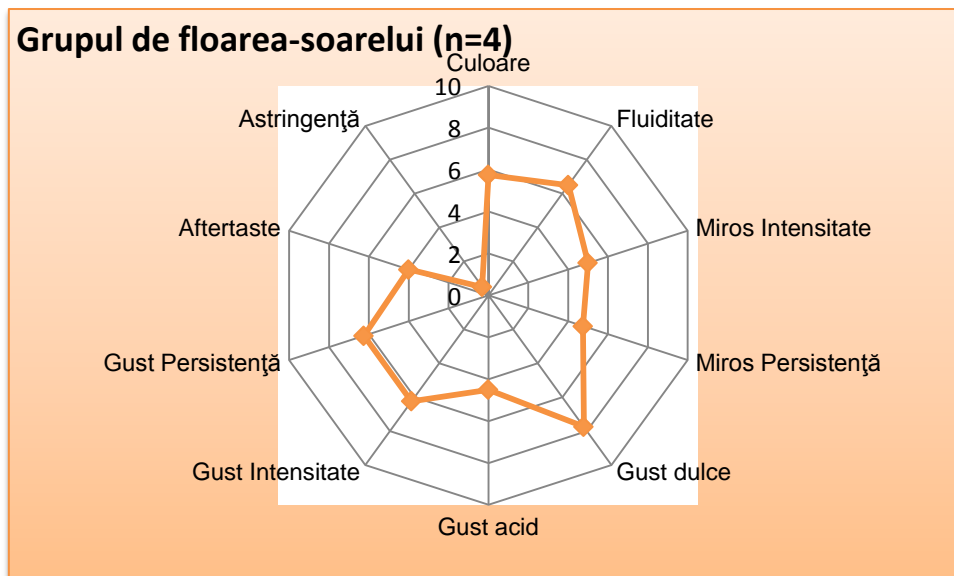


Figura 9.4. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru grupul mierii de floarea-soarelui

Acest tip de miere, ca și mierea de tei, a prezentat o intensitate a mirosului și gustului relativ ridicată datorită compușilor volatili din compoziție. S-a observat din nou, ca și în cazul mierii de rapiță prezența gustului dulce percepută de degustători ca fiind destul de ridicată (cu valori cuprinse între 7-8). Aceste probe au prezentat, de asemenea, un gust acid relativ mediu. Degustătorii au identificat un gust specific, puțin uleios, în unele cazuri chiar originea botanică (*Helianthus annuus*).

9.3.5. Mierea de Prunus

Aceasta a fost singura miere identificată astfel în urma analizei palinologice dar etichetată cu denumirea: miere de pomi fructiferi, achiziționată din zona Clujului.

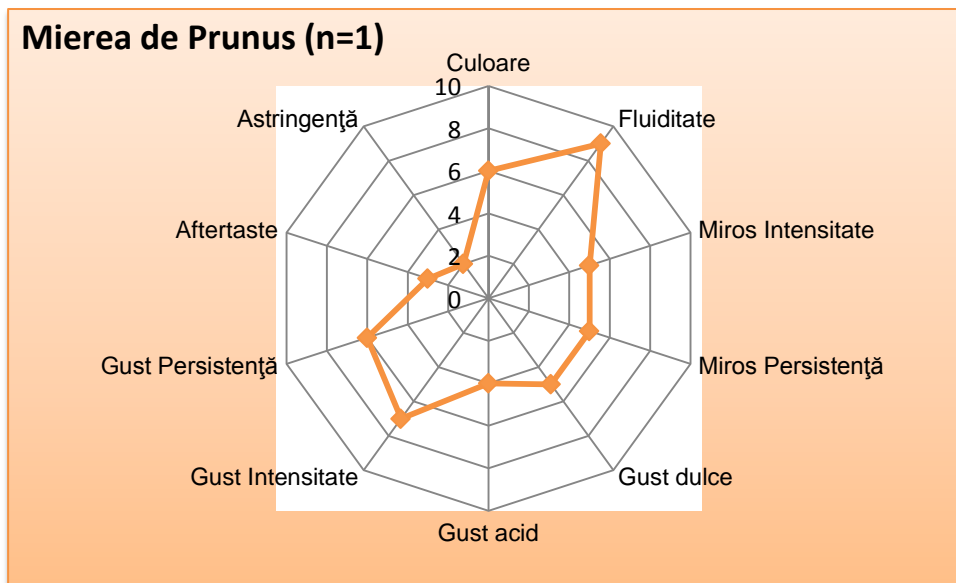


Figura 9.5. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru mierea de Prunus

Această miere a prezentat o structură cristalizată cu dimensiunea granulelor foarte mare (figura 9.5). Majoritatea degustătorilor au caracterizat această miere ca prezentând un gust dulce, de cireș. Intensitatea gustului acestei mieri a fost relativ ridicată, lăsând senzația de astringență în cavitatea bucală la finalul examenului gustativ.

9.3.6. Grupul mierii poliflore

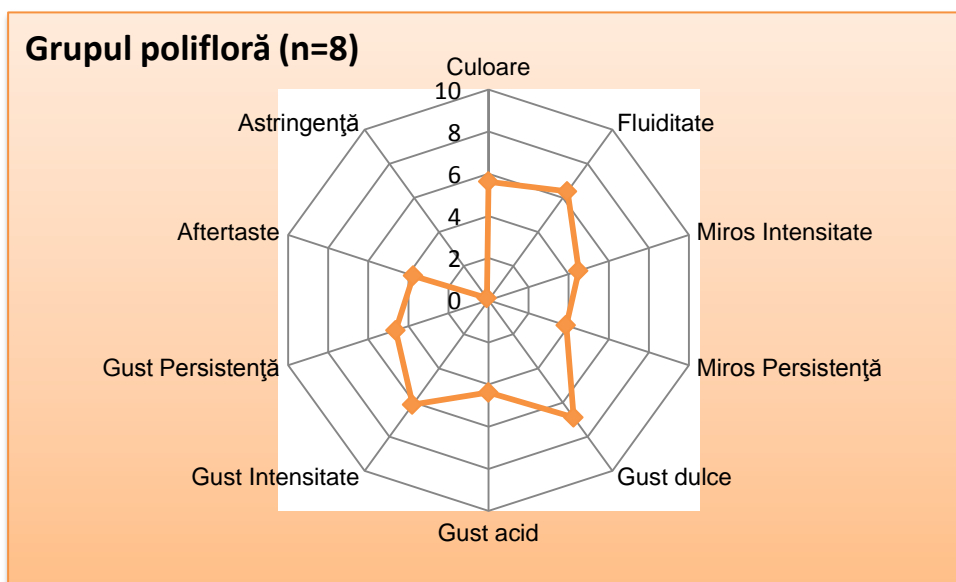


Figura 9.6. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru mierea polifloră

În componența acestui grup intră 9 probe de miere, din care o probă a fost respinsă datorită prezenței unei fermentații avansate care au făcut-o neconformă din punct de vedere senzorial.

Intensitatea culorii este similară cu cea a mierii de floarea soarelui și Prunus, luând valori în intervalul 5-6. Gustul dulce predominant ridicat a prezentat o valoare medie de 7. În majoritatea cazurilor, gustul detectat a fost cel floral și uneori fructat, iar 2 probe au prezentat un defect, mai precis o fermentație ușoară care s-a corelat cu gustului acid.

9.3.7. Mierea de mană

Trei probe din cele 53 analizate au intrat în categoria mierii de mană prezentând caracteristici specifice acestui grup, obținute în urma analizei melisopalinologice dar și a unor studii fizico-chimice.

De remarcat este intensitatea culorii acestui tip de miere (brun, brun-închis). După cum bine se știe, această culoare este caracteristică mierii de mană alături de o conductivitate electrică ridicată, implicit un conținut în săruri minerale, și nu în ultimul rând, cea mai puternică activitate antioxidantă față de tipurile de miere florală studiate.

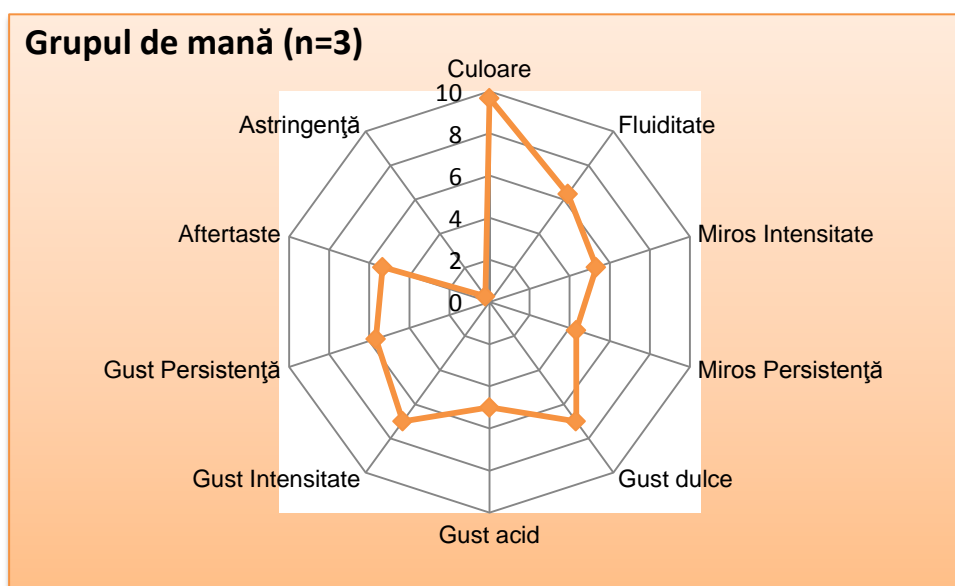


Figura 9.7. Diagrama radar a descriptorilor senzoriali pentru mierea de mană

Degustătorii au evidențiat, pentru toate probele, un gust pregnant de caramel, prezentând cea mai ridicată persistență în cavitatea bucală (aftertaste).

Gonzalez și colab. [22] au evaluat atributele senzoriale ale mierii de diferite origini florale din Madrid. În cazul mierii poliflorale, aceștia au detectat, ca și în prezentul studiu, o

aromă intens fructată dar și un gust picant la finalul testării organoleptice. Intensitatea de aroma și gust fiind similare cu cele obținute pentru mierea românească.

9.3.8. Combinarea tehnicilor chemometrice cu analiza senzorială

Grupurile de miere supuse analizei de varianță ANOVA au înregistrat diferențe statistice pentru $p < 0,005$. Pentru a demonstra grafic aceste diferențe s-a recurs la aplicarea Analizei Componentelor Principale (analiză discriminantă).

Astfel, în figura 9.8 sunt evidențiați cei mai importanți descriptori senzoriali: intensitate gust și miros, culoare, fluiditate, gust dulce și aftertaste, în funcție de care probele de miere s-au clasificat.

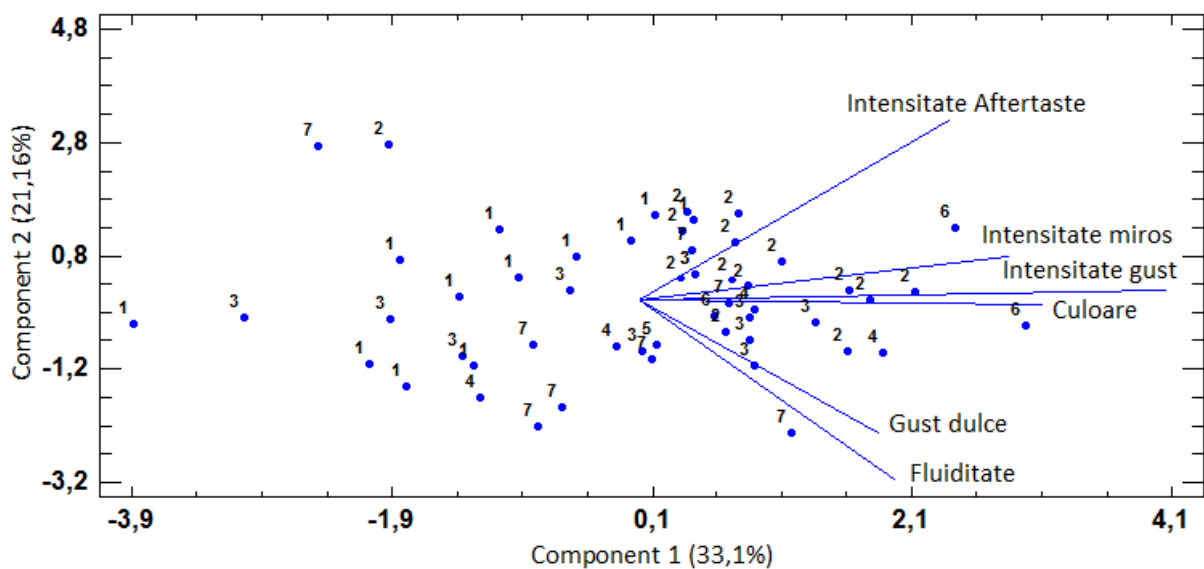


Figura 9.8. Diagrama analizei componentelor principale clasificând probele în funcție de atributele senzoriale cele mai edificatoare

În acest caz, 2 componente au fost extrase, deoarece 2 componente au avut valori proprii mai mare decât 1. Împreună, acestea reprezintă 54,27% din variabilitatea datelor originale.

După ce analiza componentelor principale a identificat atributele senzoriale cele mai edificatoare pentru analiza organoleptică a mierii românești, s-au aplicat corelațiile Pearson între acești descriptori senzoriali (tabelul 9.2).

Se remarcă din tabelul 9.2 că cele mai semnificative corelații au fost obținute între: intensitate gust-culoare, intensitate gust și aftertaste ($p < 0,01$). Alte corelații obținute au fost între intensitate gust și gustul dulce, dar și între fluiditate și culoare ($p < 0,05$).

Tabelul 9.2. Coeficienții de corelație Pearson pentru descriptorii senzoriali ai mierii românești

Descriptorii senzoriali	Culoare	Fluiditate	Intensitate miros	Gust dulce	Intensitate gust
Culoare					
Fluiditate	0,2696*				
Intensitate miros	0,1701	0,0532			
Gust dulce	0,0619	0,1762	0,1143		
Intensitate gust	0,3338**	0,2503	0,3759**	0,2747*	
Aftertaste	0,2423	-0,1610	0,1840	-0,0662	0,3736**

Nivel de semnificață: * p<0,05; ** p<0,01

Următoarea analiză aplicată datelor obținute în urma analizei senzoriale a fost analiza de clusterizare ("clustering").

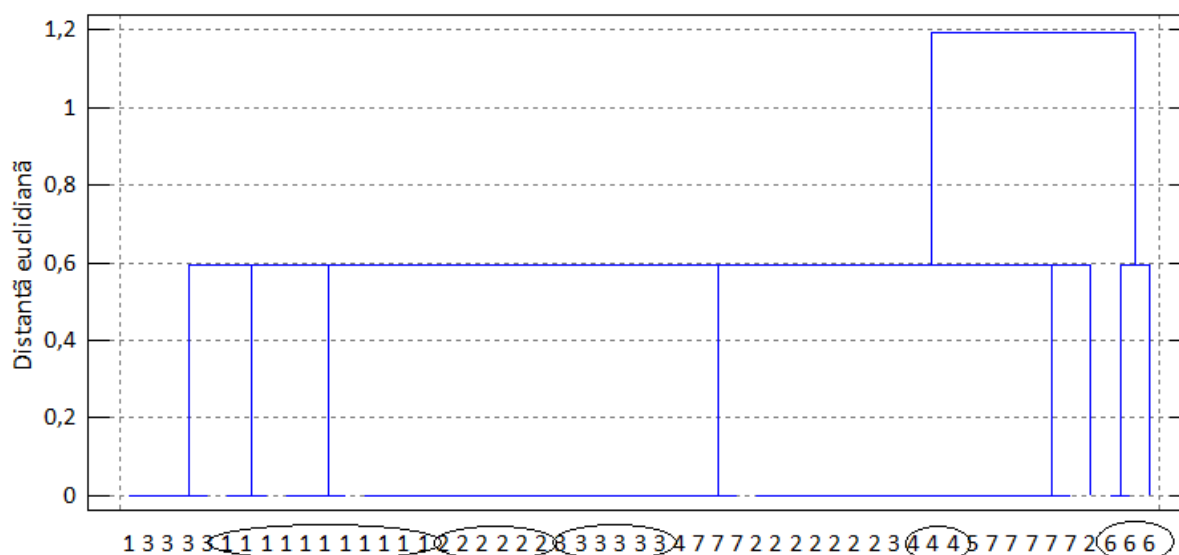


Figura 9.9. Reprezentarea grafică a clusterului format în funcție de culoare obținută în urma analizei senzoriale (1-salcâm, 2- tei, 3-rapiță, 4- floarea-soarelui, 5-Prunus, 6- mană, 7- polifloră)

Astfel, dendograma formează grupuri diferite de miere monoflorală în funcție de variabilele cu putere discriminantă obținute în urma analizei componentelor principale culoare și gust dulce

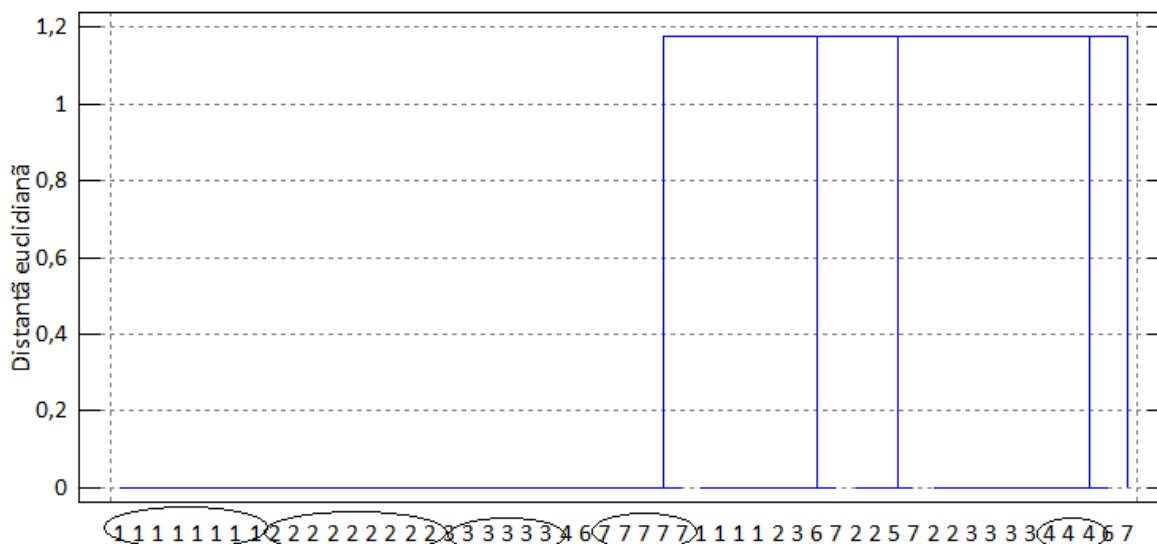


Figura 9.10. Reprezentarea grafică a clusterului format în funcție de gustul dulce obținut în urma analizei senzoriale (1-salcâm, 2- tei, 3-rapiță, 4- floarea-soarelui, 5-Prunus, 6- mană, 7- polifloră)

Se poate observa din diagrame formarea unor grupuri de miere. Grupurile formate se remarcă în cazul mierii de salcâm, tei, rapiță, polifloră și floarea-soarelui. În cazul reprezentării grafice a clusterului în funcție de culoare, de subliniat este discriminarea dintre mierea de mană și cea florală.

9.4. CONCLUZII

Cele mai apreciate tipuri de miere au făcut parte din grupul de tei și cel de rapiță, sub aspect structural și organoleptic. Mierea care a prezentat gustul cel mai dulce identificat de paneliști (dar demonstrat și prin analiza spectrului glucidic) a fost cea de floarea-soarelui.

În prezentul studiu s-a realizat trasarea profilelor senzoriale clasificând atributele organoleptice specifice mierii românești analizate.

Prin aplicarea analizei componentelor principale (PCA) s-au stabilit cei mai importanți descriptori senzoriali (intensitate gust, miros, culoare, fluiditate, gust dulce și aftertaste) care discriminează puternic între tipurile de miere evaluate.

Prin clusterizare ierarhică în funcție de atributul evaluat în cadrul examenului vizual (culoare), s-a obținut o grupare/diferențiere între mierea florală și cea de mană.

CAPITOLUL 10. AUTENTIFICAREA ORIGINII BOTANICE A MIERII ROMÂNÊȘTI BAZATĂ PE COMBINAREA ANALIZELOR FIZICO-CHIMICE ȘI CHEMOMETRICE

10.2. MATERIALE ȘI METODE

Materialul de lucru utilizat în prezentul studiu a constat în 54 probe de miere de diferite origini florale și geografice. Probele au fost obținute direct de la apicultori sau de la ACA- care au garantat pentru originea lor botanică și geografică.

În vederea identificării parametrilor cu putere discriminantă mare, care să ajute la autentificarea originii botanice a mierii, s-a apelat la aplicarea diferitelor tehnici chemometrice bazate pe diverse modele matematice. Astfel, s-au folosit:

10.2.1. Analiza componentelor principale (engl. Principal Component Analysis, PCA)

10.2.2. Analiza discriminantă lineară (Linear Discriminant Analysis, LDA)

10.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

10.3.1. Autentificarea prospețimii mierii românești analizate

Această autentificare presupune identificarea posibilelor tratamente nepermise aplicate asupra probelor evaluate în acest studiu. S-au avut în vedere compușii cu ajutorul cărora se stabilește prospețimea mierii precum: hidroximetilfurfuralul (HMF), activitatea enzimatică măsurată prin cuantificarea conținutului de amilază, respectiv invertază. Aceste două enzime fiind sensibile la temperatură vor conduce la rezultate edificatoare în cazul identificării de tratamentelor termice folosite, dar și a conservării mierii în condiții necorespunzătoare.

Analiza componentelor principale utilizând variabilele alese (conținutul de glucoză, HMF, invertază și amilază), a condus la formarea unui grup omogen detașat de celelalte probe care au depășit limitele admise pentru respectivii parametri analizați (figura 10.1).

Analiza componentelor principale a format două componente din cei 4 parametri introduși la rularea programului, care împreună discriminează cu un procent semnificativ de 80,6% între probele de miere naturală și cele falsificate.

Astfel, graficul arată cum cele 6 probe de miere (o probă de salcâm, două de polifloră și trei probe de tei), sunt în afara grupului omogen format, acestea fiind respinse în urma examenului de calitate, fapt demonstrat ulterior și de analiza senzorială.

Pentru două probe de tei (T_{15} și T_1), conținutul de amilază a prezentat valori nule, ceea ce demonstrează faptul că acestea au fost supuse unui tratament termic brutal.

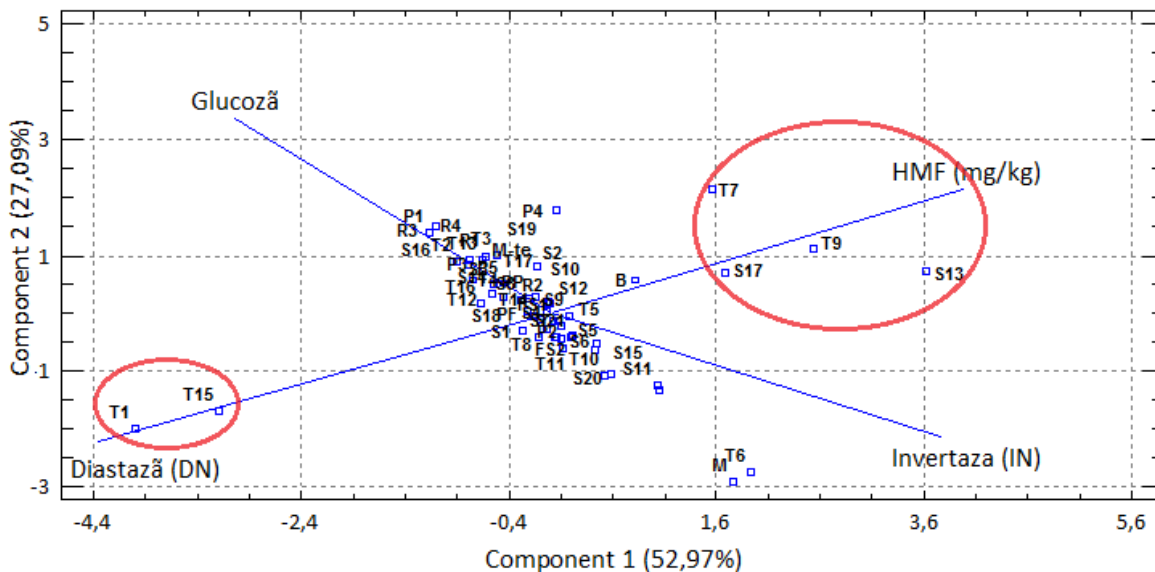


Figura 10.1. Diagrama probelor de miere obținută în urma analizei componentelor principale (PCA)

Celelalte patru probe (S_{13} , S_{17} , T_7 , T_9), au prezentat un conținut de hidroximetilfurfural mult peste limita admisă, de 40 mg/kg. Aceste probe au prezentat turbiditate și stadiu avansat de fermentație, fapt semnalizat și de către degustători în urma examenului organoleptic. În cazul mierii de salcâm (S_{17}), care a prezentat o valoare medie a 3 determinări a HMF, de 56,2 mg/kg, a înregistrat valori aberante ale zaharurilor (glucoză: 29,4%, fructoză: 19,33%, zaharoză: 1,4% și maltoză: 3%). Este singurul caz, mai ales în cadrul grupului de salcâm, în care o probă prezintă valori ale fructozei mult mai mici decât ale glucozei, de remarcat fiind și conținutul destul de ridicat al maltozei. Această probă fiind suspectă și de falsificare prin adaos de apă, glucoză, dextroză și amidon iar apoi supusă unui tratament termic la temperaturi de peste 60°C.

10.3.2. Autentificarea originii botanice a mierii românești bazată pe tehnici palinologice

Analizele statistice multivariate au condus la clasificări și chiar autentificări ale originii botanice între diferite tipuri de miere.

În literatura de specialitate există date care arată că analiza discriminantă liniară a

În prezentul studiu, pentru interpretarea statistică a datelor, s-a utilizat frecvența relativă a speciilor semnificative de polen: *Robinia pseudoacacia*, tipul *Brassica napus*, tipul *Prunus*, tipul *Tilia* și *Helianthus annuus*.

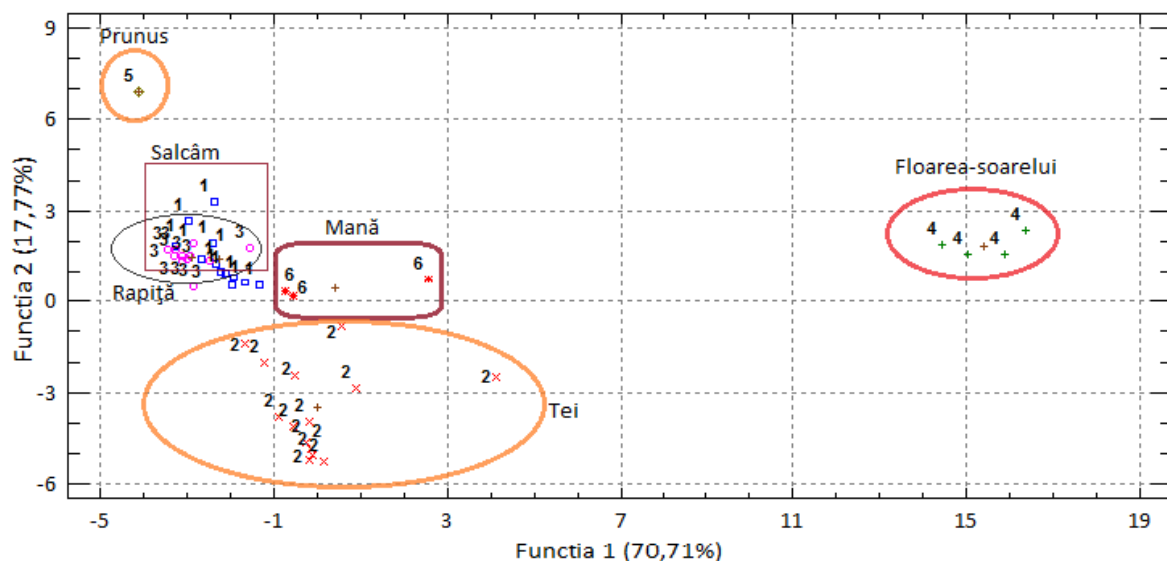


Figura 10.3. Diagrama probelor de miere obținută în urma analizei discriminante liniare (LDA)

Pentru o clasificare cât mai precisă a probelor de miere în funcție de originea florală, s-a aplicat analiza discriminantă liniară (figura 10.3), în care s-au introdus doar datele tipurilor de miere monoflorală și de mană, eliminând grupul de miere polifloră care prezintă un spectru vast de specii polenice. Această analiză a condus la formarea a 6 grupuri corespunzătoare celor 6 tipuri de miere evaluate: Prunus, salcâm, rapiță, tei, floarea-soarelui și mană.

Utilizând variabilele anterior specificate, procentul de clasificare corectă a diferitelor tipuri de miere a fost de 93,33%.

Cel mai scăzut procent de clasificare l-a prezentat grupul de salcâm (75%). Din acest grup 9 probe de salcâm au fost clasificate corect (conform originii botanice: *Robinia pseudoacacia*), două din probe intrând în grupul de mană și una în grupul de rapiță datorită prezenței speciei *Brassica napus* în concentrații ridicate în probele de salcâm.

Celelalte tipuri de miere au fost corect clasificate în funcție de originea florală, prezentând un procent de 100%.

10.3.3. Autentificarea originii botanice a mierii românești bazată pe metode fizico-chimice și biochimice

În cea de-a treia parte de autentificare a originii botanice, prin utilizarea parametrilor fizico-chimici și biochimici determinați, au fost definite și evaluate patru profile alcătuite din diferite variabile.

Scopul prezentului studiu a fost de identificare a profilului compus din variabile fizico-chimice și biochimice care să discrimineze cel mai puternic între tipurile de mieri, dar și ca raportul dintre clasificare corectă- consum de timp-consum de reactivi-necesitatea echipamentelor performante să fie optim.

Astfel, s-a urmărit obținerea profilului cel mai avantajos din diferite puncte de vedere (anterior amintite), care să prezinte cea mai ridicată precizie pentru autentificarea originii botanice a mierii românești. În acest studiu s-au utilizat doar probele de miere cu caracteristici de calitate superioare, cele ce au fost evaluate și au prezentat urme de posibile fraude fiind eliminate.

Profilul I a fost compus din următoarele variabile: conținut de glucoză, fructoză, zaharoză, maltoză, trehaloză, melezitoză, suma dintre glucoză și fructoză, conținutul de zaharuri totale, raportul dintre fructoză și glucoză (tabelulul 10.2). Spectrul glucidic trasat pentru fiecare probă prin cromatografie de schimb ionic a fost utilizat pentru discriminarea dintre tipurile diferite de miere.

În acest caz, procentul de clasificare corectă a probelor a fost de 71,11%.

Conform acestor date utilizate, singurul grup clasificat corect 100% a fost reprezentat de mierea de Prunus. Un procent de clasificare ridicat a fost înregistrat de mierea de salcâm (90,9%) datorită conținutului mare de fructoză și, implicit, a raportului ridicat F/G. Astfel, aceasta a discriminat semnificativ față de restul tipurilor de miere.

Din 11 probe de tei doar 9 au fost corect clasificate (81,8%), celelalte două fiind redistribuite în grupul mierii de rapiță și floarea-soarelui. Grupul de rapiță (n=11) a prezentat cel mai scăzut procent de clasificare (54,55%) în funcție de spectrul glucidic, 5 probe intrând în grupuri precum: salcâm, tei și floarea-soarelui.

Următorul profil, **profilul II**, utilizat a fost alcătuit din parametrii fizico-chimici: conținutul de apă, conductivitatea electrică, pH, HMF, indicele amilazic și conținutul de zaharuri totale

Utilizând variabilele anterior specificate, procentul de clasificare corectă a tuturor probelor de miere a crescut, fiind de 81%.

De această dată, mierea de salcâm și mierea de Prunus au fost corect clasificate, cu un procent de 100%.

Mierea de rapiță, din nou, a înregistrat cel mai scăzut procent de clasificare în funcție de parametrii fizico-chimici, 4 probe din 11 fiind distribuite în grupul mierii de salcâm, tei și rapiță.

În urma datelor obținute în funcție de cele două profile, s-a recurs ulterior la întregirea variabilelor fizico-chimice cu scopul obținerii unor procente de clasificare mult mai ridicate, în ceea ce privește autentificarea originii botanice a mierii românești.

Profilul III a fost compus din următorii parametri: densitate polenică, conținut de apă, conductivitate electrică, pH, indice colorimetric, HMF, indice amilazic, indice invertazic, conținutul de zaharuri totale, raportul F/G și raportul glucoză/apă (tabelulul 10.4).

Putem observa că patru grupuri (mierea de salcâm, floarea-soarelui, Prunus și mană), din cele șase grupuri supuse discriminării cu variabilele specificate anterior au fost corect clasificate în procent de 100%

Profilul IV a fost alcătuit pe lângă parametri fizico-chimici (pH, conductivitate electrică, indice colorimetric, conținut de zaharuri totale, raportul F/G), din parametri biochimici precum: conținutul total de polifenoli și RSA (*radical scavenging activity*).

Însă față de 11 variabile din cât a fost alcătuit profilul III care până acum a prezentat cel mai mare procent de clasificare al probelor, profilul IV a fost compus din 7 parametri, reducând astfel numărul de analize ce vor conduce la autentificarea originii botanice a mierii românești (tabelulul 10.5).

Tabelul 10.5. Procentul de clasificare prin LDA în funcție de Profilul IV al probelor de miere monoflorale și de mană

		Procent de clasificare (%)- Profilul IV					
	N	Salcâm	Tei	Rapiță	F-soarelui	Prunus	Mană
Salcâm	11	11 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Tei	11	0 (0,00)	10 (90,91)	0 (0,00)	1 (9,09)	0 (0,00)	0 (0,00)
Rapiță	11	2 (18,18)	1 (9,09)	6 (54,55)	2 (18,18)	0 (0,00)	0 (0,00)
F-soarelui	4	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Prunus	1	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (100,00)	0 (0,00)
Mană	3	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (100,00)

Procentul total al cazurilor corect clasificate: 86,36%

În urma rulării datelor din acest profil în analiza discriminantă, s-a obținut cel mai ridicat procent de clasificare corectă a probelor de miere în funcție de originea lor botanică (86,36%).

Astfel, a fost validat un profil alcătuit dintr-un număr relativ mic de variabile atât fizico-chimice cât și biochimice, care conduce la o clasificare precisă a probelor de miere din România și implicit la autentificarea botanică a acestora.

10.4. CONCLUZII

Analiza componentelor principale în funcție de indicatorii de prospețime ai mierii (HMF, indice amilazic și indice invertazic), a separat șase din cele 54 de probe, acestea fiind respinse datorită unui conținut de HMF și diastază în afara limitelor admise de Codex Alimentarius și International Honey Commission.

Astfel, în funcție de cele mai semnificative specii polenice a avut loc autentificarea originii botanice a probelor de miere evaluate în urma analizei discriminante lineare pentru care a fost obținut un procent de clasificare a probelor foarte ridicat.

Pentru obținerea unei autentificări precise folosind parametri fizico-chimici și biochimici s-a recurs la optimizarea unui profil alcătuit din variabile ce caracterizează mierea și care au prezentat o putere discriminantă ridicată între tipurile diferite evaluate. Astfel, din patru profile care au fost rulate, cel ales pentru validare a fost alcătuit din 7 variabile (pH, conductivitate electrică, indice colorimetric, conținut de zaharuri totale, raportul F/G, conținutul total de polifenoli și RSA), acesta conducând la o clasificare precisă a probelor de miere din România (86,36%) și implicit la autentificarea botanică a acestora.

CONCLUZII GENERALE

- ❖ Clasificarea tipurilor de miere din prezentul studiu a avut loc în urma analizei melisopalinologice în care spectrele polenice au fost trasate pentru fiecare probă.
- ❖ Au fost identificate 73 tipuri (specii) polenice aparținând la 35 de familii corespunzătoare. Tipul *Brassica napus* a fost prezent în diferite concentrații în toate cele 54 probe supuse analizei.
- ❖ În urma autentificării originii botanice prin tehnicile palinologice, probele de miere au fost clasificate astfel: salcâm- *Robinia pseudoacacia* (n=12), tei- tipul *Tilia* (n=14), rapiță- tipul *Brassica napus* (n=11), floarea-soarelui- *Helianthus annuus* (n=4), Prunus (n=1), polifloră (n=9) și miere de mană (n=3).
- ❖ Pe baza controlului de calitate, 6 probe din cele 54 au fost eliminate deoarece prezentau cantități în afara limitelor admise ale HMF, activității invertazice și amilazice. Aceste probe au fost suspectate ca fiind falsificate prin diferite adaosuri ilicite, supuse unor tratamente termice brutale și/sau păstrate în condiții necorespunzătoare.
- ❖ Spectrul glucidic, înglobând peste 90% zaharuri din materia uscată a mierii, a fost trasat utilizând metode cromatografice de schimb ionic cu detector amperometric.
- ❖ De asemenea, a fost studiată evoluția în timp (anii 2010 și 2011) a comportamentului reologic, obținându-se o valoare a componentei vâscoase (G'') mult mai mare decât componenta elastică (G'), mierea analizată fiind clasată în categoria fluidelor vâscoase.
- ❖ În urma evaluării comportamentului la curgere (anul 2010) toate tipurile de miere au prezentat comportament newtonian, cu excepția mierii de rapiță și de floarea-soarelui care au dovedit a fi fluide neneutroniene datorită prezenței în structură a unui fenomen de cristalizare avansată. După un an și jumătate (anul 2011), toate probele au prezentat caracter reologic ne-Newtonian, modificarea vâscozității sugerând existența transformărilor continue la nivel molecular și implicit structural.
- ❖ Prin aplicarea analizei de clusterizare ierarhică bazată pe algoritmi matematici a fost posibilă prezicerea originii botanice a mierii în funcție de vâscozitatea determinată la 10°C.

- ❖ S-a evaluat activitatea antioxidantă a mierii prin aplicarea a 4 metode diferite, ordinea crescătoare a potențialului antioxidant obținut fiind: salcâm, floarea-soarelui, rapiță, polifloră, tei, Prunus, mană.
- ❖ Corelațiile canonice au stabilit interdependența dintre metodele aplicate, iar prin analiza de clusterizare ierarhică în funcție de conținutul total de polifenoli și flavonoide a fost posibilă discriminarea dintre mierea florală și de mană, cea din urmă având un potențial antioxidant foarte ridicat.
- ❖ De asemenea, în prezentul studiu, s-a realizat trasarea profilelor senzoriale de către o echipă de paneliști specializați în Spania, și s-au stabilit atributele organoleptice de majoră importanță pentru mierea românească.
- ❖ În scopul unei autentificări precise a originii botanice, a fost identificat și optimizat un profil alcătuit din 7 variabile fizico-chimice și biochimice caracteristice mierii analizate, care a condus la o discriminare optimă între probe, procentul de clasificare corectă a probelor în urma rulării programului fiind de 86,36%.
- ❖ De remarcat, importanța metodelor melisopalinologice (ce identifică și trasează spectrele polenice) la autentificarea originii botanice a mierii, dar și a combinării dintre acestea și tehnicile moderne chemometrice care joacă un rol important în clasificarea acestor mieri (prin robustețea și precizia modelelor și algoritmilor matematici utilizați).

Concluzionând, aducem în prim plan impactul deosebit de important pe care l-au prezentat caracteristicile palinologice, fizico-chimice, biochimice combinate cu cele chemometrice, asupra autentificării originii botanice a mierii românești.

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

Diseminarea rezultatelor cercetării din actuala teză de doctorat a fost vizibilă după cum urmează:

Articole științifice:

ISI

- ❖ **Irina Dobre**, Petru Alexe, Olga Escuredo, Maria Carmen Seijo, **2012**. Palynological study of selected honeys from Romania, *Grana*, (acceptat).
- ❖ **Irina Dobre**, Luminita Anca Georgescu, Petru Alexe, Olga Escuredo, Maria Carmen Seijo, **2012**. Rheological behavior of different honey types from Romania , *Food Research International*, (acceptat).
- ❖ **Irina Dobre** and Maria Carmen Seijo, **2012**. Evaluation of several Romanian honeys based on their palynological and biochemical profiles, *International Journal of Food Properties*, (revizie minoră).

BDI

- ❖ **Irina Dobre**, Georgiana Gâdei, Livia Patrascu, Alina Mihaela Elisei, Rodica Segal, **2010**. The antioxidant activity of selected Romanian honeys, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicule VI-Food Technology*, **34 (2)**, 7. (publicat).

Lucrări comunicate la conferințe/simpozioane internaționale (doar prezentări orale)

- ❖ Escuredo Olga, **Dobre Irina**, Rodríguez-Flores M. Shantal & Seijo M. Carmen, **2012**. Sugar composition and crystallization tendencies of different types of unifloral honeys, *II International Symposium on Bee Products – Annual meeting of the International Honey Commission*, Bragança, Portugal.
- ❖ **Irina Dobre**, Ecaterina Brajdes, Valentina Serea, Vizireanu Camelia, Petru Alexe, **2012**. Évaluation et classification des différents types de miel sur la base des analyses palynologiques et biochimiques, *7^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée (COFrRoCA)*, Bacau, Romania.
- ❖ **Irina Dobre**, Petru Alexe, Olga Escuredo Perez, Maria Carmen Seijo Coello, **2011**. Authentication of botanical origin of Romanian honeys based on melissopalynological and physico-chemical analysis, *International Conference Enviromental capacity building*, Bucharest, Romania.
- ❖ **Irina Dobre**, Petru Alexe, Olga Escuredo Perez, Maria Carmen Seijo Coello, **2011**. Multicriterial classification of Romanian honeys by palynological and physico-chemical parameters, *5th International Euro-aliment Symposium*, Galați, Romania.
- ❖ **Irina Dobre**, Petru Alexe, Olga Escuredo Perez, Maria Carmen Seijo Coello, **2011**. Preliminary contribution to the evaluation of Romanian honeys based on palynological data, *Symposium conjoint APLF-APLE Palynologie et Diversites*, Meudon-Bellevue, Paris, France.
- ❖ **Dobre Irina**, Patrascu Livia, Flores M. Shantal Rodriguez, Escuredo Olga, Coello M. Carmen Seijo, **2011**. *Comportamiento reologico de mieles de Rumania*, *Congresso Iberico de Apicultura*, Castelo Branco, Portugalia.
- ❖ **Irina Dobre**, Livia Patrascu, Petru Alexe, **2010**. The rheological behaviour of selected honeys, *7th International Conference of Chemical Societies from South-East European Countries*, Bucharest, Romania.
- ❖ **Irina Dobre**, Georgiana Gadei, **2009**. The antioxidant activity by modern techniques of honey, *International Symposium Fundatia pentru alimentatie sanatoasa*, Bucharest, Romania.