

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN MIEL.

Tesis presentada por la Bachiller:

Santa Cruz Galdos, Alejandra Tatiana

Para optar el Título Profesional de:

Química Farmacéutico

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime Dante.

Arequipa – Perú

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA Expediente N°. 20180000048772
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, N° Trámite en Fac. 1760-2018
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica Fecha 08-11-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL


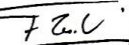
DE: SANTA CRUZ GALDOS, Alejandra Tatiana

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"COMPARACION Y VALIDACION DE LA TECNICA ANALITICA POR CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y POR ESPECTOFOTOMETRIA UV VISIBLE PARA LA CUANTIFICACION DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) EN MIEL DE ABEJA"

DICTAMINADORES: 1) Q. F. Juan Ramírez Orellana 2) Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, sugerimos se cambie el título a: "CUANTIFICACION DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) EN MIEL POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y ESPECTOFOTOMETRIA UV VISIBLE" después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas:   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 07-03-2019

ASESOR: Dr. Jaime Cárdenas García

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesor en el presente Trabajo de Investigación, cumulo con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

Firma  Fecha 12/3/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Q. F. Juan Ramírez Orellana 3) Mgter. Mocita De La Fuente Torres
2) Q.F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: "CUANTIFICACION DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y ESPECTOFOTOMETRIA UV VISIBLE EN MIEL", y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

Firma:    (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 03/10/19

JURADOS: Presidente Q.F. JUAN RAMIREZ ORELLANA
Vocal Q.F. FERNANDO TORRES VELA
Secretario MAG. MOCITA DE LA FUENTE TORRES

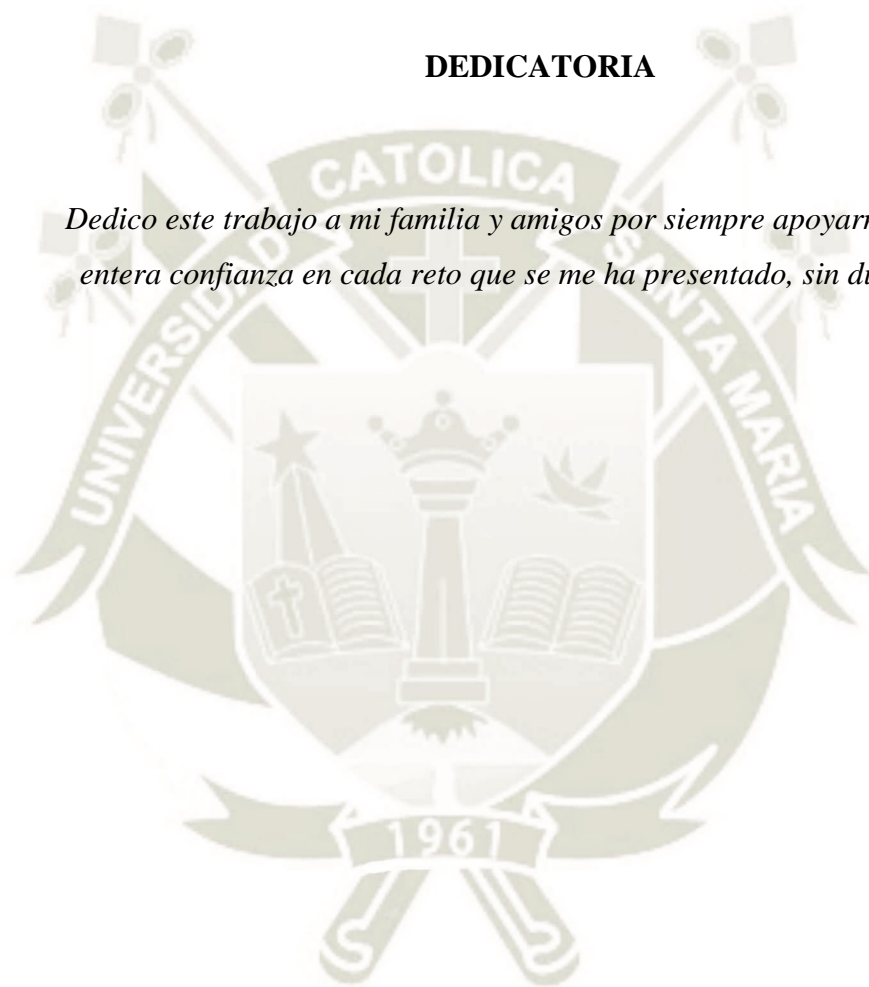
SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 22/10/19 Hora: 19:00 Local: C- 402 (SUM)


DECANO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia y amigos por siempre apoyarme y depositar su entera confianza en cada reto que se me ha presentado, sin dudar nunca de mi capacidad.



AGRADECIMIENTOS

A todos mis docentes, por las lecciones y conocimientos transmitidos en el transcurso de la carrera.

Al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, por ser el centro de desarrollo de esta tesis, en especial al Dr. Ricardo Alonso Abril Ramírez y al Ing. Rodrigo Ramos por su paciencia y enseñanzas.

A mi asesor, PhD. Jaime Cárdenas García, por su paciencia, entrega, confianza y asesoramiento en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT | ix |
| INTRODUCCIÓN | xi |
| HIPÓTESIS | xiii |
| OBJETIVOS | xiv |
| CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1. MIEL:..... | 1 |
| 1.1. Definición de Miel: | 1 |
| 1.2. Clasificación de la miel: | 1 |
| 1.2.1. Según su origen botánico: | 1 |
| 1.2.2. Según método de elaboración:..... | 2 |
| 1.2.3. Según su presentación: | 2 |
| 1.3. Constituyentes de la miel: | 3 |
| 1.3.1. Azúcares: | 3 |
| 1.3.2. Agua:..... | 4 |
| 1.3.3. Ácidos orgánicos:..... | 5 |
| 1.3.4. Minerales:..... | 6 |
| 1.3.5. Elementos trazas:..... | 6 |
| 1.3.6. Aminoácidos y proteínas:..... | 7 |
| 1.3.7. Compuestos fenólicos:..... | 8 |
| 1.3.8. Pigmentos:..... | 9 |
| 1.3.9. Compuestos carboxílicos, alcoholes y ésteres:..... | 9 |
| 1.4. Parámetros de calidad fisicoquímicos: | 10 |
| 1.4.1. Diastasa:..... | 10 |
| 1.4.2. Acidez: | 11 |
| 1.4.3. pH:..... | 11 |
| 1.4.4. Humedad: | 12 |
| 1.4.5. Cenizas:..... | 12 |
| 1.4.6. Color: | 13 |
| 1.4.7. Sólidos insolubles en agua: | 13 |
| 1.4.8. Fenoles totales: | 13 |
| 1.5. Requisitos: | 14 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.6. | Proceso de extracción de la miel: | 16 |
| 1.6.1. | Desoperculado: | 16 |
| 1.6.2. | Escurreido de cuadros:..... | 17 |
| 1.6.3. | Extracción: | 17 |
| 1.6.4. | Tamizado o Filtrado:..... | 18 |
| 1.6.5. | Utilización de depósito de miel y bombeo (opcional):..... | 18 |
| 1.6.6. | Sedimentación o Decantado:..... | 18 |
| 1.6.7. | Envasado en tambores y almacenamiento: | 19 |
| 2. | HIDROXIMETILFURFURAL: | 19 |
| 2.1. | Toxicología:..... | 20 |
| 2.2. | Mecanismo de formación: | 23 |
| 2.2.1. | Reacciones de oscurecimiento o de pardeamiento: | 24 |
| 2.2.2. | Reacción de Maillard:..... | 25 |
| 2.2.3. | Caramelización: | 28 |
| 2.3. | Hidroximetilfurfural como indicador de calidad en la miel: | 29 |
| 3. | ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE (UV-Vis):..... | 30 |
| 3.1. | Ley de Lambert-Beer:..... | 31 |
| 3.2. | Partes básicas de un espectrofotómetro:..... | 32 |
| 3.3. | Espectrofotómetro convencional:..... | 33 |
| 3.4. | Diseño de haz simple o de doble haz: | 33 |
| 4. | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN: | 35 |
| 4.1. | Componentes:..... | 35 |
| 4.1.1. | Reservorio de la fase móvil:..... | 36 |
| 4.1.2. | Sistema de bombeo: | 36 |
| 4.1.3. | Inyector (manual o automático): | 36 |
| 4.1.4. | Columna: | 37 |
| 4.1.5. | Detectores:..... | 37 |
| 4.1.6. | Sistema de toma y procesamiento de datos: | 38 |
| 4.2. | Cromatografía de fase reversa: | 39 |
| 5. | VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO: | 39 |
| 5.1. | Método analítico:..... | 39 |
| 5.2. | Validación: | 40 |
| 5.3. | Parámetros analíticos:..... | 42 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 5.3.1. | Linealidad:..... | 42 |
| 5.3.2. | Sensibilidad:..... | 42 |
| 5.3.3. | Limite de detección y cuantificación:..... | 42 |
| 5.3.4. | Precisión:..... | 43 |
| 5.3.5. | Exactitud:..... | 44 |
| CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS..... | | 45 |
| 1. | LUGAR DE INVESTIGACIÓN:..... | 45 |
| 2. | MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:..... | 45 |
| 2.1. | Equipos:..... | 45 |
| 2.2. | Reactivos:..... | 46 |
| 2.3. | Materiales:..... | 46 |
| 2.4. | Otros Materiales:..... | 47 |
| 3. | MÉTODOS:..... | 47 |
| 3.1. | Muestras de estudio:..... | 47 |
| 3.2. | Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):..... | 48 |
| 3.2.1. | Condiciones cromatográficas:..... | 48 |
| 3.2.2. | Preparación de la solución stock del estándar de HMF :..... | 48 |
| 3.2.3. | Preparación de la fase móvil:..... | 48 |
| 3.3. | Validación del método analítico (HPLC):..... | 49 |
| 3.3.1. | Linealidad:..... | 49 |
| 3.3.2. | Sensibilidad:..... | 50 |
| 3.3.3. | Precisión:..... | 52 |
| 3.3.4. | Exactitud:..... | 53 |
| 3.3.5. | Cuantificación de HMF por HPLC:..... | 54 |
| 3.4. | Validación del método (Espectrofotometría Uv-Visible):..... | 55 |
| 3.4.1. | Linealidad:..... | 55 |
| 3.4.2. | Sensibilidad:..... | 56 |
| 3.4.3. | Precisión:..... | 58 |
| 3.4.4. | Exactitud:..... | 59 |
| 3.5. | Cuantificación de HMF por Espectrofotometría UV-Visible:..... | 60 |
| CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | | 62 |
| 1. | CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC):..... | 62 |
| 1.1. | Validación del método analítico:..... | 62 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2. Cuantificación de HMF en miel por HPLC:..... | 71 |
| 2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE: | 74 |
| 2.1. Validación del método analítico:..... | 74 |
| 2.2. Cuantificación de HMF en miel por Espectrofotometría UV-Vis: | 82 |
| 3. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS:..... | 84 |
| CONCLUSIONES | 87 |
| SUGERENCIAS | 88 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 89 |



INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. 1: Estructura química del 5-Hidroximetil-2-furaldehido..... | 19 |
| Figura 1. 2: Metabolismo de 5-Hidroximetilfurfural (HMF) a 5-Sulfoximetilfurfural (SMF)..... | 21 |
| Figura 1.3: Principales rutas de formación del 5- Hidroximetilfurfural. Adaptado de Lorenzo,G (18)..... | 24 |
| Figura 1. 4: Esquema de un espectrofotómetro convencional de haz simple (24)..... | 33 |
| Figura 1.5: Sistema óptico de un espectrofotómetro de doble haz (24)..... | 34 |
| Figura 1.6: Componentes básicos del HPLC (26)..... | 35 |
| Figura 3.1: Gráfico de calibración correspondiente al HMF por HPLC..... | 63 |
| Figura 3.2: Gráfico de concentración vs absorbancia..... | 65 |
| Figura 3.3: Gráfico de concentración vs desviación estándar..... | 66 |
| Figura 3.4: Comparación del contenido de HMF (mg/kg) en las diferentes muestras de miel..... | 73 |
| Figura 3.5: Cromatograma correspondiente a la muestra C, que muestra la presencia del HMF..... | 74 |
| Figura 3.6: Gráfico de calibración correspondiente al HMF por Espectrofotometría UV-Vis..... | 75 |
| Figura 3.7: Gráfico de concentración vs área..... | 77 |
| Figura 3.8: Gráfico de concentración vs desviación estándar..... | 78 |
| Figura 3.9: Comparación del contenido de HMF (mg/kg) en las 6 mieles analizadas por Espectrofotometría UV-Vis por el Método de White..... | 84 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1: Azúcares principales presentes en la miel | 4 |
| Tabla 1.2: Principales flavonoides presentes en la miel. | 8 |
| Tabla 1. 3: Parámetros de calidad de la miel | 15 |
| Tabla 1. 4: Aspectos generales de la Caramelización y de la Reacción de Maillard . | 25 |
| Tabla 1. 5: Parámetros analíticos de acuerdo al método cuantitativo | 41 |
| Tabla 1. 6: Variación de factores en el estudio de la precisión..... | 43 |
| Tabla 2. 1: Concentraciones de HMF para la Gráfica de Calibración por el Método de HPLC | 49 |
| Tabla 2. 2: Concentraciones de HMF para la Gráfica de Calibración por el Método de Espectrofotometría UV-Vis. | 55 |
| Tabla 3. 1: Datos para la determinación de la linealidad del método. | 62 |
| Tabla 3. 2: Áreas cromatográficas y su desviación estándar para la determinación del parámetro sensibilidad. | 65 |
| Tabla 3. 3: Áreas cromatográficas correspondientes de HMF a una concentración de 49.93 mg/L..... | 68 |
| Tabla 3.4: Datos obtenidos para determinar el coeficiente de variación porcentual . | 68 |
| Tabla 3.5: Precisión esperada (repetibilidad) en función a la concentración del analito..... | 69 |
| Tabla 3. 6: Porcentaje de recuperación del HMF..... | 70 |
| Tabla 3. 7: Porcentaje de recuperación esperado en función a la concentración del analito..... | 71 |
| Tabla 3. 8: Contenido de HMF (mg/kg) por el Método de HPLC..... | 72 |
| Tabla 3.9: Datos para la determinación de la linealidad del método. | 75 |
| Tabla 3. 10: Áreas cromatográficas y su desviación estándar para la determinación del parámetro sensibilidad. | 77 |
| Tabla 3. 11: Absorbancias correspondientes de HMF a una concentración de 85.68 ppm..... | 80 |
| Tabla 3.12: Datos obtenidos para determinar el coeficiente de variación porcentual..... | 80 |
| Tabla 3. 13: Porcentaje de recuperación del HMF..... | 81 |
| Tabla 3.14: Contenido de HMF (mg/kg) por el Método de Espectrofotometría | 82 |
| Tabla 3.15: Comparación del contenido de HMF (mg/kg) por el Método de HPLC y por el Método UV-Vis (White)..... | 85 |
| Tabla 3. 16: Análisis estadístico de ANOVA para la determinación de diferencia significativa entre los métodos de HPLC y Espectrofotometría UV-Vis | 85 |

RESUMEN

El Hidroximetilfurfural (HMF) es un parámetro indicador de la calidad y frescura de la miel. Los niveles de HMF en miel aumentan cuando la miel es sometida al calor, almacenada por largos periodos de tiempo o en condiciones no adecuadas y adulterada con jarabes invertidos.

El Codex Alimentarius y la Comisión Internacional de la Miel (IHC) recomiendan el método espectrofotométrico basado en protocolos de White (AOAC 980.23) y el método por HPLC para la cuantificación de HMF en mieles. Por lo que el objetivo principal en el presente trabajo fue determinar los niveles de HMF por los métodos mencionados.

El método espectrofotométrico se desarrolló utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, a una longitud de onda de 284 nm, y el método por HPLC se desarrolló utilizando un equipo de cromatografía de alta resolución Merck Hitachi con una columna R18 Merck Lichrocart, a una longitud de onda de 284 nm, con una fase móvil 90:10 de agua:metanol. Encontrándose un tiempo de retención de 3.4 minutos

Los parámetros evaluados para la validación fueron: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud. Para la validación del método por HPLC, se realizó un gráfico de calibración en un rango de 19.97 mg/L a 99.86 mg/L con soluciones de HMF, presentando un $r^2=0.9999$ el cual indica un alto grado de correlación, un coeficiente de variación (CV%) de 0.31% para la repetibilidad del sistema instrumental estando

este resultado dentro de lo estipulado por la USP, la cual indica un CV% no mayor del 2% , un CV% de 0.06 a 0.49% para la repetibilidad del método siendo este valor aceptable según la AOAC que establece un CV% no mayor a 5.3% , un porcentaje de recuperación de 90.87% el cual se ubica dentro del rango esperado de 80-110% según la AOAC y un límite de detección (LD) de 0.46 mg/L y un límite de cuantificación (LC) de 0.73 mg/L. . Para validar el método espectrofotométrico, se realizó un gráfico de calibración en un rango de 12.24 mg/L a 195.84 mg/L con soluciones de HMF , presentando un $r^2= 0.9996$ el cual indica un alto grado de correlación, un CV% de 1.23% para la repetibilidad del sistema instrumental estando este resultado dentro de lo estipulado por la USP, la cual indica un CV% no mayor del 2% y un CV% de 0.88 a 3.75% para la repetibilidad del método siendo este valor aceptable según la AOAC que estable un CV% no mayor a 5.3% ,un porcentaje de recuperación de 115.70 % el cual está por encima de lo establecido por la AOAC de 80-110%, un porcentaje de recuperación por encima del 100% indican interferencias debidas a la matriz , finalmente se obtuvo un límite de detección (LD) de 0.61 mg/L y un límite de cuantificación (LC) de 1.4 mg/L.

Se analizaron en total seis muestras de miel provenientes de denominadas tiendas orgánicas, mercados y supermercados de la ciudad de Arequipa. Se determinó la concentración de HMF por HPLC obteniendo un rango de concentración de 585.40 mg/kg – 1365.6 mg/kg en cuatro de las muestras, resultados por encima de los niveles permisibles por la Norma Técnica Peruana que establece un máximo de 80 mg/kg, a excepción de dos muestras con una concentración por debajo del LD y LC. En el método por Espectrofotometría UV-Visible se obtuvo un rango de concentración de HMF de 596.4 mg/kg – 1471.9 mg/kg en cuatro de las muestras, estando estos resultados por encima de los niveles permisibles, a excepción de dos muestras con una concentración de 7.4mg/kg y 19.9 mg/kg.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores para determinar si existe diferencia significativa entre estos dos métodos, obteniéndose un $p<0.05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula, concluyendo así que existe diferencia significativa entre ambos métodos.

PALABRAS CLAVE: *Hidroximetilfurfural, Mieles, Cromatografía líquida de alta resolución, Espectrofotometría UV-Visible, Reacción de Maillard, Caramelización.*

ABSTRACT

Hydroxymethylfurfural (HMF) is an indicator of the quality and freshness of honey. HMF levels in honey increase when honey is subjected to heat, stored for long periods of time or under inappropriate conditions and adulterated with inverted syrups.

The Codex Alimentarius and the International Honey Commission (IHC) recommend the spectrophotometric method based on White protocols (AOAC 980.23) and the HPLC method for the quantification of HMF in honey. Therefore, the main objective in the present work was to determine the levels of HMF by the mentioned methods.

The spectrophotometric method was developed using a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer, at a wavelength of 284 nm, and the HPLC method was developed using a Merck Hitachi high resolution chromatography device with an R18 Merck Lichrocart column, at a length of 284 nm wave, with a 90:10 mobile phase of water: methanol. Finding a retention time of 3.4 minutes

The parameters evaluated for validation were: linearity, sensitivity, precision and accuracy. For the validation of the HPLC method, a calibration chart was made in a range of 19.97 mg / L to 99.86 mg / L with HMF solutions, presenting a $r^2 = 0.9999$ which indicates a high degree of correlation, a coefficient of variation (CV%) of 0.31% for the repeatability of the instrumental system, this result being within the stipulations of the USP, which indicates a CV% not greater than 2%, a CV% of 0.06 to 0.49% for the repeatability of the method being this acceptable value according to the AOAC that establishes a CV% not greater than 5.3%, a recovery percentage of 90.87% which is within the expected range of 80-110% according to the AOAC and a detection limit (LD) of 0.46 mg / L and a quantification limit (LC) of 0.73 mg / L. . To validate the spectrophotometric method, a calibration graph was made in a range of 12.24 mg / L to 195.84 mg / L with HMF solutions, presenting a $r^2 = 0.9996$ which indicates a high degree of correlation, a CV% of 1.23% for the repeatability of the instrumental system, this result being within the stipulations of the USP, which indicates a CV% not greater than 2% and a CV% of 0.88 to 3.75% for the repeatability of the method, this value being acceptable according to the AOAC that stable CV% not exceeding 5.3%, a recovery percentage of 115.70% which is above that established by the AOAC of 80-

110%, a recovery percentage above 100% indicates interference due to the matrix, Finally, a detection limit (LD) of 0.61 mg / L and a quantification limit (LC) of 1.4 mg / L were obtained.

A total of six samples of honey from so-called organic stores, markets and supermarkets in the city of Arequipa were analyzed. The concentration of HMF was determined by HPLC obtaining a concentration range of 585.40 mg / kg - 1365.6 mg / kg in four of the samples, results above the levels allowed by the Peruvian Technical Standard that establishes a maximum of 80 mg / kg , with the exception of two samples with a concentration below the LD and LC. In the UV-Visible Spectrophotometry method, an HMF concentration range of 596.4 mg / kg - 1471.9 mg / kg was obtained in four of the samples, these results being above the permissible levels, except for two samples with a concentration 7.4mg / kg and 19.9 mg / kg.

A two-factor analysis of variance was performed to determine if there is a significant difference between these two methods, obtaining a $p < 0.05$, so the null hypothesis is rejected, concluding that there is a significant difference between the two methods.

KEY WORDS: *Hydroxymethylfurfural, honey, high performance liquid chromatography, UV-Visible spectrophotometry, Maillard reaction, caramelization.*

INTRODUCCIÓN

La miel de abeja es un endulzante natural, compuesta por una mezcla compleja de agua, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, minerales y metabolitos secundarios (1).

El 5-Hidroximetil-2-furaldehído o Hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que es producido por las reacciones de pardeamiento no enzimático: Caramelización y Reacción de Maillard. El HMF no es un componente intrínseco de la miel por lo que suele estar ausente en miel fresca, su concentración aumenta cuando es sometida al calor, cuando es almacenada por largos periodos de tiempo o en condiciones inadecuadas y por adulteración con jarabes invertidos. Por esta razón, el HMF es un reconocido parámetro relacionado con la frescura y calidad de la miel (2).

El máximo nivel permitido en la normativa peruana actual según la Norma Técnica Peruana NTP (209.168.1999) es de 80mg/kg (3), valores superiores indican mieles añejas de baja calidad y/o excesivamente calentadas o adulteradas, por lo cual cambian sus propiedades. De aquí surge la importancia de la determinación de este compuesto dentro de los parámetros para el control de calidad que se le realizan a la miel ya que con el objetivo de garantizar al consumidor las propiedades nutricionales de la miel que adquiere, es necesario analizar los niveles de HMF en miel debido a que la disponibilidad limitada y el precio asociado al producto ha ocasionado que se generen prácticas para reducir costos de producción como la adulteración por adición de azúcares, que conduce al deterioro de las propiedades biológicas y nutricionales que caracterizan a la miel.

El Codex Alimentarius (Alinorm 01/25 2000) ha establecido que el contenido de HMF en miel después del procesamiento y / o la mezcla no debe ser superior a 80 mg / kg. La Unión Europea (Directiva de la UE 110/2001), sin embargo, recomienda un límite inferior de 40 mg / kg con la siguiente excepción: se permite 80 mg / kg para la miel que se origina en países o regiones con temperaturas tropicales (4).

La Comisión Internacional de la Miel (IHC) recomienda tres métodos para la determinación de HMF: 1) Método Espectrofotométrico basada en el protocolo de

Winkler (1955), 2) Método Espectrofotométrico basada en el protocolo de White (1979), y 3) Método Cromatográfico usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (5).

El método descrito por Winkler involucra la medida de la absorbancia UV de soluciones de miel con ácido barbitúrico y p-toluidina añadidos, mientras que el método descrito por White involucra la medida de la absorbancia UV de soluciones acuosas de miel clarificadas con y sin bisulfito y finalmente en el método de HPLC la miel es disuelta en agua y después del filtrado, se determina el HMF por HPLC de fase reversa, utilizando elución isocrática con agua y metanol como fase móvil, este método separa el HMF de otros componentes evitando así interferencias en la determinación las cuales pueden ser debido a varios aldehídos presentes en mieles de acuerdo a su origen floral o a productos que aparecen durante el acondicionamiento o almacenamiento (6).

Ambos métodos espectrofotométricos son rápidos, pero poco específicos y sensibles; en particular la interferencia positiva y el uso de p-toluidina, un compuesto carcinogénico reconocido sugiere que el método Winkler sea descartado. Por otro lado, el método RP-HPLC es más preciso y sensible que las espectrofotométricas, pero bastante lento (4).

En los últimos años la presencia de HMF en alimentos ha causado una preocupación toxicológica ya que estudios han demostrado que el HMF tiene efectos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Sin embargo, otros estudios sugieren que HMF no representa un riesgo grave para la salud, pero el tema sigue siendo objeto de debate. La creciente atención de la comunidad científica con respecto a los efectos potencialmente tóxicos de HMF requiere nuevos esfuerzos para establecer métodos rápidos, confiables y sensibles, para determinar el analito en matrices reales (4). Por los motivos mencionados y por su relación con la calidad de la miel es importante su cuantificación.

HIPÓTESIS

Dado que los niveles de Hidroximetilfurfural aumentan cuando la miel es sometida al calor, almacenada por largos periodos de tiempo y adulterada con jarabes invertidos; es probable que se encuentre en las diferentes mieles que se expenden en diversos lugares de la ciudad de Arequipa y por consiguiente pueda ser identificada y cuantificada mediante Espectrofotometría UV Visible y Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el contenido de Hidroximetilfurfural (HMF) por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por Espectrofotometría UV Visible en mieles comercializadas en Arequipa.

Objetivos específicos

1. Desarrollar y validar las técnicas analíticas para la determinación de HMF en mieles por Cromatografía líquida de alta resolución y por Espectrofotometría UV Visible.
2. Cuantificar el contenido de HMF por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por Espectrofotometría UV Visible en diferentes productos comerciales de mieles.
3. Comparar y evaluar los niveles de HMF obtenidos por HPLC y por espectrofotometría en los diferentes productos comerciales de miel.
4. Evaluar y valorar el control del contenido de HMF en mieles en la ciudad de Arequipa con fines de calidad verificando el cumplimiento de la Norma Técnica Peruana NTP (209.168.1999)

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. MIEL:

1.1. DEFINICIÓN DE MIEL:

El Codex Alimentarius para la miel (Codex Stan 12-1981) de la FAO, la define como una sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de la planta que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan en el panal hasta su maduración (7).

1.2. CLASIFICACIÓN DE LA MIEL:

Según el Codex Alimentarius la miel puede ser clasificada como (7):

- i. **Miel de flores o miel de néctar:** procede principalmente del néctar de las flores.
- ii. **Miel de mielada:** procede principalmente de excreciones que los insectos succionadores (Hemiptera) depositan sobre las partes vivas de las plantas, o de secreciones de las mismas. Su color varía de pardo muy claro, o verdoso, a pardo oscuro.

1.2.1. Según su origen botánico:

El Instituto de Normalización de Chile (2005) indica que la miel de flores se puede dividir en tres categorías (8):

- i. **Miel monofloral:** al menos 45% del total de sus granos de polen corresponden a una misma especie floral. Tiene un sabor y aroma específico.

- ii. **Miel bifloral:** compuesta por polen de dos especies florales, alcanzando en su conjunto un valor mínimo de 50% y en que ambas especies presentan un porcentaje que no difiere de un 5% entre ellos.
- iii. **Miel polifloral:** compuesta por granos de polen de 3 o más especies vegetales, sin que ninguna de ellas alcance un porcentaje mayor o igual al 45%. En el Perú, este tipo de miel es la más común.

1.2.2. Según método de elaboración:

El Codex Alimentarius para la miel (Codex Stan 12-1981) de la FAO, distingue 4 métodos de elaboración (7):

- i. **Miel centrifugada:** se obtiene mediante centrifugación de panales desoperculados, sin larvas.
- ii. **Miel prensada:** es la obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado, a una temperatura máxima de 45°C.
- iii. **Miel escurrida:** es la miel obtenida mediante el escurrimiento de los panales desoperculados, sin larvas.
- iv. **Miel filtrada:** miel que ha sido filtrada de manera que se elimine de manera significativa el polen.

1.2.3. Según su presentación:

La Norma Técnica Peruana (NTP 209.168.1999), clasifica a las mieles según su presentación de la siguiente forma (3):

- i. **Miel:** miel en estado líquido o cristalizado o una mezcla de ambos.
- ii. **Miel en panal:** miel almacenada por las abejas en panales recién construidos, sin larvas. Esta miel es vendida en pañales enteros, cerrados o secciones de tales panales.
- iii. **Miel en trozos:** miel que contiene uno o más trozos de panal.

- iv. **Miel cristalizada o granulada:** miel que ha experimentado un proceso natural de solidificación como consecuencia de la cristalización de la glucosa.
- v. **Miel cremosa (o montada):** miel que tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiere esa estructura fácil de untar.

1.3. CONSTITUYENTES DE LA MIEL:

Los principales componentes de la miel son los azúcares y el agua.

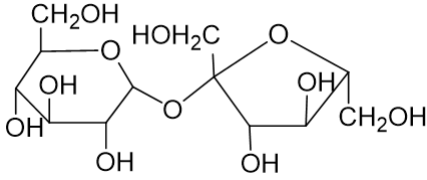
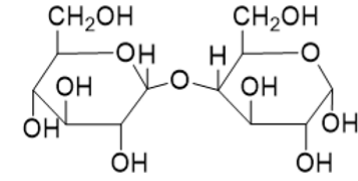
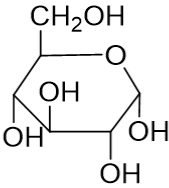
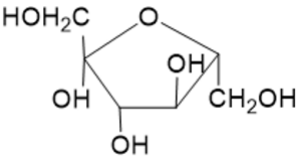
1.3.1. Azúcares:

Comprenden más del 95% de la materia seca. La mayoría de los azúcares presentes en la miel son azúcares simples de seis carbonos, fácilmente asimilables por el cuerpo, como la fructosa (38.2%) y la glucosa (31.3%) (8).

La miel de mielada contiene los trisacáridos melecitosa y rafinosa los cuales están ausentes en la miel de flores (9). La erlosa se considera un caracterizador de importancia en la miel de romero.

Entre los disacáridos, tenemos: maltosa, sacarosa, isomaltosa, maltulosa, turanosa, α y β trehalosa (principal carbohidrato de la linfa de algunos insectos), laminaribiosa, gentiobiosa y nigerosa. La sacarosa es un disacárido que cuando aparece en cantidades elevadas, evidencia la inmadurez de la miel o bien la adulteración de la misma con melazas por lo que se suele usar como indicador de buena maduración de la miel. La maltosa es el disacárido más importante con valores medios comprendidos entre 6.925% para mieles multiflores y 7.86% para las frutales. La melibiosa, otro disacárido de interés, se presenta en un bajo porcentaje que varía entre 0.45% hasta 0.61% para las mieles poliflores (10). En la Tabla 1.1 se puede observar los principales azúcares presentes en la miel.

Tabla 1.1: Azúcares principales presentes en la miel

| Azúcares | Estructura Química |
|----------|---|
| Sacarosa |  |
| Maltosa |  |
| Glucosa |  |
| Fructosa |  |

1.3.2. Agua:

Varía entre un 13 y 27% siendo su promedio de 17%. El contenido de agua está en función de factores ambientales como el clima y la estación del año (la miel tiende a captar humedad del medio ambiente, por ello las mieles conservadas en lugares húmedos tienden a presentar un mayor contenido acuoso), origen floral y regional, prácticas de cosecha y recolección de la miel y del contenido

de humedad del néctar. La miel madura tiene normalmente un contenido de humedad por debajo del 18.5 % y cuando se excede de este nivel, es susceptible a fermentar. Además, el contenido de agua en la miel es un factor importante en su calidad ya que influye en su viscosidad, peso específico y color, influyendo así en su conservación y en sus características organolépticas. Después de la extracción de la miel de la colmena, su contenido de humedad puede cambiar dependiendo de las condiciones de almacenamiento.

La disponibilidad del agua en la miel puede variar como consecuencia de los fenómenos de cristalización. Cuando la miel cristaliza se origina una separación de fases, provocando un aumento de la actividad de agua en la capa superior. Cuando el contenido en agua supera el 18%, puede fermentarse, aunque dependerá también de la carga microbiana inicial, el tiempo y la temperatura de almacenamiento (11).

Otros constituyentes de la miel son:

1.3.3. Ácidos orgánicos:

Se encuentran en un 0.57% siendo responsables de la acidez de la miel y contribuyendo al sabor de esta (8). Además, contribuye a la protección del producto frente a la proliferación de microorganismo (10). El principal ácido, es el ácido glucónico el cual es producto de la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa. Entre otros ácidos tenemos al: ácido acético, butírico, cítrico, fórmico (presente también en el veneno de las abejas), láctico, málico, piroglutámico y succínico (9). Se encuentran como ácidos libres y también como lactonas constituyendo estas últimas una reserva de acidez para la miel, ya que puede liberarse en caso de alcalinización. El contenido de ácidos en la miel varía de acuerdo al origen de la miel. La miel también contiene ácidos fenólicos entre los que se encuentra el cafeico, cinámico y ferúlico, que le confieren propiedades antioxidantes (10).

Todos estos ácidos tienen en común la capacidad de disociarse en solución acuosa cediendo al medio iones de hidrógeno, cuya concentración se determina mediante la medida del pH y nos da información sobre la acidez de la miel (11). El pH de la miel de flores varía entre 3.3 y 4.6, a excepción de la miel de castaña con un valor de pH de 5 a 6. Las mieles de mielada tienen un pH más alto, debido a su contenido alto en minerales, variando de 4.5 a 6.5. La miel es un buffer, lo que significa que su pH no varía por adición de pequeñas cantidades de ácidos y bases. La capacidad buffer es debida al contenido de fosfatos, carbonatos y otras sales minerales (9).

El efecto combinado de su acidez y el peróxido de hidrógeno ayudan a la conservación del néctar y la miel (11).

1.3.4. Minerales:

Las mieles de flores tienen un contenido de 0.1 y 0.3% del contenido total de la miel mientras que la miel de mielada puede alcanzar el 1%. Entre los minerales tenemos: zinc (Zn), cobre (Cu), calcio (Ca), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn) y Fósforo (P), este último siendo el más abundante con un promedio de un tercio del total de minerales (9).

1.3.5. Elementos trazas:

Estos elementos dependen principalmente del origen botánico de la miel, por lo que es posible diferenciar entre diferentes mieles monoflorales por determinación de los diferentes elementos trazas. Entre los elementos trazas tenemos: aluminio (Al), arsénico (As), bario (Ba), bromo (Br), cadmio (Cd), cloro (Cl), cobalto (Co), fluor (F), iodo (I), plomo (Pb), litio (Li), molibdeno (Mo), níquel (Ni), rubidio (Rb), silicio (Si), estroncio (Sr), azufre (S), vanadio (V), zirconio (Zr) (9).

1.3.6. Aminoácidos y proteínas:

Su contenido es de aproximadamente 0.7%. La miel contiene casi todos los aminoácidos fisiológicamente importantes. El principal aminoácido es la Prolina la cual es un indicador de la madurez de la miel, su contenido debe ser mayor a 200 mg/kg, los valores por debajo de 180 mg/kg significan que la miel probablemente ha sido adulterada por adición de azúcar (9).

Las proteínas presentes en la miel son principalmente enzimas (9), las cuales provienen de las secreciones de glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras, fluidos salivales y néctar de las plantas, son de carácter termolábil y su actividad disminuye con el envejecimiento, por lo que su presencia es indicadora de calidad de la miel (10). Las abejas añaden diferentes enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel (11).

La diastasa (alfa-amilasa y beta-amilasa) cataliza la hidrólisis de azúcares y almidón, la alfa amilasa hidroliza las cadenas de almidón al azar, produciendo una variedad de dextrinas y la beta amilasa separa el azúcar de la maltosa (8). La invertasa (sacarasa, alfa-glucosidasa) cataliza principalmente la conversión de sacarosa a glucosa y fructuosa, y a la vez muchas otras conversiones. Las otras dos enzimas principales son la glucosa oxidasa y catalasa las cuales regulan la producción de peróxido de hidrogeno, el cual es uno de los factores antibacteriales de la miel.

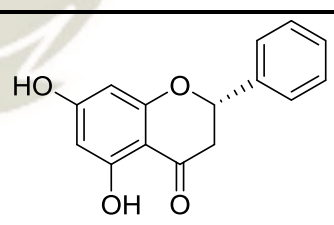
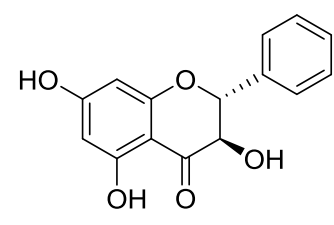
La diastasa e invertasa desempeñan un papel importante en la calidad de la miel y son usados como indicadores de la frescura de la miel. Un valor mínimo de 8 unidades de diastasa es aceptado por el Codex Alimentarius y la Directiva Europea, su actividad decae cuando se almacena y se calienta la miel. La invertasa es más susceptible de daños por almacenamiento y calor, y se utiliza en algunos países como indicador de la frescura de la miel. Las mieles frescas tienen al menos 10 unidades según Hadorn o 64 unidades internacionales (9).

La actividad de la diastasa e invertasa varían en amplios límites, dependiendo del origen botánico de la miel, por lo tanto, tienen un poder limitado como indicador de frescura. Es por eso que el HMF es un mejor indicador de la calidad (9).

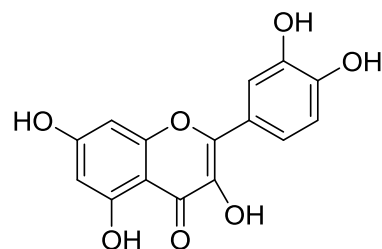
1.3.7. Compuestos fenólicos:

Entre los flavonoides destacan: Pinocembrina, Pinobanksina, Quercetina, Kaempferol, Crisina, Galangina, encontrándose principalmente Pinocembrina, a la cual se le atribuye diversas propiedades como la antioxidante (8). En la Tabla 1.2 se observan los principales flavonoides presentes en la miel. Los ácidos fenólicos y polifenoles han sido sugeridos como marcadores para la determinación del origen botánico de la miel. En mieles oscuras se ha reportado un mayor contenido de ácidos fenólicos, pero menos flavonoides que en mieles más claras (9).

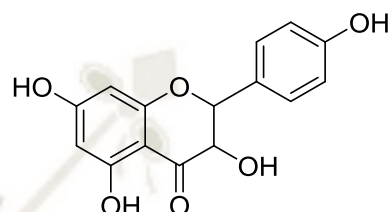
Tabla 1.2: Principales flavonoides presentes en la miel.

| Flavonoides | Estructura Química |
|--------------|--|
| Pinocembrina |  |
| Pinobanksina |  |

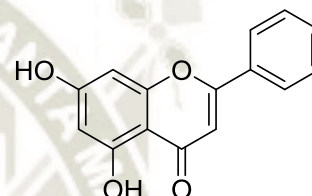
Quercetina



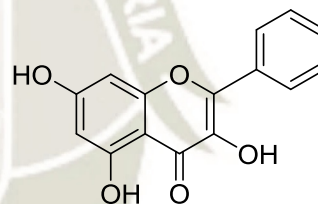
Kaempferol



Crisina



Galangina



1.3.8. Pigmentos:

El color de la miel es dado por los pigmentos. Se han identificado dos fracciones: hidrosoluble y liposolubles. En las mieles claras domina la fracción liposoluble y en las oscuras la hidrosoluble. En la fracción liposoluble se han encontrado carotenoides, mientras que en los hidrosolubles compuestos polifenólicos cuya oxidación da lugar a compuestos de los tonos oscuros (10).

1.3.9. Compuestos carboxílicos, alcoholes y ésteres:

Estos compuestos volátiles contribuyen al aroma y sabor de la junto con los azúcares y ácidos, así como con los alcaloides procedentes de la planta

originaria. Dentro de los compuestos carboxílicos están: formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, isobuturaldehído, isovaleraldehído, metacroleína y acetona. Los alcoholes más importantes son: isopropanol, etanol, 2-butanol, n-propanol, 3-pentanol, isobutanol, alcohol bencílico y 2-metil, 1-butanol. Y de los ésteres se destacan el formiato de metilo y formiato de etilo (8).

Otros componentes presentes en la miel son algunas vitaminas como: B2, B4, B5, B6, B11 y vitamina C (8).

1.4. PARÁMETROS DE CALIDAD FÍSICOQUÍMICOS:

1.4.1. Diastasa:

La Diastasa proviene del néctar de las flores, fluidos salivales y secreciones de las glándulas faríngeas de las abejas. Su principal función es catalizar la hidrólisis del almidón liberando dextrinas y maltosa (8).

La actividad de la Diastasa en la miel se mide como el tiempo de reacción en el cual una masa definida de miel es capaz de hidrolizar una cantidad definida de almidón. Esto se expresa como número de Diastasa (ND), el cual se define como la cantidad de enzima en 1 g de miel capaz de degradar 0,01 g de almidón, en 1h y a 40 °C. Los resultados se indican en unidades Gothe (unidades Schade) por gramo de miel (8).

Esta enzima al romper enlaces glicosídicos en oligo y polisacáridos ayuda a mantener el equilibrio de los azúcares en la miel evitando de esa forma la cristalización (10).

Se ha demostrado que la actividad de esta enzima disminuye con el calentamiento (ya que es termolábil) y tiempo de almacenamiento de la miel,

es por ello es que se utiliza como indicador para medir la calidad de la miel y su grado de frescura (8).

1.4.2. Acidez:

Su origen está principalmente en las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la maduración y almacenamiento del producto. La acidez es una característica importante de la miel, ya que la protege frente al ataque microbiano y contribuye a darle aroma y sabor, así como le confiere propiedades antibacterianas y antioxidantes (10).

En la miel pueden distinguirse tres tipos de acidez: libre, láctica y total, todas ellas influenciadas por el origen botánico. La acidez libre de la miel proviene de todos los ácidos en estado libre. La acidez también se relaciona con la probable fermentación por desarrollo de microorganismos, pues durante las fermentaciones los azúcares de la miel se transforman en alcoholes y ácidos por acción de levaduras. La acidez láctica puede considerarse como una reserva potencial de acidez ya que la reserva en lactonas origina ácidos cuando la miel se alcaliniza. Las lactonas están constituidas básicamente por las glucolactonas, que están en equilibrio con el ácido glucónico formado por acción de la glucosa oxidasa. Ambos tipos de acidez aumentan durante el almacenamiento, siendo mayor el incremento de las lactonas que de los ácidos libres. Durante el envejecimiento de la miel se da un aumento de la acidez debido a la acción de la glucosa oxidasa, que transforma los azúcares en ácidos. La suma de la acidez libre y la acidez láctica se denomina acidez total (10).

1.4.3. pH:

La evaluación de este parámetro resulta de gran importancia durante los procesos de extracción y almacenamiento, ya que influye en el desarrollo

microbiano y es capaz de alterar la textura, viscosidad y resistencia a las agresiones externas de la miel (10).

1.4.4. Humedad:

Entre las razones por las que puede incrementarse el porcentaje de humedad, la más común es la cosecha de la miel antes de alcanzar la humedad adecuada, lo cual indica una falta de maduración de la miel en panal. Sin embargo, también puede originarse durante la extracción de la miel y por exposición de la miel en ambientes húmedos por periodos de tiempo prolongados; con cierta frecuencia puede atribuirse también al almacenamiento en condiciones inadecuadas. Un alto porcentaje de agua favorece el desarrollo de mohos y levaduras, por lo que la miel con altos porcentajes de humedad se fermenta fácilmente (10).

1.4.5. Cenizas:

El contenido de cenizas es un criterio de calidad para evaluar el origen botánico de la miel, debido a que los minerales provenientes del suelo son llevados a la miel por medio del polen el cual es recolectado desde las plantas por las abejas. Actualmente, para determinar las cenizas se realiza mediciones de conductividad eléctrica. El potasio como uno de los mayores constituyentes presentes en las cenizas, además se le atribuye la responsabilidad de la propiedad antibacteriana (8).

Su contenido varía también según las condiciones según las técnicas de extracción. Es, por tanto, que un elevado contenido de cenizas está relacionado con problemas de higiene (tierra y arena). La miel adulterada con melaza también puede presentar un alto porcentaje de cenizas (10).

1.4.6. Color:

El color de las mieles se debe principalmente a su contenido de pigmentos como: carotenos, xantófilas y a compuestos fenólicos, como flavonoides que se encuentra en el néctar de las flores (10).

Sin embargo, también se relaciona con su contenido mineral (al formarse sales minerales se forman más compuestos pardos y la miel será más oscura), grado de frescura, temperatura de los tratamientos térmicos y tiempo de almacenamiento (a mayor concentración de HMF el color de la miel será más oscura).

1.4.7. Sólidos insolubles en agua:

La miel es sometida a un proceso de filtración y sedimentación para eliminar restos de insectos, granos de arena, trozos de panal, restos de cera, polvo y otros sólidos insolubles. Un valor que supere el máximo de sólidos insolubles puede deberse a un filtrado inadecuado y/o problemas de higiene (10).

1.4.8. Fenoles totales:

Los compuestos fenólicos están constituidos por un anillo aromático y al menos un grupo hidroxilo en cualquier posición. Normalmente tienen un anillo de un grupo funcional (alcohol, ácido, aldehído) que le da unas características determinadas y uno o varios sustituyentes en cualquier posición libre. Las tres familias principales presentes en la miel son: ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y flavonoides, pigmentos como la clorofila, carotenoides y derivados de los taninos son compuestos que afectan al color de la miel (10).

1.5. REQUISITOS:

La Norma Técnica Peruana (NTP 209.168.1999), establece los siguientes requisitos (3):

- i. La miel no deberá tener ningún sabor, aroma o contaminación inaceptable que haya sido absorbida de una materia extraña durante su elaboración y almacenamiento. La miel no deberá haber comenzado a fermentar o producir efervescencia.
- ii. La miel no deberá calentarse en medida tal que se menoscabe su composición y calidades esenciales.
- iii. La miel que se ponga a la venta al por menor o que se utilice en cualquier producto para consumo humano deberá estar exenta de moho visible y de sustancias inorgánicas y orgánicas extrañas a su composición, tales como insectos, restos de insectos, larvas o granos de arena.
- iv. La miel no deberá contener sustancias tóxicas que deriven de microorganismos o plantas en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud.
- v. No se permite ningún aditivo alimentario.

En la Tabla 1.3 se observan los parámetros de calidad que debe de cumplir la miel para ser comercializada.

Tabla 1. 3: Parámetros de calidad de la miel.

| Parámetros de Calidad | Tipo de miel | Valor permitido |
|---|--|--|
| Contenido aparente de azúcar reductor, calculado como azúcar invertido | Mieles no indicadas a continuación | Mínimo 65 % |
| | Miel de mielada | Mínimo 60 % |
| | Blackboy (<i>Xanthorrhoea preissii</i>) | Mínimo 53 % |
| Contenido de humedad | Mieles no indicadas a continuación | Máximo 21 % |
| | Miel de brezo (<i>Calluna</i>) | Máximo 23 % |
| | Miel de trébol (<i>Trifolium</i>) | Máximo 23 % |
| Contenido aparente de sacarosa | Mieles no indicadas a continuación | Máximo 5 % |
| | Miel de mielada, mezclas de miel de mielada y miel de flores, Robinia, espliego, Citrus, Alfalfa, meliloto, "Red Gum" (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>), Acacia "Leatherwood" (<i>Eucryphia lucinda</i>), "Menzies Banksia" (<i>Banksia menziesii</i>), "Red Bell" (<i>Calothamnus sanguineus</i>), "White stringy bark" (<i>Eucalyptus scabra</i>), "Grand Banksia" (<i>Banksia grandis</i>), "Blackboy" (<i>Xanthorrhoea preissii</i>) | Máximo 10 % |
| | | Máximo 15 % |
| Contenido de sólidos insolubles en agua | Mieles distintas de la miel prensada | Máximo 0.1 % |
| | Miel prensada | Máximo 0.5 % |
| Contenido de sustancias minerales (cenizas) | Mieles no indicadas a continuación | Máximo 0.6 % |
| | Miel de mielada o una mezcla de miel | Máximo 1.0 % |
| Acidez | Todas las mieles | Máximo 40 miliequivalentes de ácido por 1000 gramos. |
| Actividad de la diastasa | Todas las mieles | Mínimo 3 |
| Contenido de Hidroximetilfurfural | Todas las mieles | Máximo 80 mg/kg |

Fuente: NTP 209.168.1999 (3)

1.6. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LA MIEL:

Según su clasificación la miel puede proceder del néctar de las flores y de las secreciones azucaradas depositadas en las plantas por ciertos insectos y de los exudados dulces de ciertas partes vivas de las plantas. Estos productos son absorbidos por las abejas, pasan a un buche (pequeña bolsa elástica que poseen separada del aparato digestivo), donde se mezclan con enzimas procedentes de las glándulas salivares de las abejas, que inician el proceso de transformación de las sustancias melíferas en miel. Dentro de la colmena la recolectora regurgita el contenido de su buche y son otras abejas las que finalizan el proceso pasando la bola de néctar de una a otra, enriqueciéndola con más enzimas, hasta depositarla en las celdillas del panal (12).

La miel es un producto alimenticio y como tal, el proceso de obtención requiere prácticas de higiene muy cuidadosas. Por esta razón el lugar destinado a la extracción de miel sólo debe servir para esta operación y estar libre de todo lo que sea extraño al mismo proceso (8).

Las actividades que se realizan en el proceso de extracción de la miel son las siguientes:

1.6.1. Desoperculado:

Consiste en la remoción de los opérculos, los cuales son capas o sellos de cera con los que las abejas han cerrado las celdas del panal una vez que la miel está madura en la colmena. Las abejas operculan la miel sólo cuando ésta ha alcanzado el contenido óptimo de humedad (inferior al 18%) la cosecha de miel no operculada, aumentará el riesgo de fermentación. El sistema de desoperculado más difundido es mediante calor, su empleo incorrecto a altas temperaturas, produce graves alteraciones en la calidad de la miel, elevando los niveles de HMF y el color, para evitar las consecuencias del mal uso del

desoperculado por calor se suele utilizar cuchillos de acero inoxidable para remover el opérculo (14).

En el caso de realizar el proceso de extracción y separación de la cera de opérculo de la miel se tiene que tener en cuenta que cuando la cera de opérculo está recién extraída se puede separar bien de la miel por centrifugación, cuando pasa el tiempo parte de la miel cristaliza sobre la superficie de los opérculos y la separación es más difícil. Para esta separación se recomienda usar las separadoras mecánicas que trabajen en frío ya que permite incorporar la miel recuperada por este proceso a la extraída (15), además de evitar los sistemas con calor los cuales pueden provocar que los niveles de HMF se elevan en gran medida y la disminución de la actividad diastásica (16), por lo que en el caso de utilizar los sistemas que usan calor la miel recuperada no se mezclara con la del extractor, esta podrá ser vendida a la industria para ser utilizada como materia prima (15).

1.6.2. Ecurrido de cuadros:

Luego del desoperculado los cuadros comienzan a escurrir la miel por lo que se depositan los cuadros de miel preferentemente sobre bandejas de acero inoxidable o de grado alimentario, luego se revisan los cuadros y se detectan aquellos que no fueron correctamente desoperculados y se procede a abrir los opérculos con la ayuda de un peine de acero inoxidable (14).

1.6.3. Extracción:

La extracción es un proceso por el cual se sustrae la miel del panal, recolectándose además de miel, porciones de cera y algunas impurezas (restos de abejas, madera, etc). Se realiza en un extractor el cual es un recipiente cilíndrico de capacidad variable, en el cual se coloca una canastilla en la que se depositan los cuadros desoperculados para extraer la miel utilizando fuerza centrífuga (8).

1.6.4. Tamizado o Filtrado:

El filtrado de la miel es un proceso opcional ya que algunos establecimientos realizan el proceso de sedimentación. Se realiza para eliminar la mayor cantidad de impurezas que se obtienen junto a la miel, como restos de cera, abejas, etc. Se emplean tamices con mallas de acero inoxidable, el número de estos varía de acuerdo a la cantidad de impurezas, estos se colocan a la salida del extractor y filtra la miel que va al depósito, fosa o tanque. Se recomienda el uso de tamices con diámetro menor a 5 mm (14).

1.6.5. Utilización de depósito de miel y bombeo (opcional):

El depósito de miel se ubica a la salida del extractor, debe de mantenerse cerrado y abrirse sólo en caso de limpieza o reemplazo del tamiz. La capacidad de la bomba a ser utilizadas para extraer la miel del depósito deberá ser acorde al volumen y viscosidad de la miel, estas no deben de batir ni espumar la miel para no agregar aire, se aconseja implementar un sistema de bombeo automático con alarma o sistema de corte y arranque de la bomba. El bombeo puede realizarse hacia un tanque decantador, o hacia tambores para su almacenamiento. Las cañerías de transporte de miel hacia el tanque decantador y/o tambores deben ser de acero inoxidable grado alimentario (14).

1.6.6. Sedimentación o Decantado:

Este proceso se realiza en caso de no realizarse el filtrado. El decantado es un sistema físico de reposo de la miel obtenida, que se utiliza para que las posibles partículas pesadas caigan hacia el fondo del tanque y las más livianas queden arriba. En este proceso se logra la separación de las partículas e impurezas presentes en la miel a través del reposo para lo cual se utilizan tanques con tapa para evitar contaminaciones. Los materiales sólidos (tales como partículas y otras impurezas) se acumulan en la parte superior. Una buena decantación de logra en 48 horas, no debe de dejar la miel en los tanques más de 5 días,

especialmente aquellas de fácil cristalización o cuando la temperatura ambiente desciende (14).

1.6.7. Envasado en tambores y almacenamiento:

Las condiciones de almacenamiento son un punto crítico en la cadena de producción. Si no se tiene un local resguardado de los rayos solares, la lluvia, con piso de cemento y una correcta manipulación de tambores, la miel envasada sufrirá modificaciones físicas y químicas que afectarán negativamente su calidad. Los tambores en los que se almacenan deben de tener un recubrimiento interno de resina fenólica horneada o pintura epoxica, en el caso de emplearse tambores usados deberán proceder de la industria alimenticia y ser lavados perfectamente (8).

Los tambores se deben almacenar en locales cerrados que impidan la entrada del agua y no exponerlos a la luz solar. La acción del sol eleva los valores de HMF y disminuye la actividad diastásica de la miel. El lugar de almacenamiento se tiene que mantener siempre fresco y ventilado, con humedad relativa ambiente menor a 70 °C, a fin de disminuir los riesgos de deterioro por absorción de humedad, se debe asegurar una temperatura de almacenamiento inferior a 20°C para evitar el deterioro en la miel y evitar temperaturas altas por periodos prolongados (14).

2. HIDROXIMETILFURFURAL:

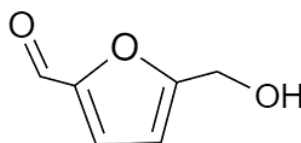


Figura 1. 1: Estructura química del 5-Hidroximetil-2-furaldehído.

5-Hidroximetil-2-furaldehído o Hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído cíclico que es producido por reacciones de pardeamiento no enzimático como la caramelización y la reacción de Maillard por lo que se forma por la condensación de un compuesto carbonílico (azúcar reductor) y una amina (aminoácido, péptido o proteína) lo que produce una destrucción de un aminoácido junto con la aparición de algunos productos antinutritivos, algunos tóxicos. Por esta razón, es importante el estudio de productos de la reacción, incluyendo la HMF y compuestos relacionados (2).

La concentración de HMF es ampliamente reconocida como un parámetro que afecta la frescura de la miel ya que este compuesto no es intrínseco de la miel por lo que está usualmente ausente (o presente en pequeñas cantidades) en miel fresca, mientras que su concentración tiende a aumentar durante el procesamiento y/o debido al envejecimiento de la miel (17). Debido a que la reacción de formación se lleva a cabo a altas temperaturas (30°-34°C) las mieles no deberían presentar una concentración muy alta de HMF (8).

Estudios previos han reportado que la miel almacenada a bajas temperaturas y/o en ambientes frescos tienen bajos o mínimas concentraciones de HMF, mientras que la miel no fresca y/o almacenada a temperaturas medias o altas tienen altas concentraciones de HMF (17).

2.1. TOXICOLOGÍA:

El tratamiento térmico, así como el almacenamiento de los alimentos producen una serie de reacciones que conducen a compuestos que pueden afectar en la salud. A pesar de ser el HMF una sustancia conocida en la industria alimentaria y química desde hace décadas, la relación entre HMF y sus metabolitos, y la salud no se ha estudiado en detalle hasta el año 2006 (18).

Existen evidencias del efecto potencialmente nocivo del HMF basadas en ensayos in vitro y en experimentos realizados en animales de laboratorio.

Diferentes estudios han demostrado que el HMF a elevadas concentraciones presenta efectos citotóxicos provocando irritación en membranas mucosas, piel, ojos y tracto respiratorio superior.

Sin embargo, el principal riesgo para la salud es derivado de la presencia del HMF ya que el HMF es transformado a 5- sulfoximetilfurfural (SMF) por acción de las enzimas sulfotransferasas (SULT) cómo se puede observar en la Figura 1.2. En el año 2009, se detectó por primera vez el SMF in vivo en sangre de ratones. Este derivado del HMF induce efectos genotóxicos y mutagénicos en bacterias y líneas celulares de mamíferos debido a que la interacción del SMF con ADN, ARN y proteínas puede provocar daños estructurales en estas macromoléculas (18), dichos efectos son productos de la mayor reactividad del SMF frente al HMF, ya que el grupo sulfato ubicado en la posición alílica puede ser escindido espontáneamente resultando en un compuesto electrofílico. Sin embargo, no existe evidencia que el SMF es formado a partir del HMF en humanos, ya que no ha sido detectado en orina (17).

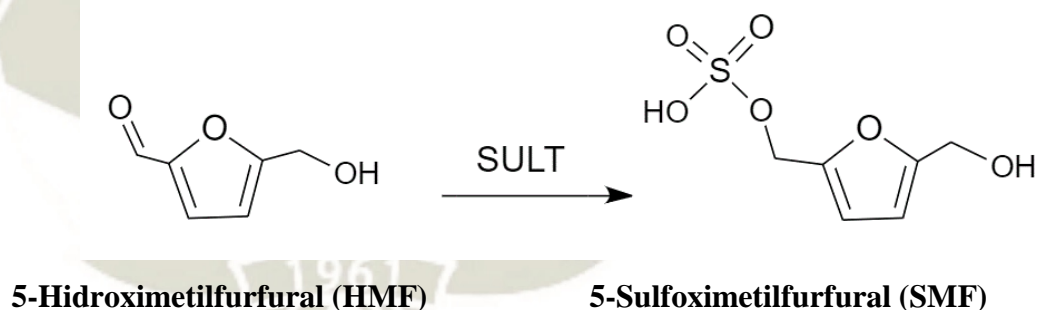


Figura 1. 2: Metabolismo de 5-Hidroximetilfurfural (HMF) a 5-Sulfoximetilfurfural (SMF)

Fuente: Adaptado de Lorenzo,G (18).

La ingesta diaria estimada de HMF está en un rango de 4 a 30 mg por persona al día (19). La toxicidad aguda por vía oral del HMF como compuesto puro es relativamente baja, siendo la dosis letal (DL50) de 2.5 g/kg de peso corporal

en ratas (18). La dosis máxima observada sin efectos adversos es de 80-100 mg/kg de peso corporal por día (19).

En roedores, el SMF se ha identificado como nefrotóxico iniciador y promotor del cáncer de colon y de procesos nefrotóxicos (18). El Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos llevó a cabo un estudio durante 2 años sobre la carcinogenicidad del HMF encontrando que el HMF aumentaba la incidencia de adenomas hepatocelulares en ratones hembra, no obstante Abraham (19) observó que esta incidencia no dependía de la dosis, además que la cepa utilizada en el estudio (B6C3F1) es conocida por poseer una alta susceptibilidad a la formación de tumores en el hígado, en ese estudio no se reportó carcinogenicidad en ratas de ambos géneros ni en los ratones machos, es por esto que Abraham considera la relevancia de ese estudio como dudosa (19). Más tarde, el HMF ha demostrado ser un carcinógeno débil en ratones debido al aumento significativo del número de pequeños adenomas intestinales (18).

Para humanos, la enzima sulfotransferasa más importante es la *SULT1A1* que tiene una mayor actividad enzimática que la *SULT* de roedores. Así mismo los humanos expresan la *SULT* en diferentes tejidos, mientras que los roedores expresan la *SULT* principalmente en el hígado, ejemplo de esto es que el intestino de humanos es rico en *SULTs*, mientras que en los ratones los niveles de esta enzima son muy bajos en el intestino, comparados a los niveles que se encuentran en su hígado (20). Por lo que los humanos podrían ser más sensibles a los efectos tóxicos del HMF (19).

En el estudio llevado por Zhang en ratas se encontró que la administración de HMF aumentaba el número y tamaño de las fosos de criptas aberrantes (FCA) las cuales son una agrupación de glándulas anormales en forma de tubo en el revestimiento del colon y el recto, los FCA se forman antes que los pólipos colorrectales y son uno de los cambios más tempranos que se pueden observar en el colon y que pueden conducir a un cáncer en el colon, por el contrario, en otro estudio a corto plazo se usaron ratones transgénicos que expresen un alto

nivel del SULT1A1 Y SULT2A2 humano en distintos tejidos. Esta modificación genética lleva a un claro incremento de la sulfatación de HMF a SMF, en este experimento ni el HMF ni el SMF indujeron la formación FCA preneoplásicos (17).

Estos resultados conducen a dudar si el HMF tiene potencial carcinogénico o no. Además, existen hallazgos contradictorios sobre la posible carcinogenicidad de HMF, y la evidencia de su potencial carcinogénico es muy limitada. A su vez, el número de estudios realizados y las especies utilizadas son limitadas. Basándose en los resultados disponibles, los posibles riesgos de efecto carcinogénico, no son actualmente identificables por lo que se estima que son extremadamente bajos (17).

2.2. MECANISMO DE FORMACIÓN:

El HMF es un compuesto intermedio en la Reacción de Maillard que se produce cuando los azúcares reductores se calientan en presencia de aminoácidos. La Caramelización es una ruta alternativa, la cual consiste en la deshidratación térmica directa de fructosa, sacarosa, y en menor medida, de glucosa, no requiere la presencia de grupos amino y está catalizada en condiciones ácidas. En la Figura 1.3 se representan las principales rutas de formación del HMF (18).

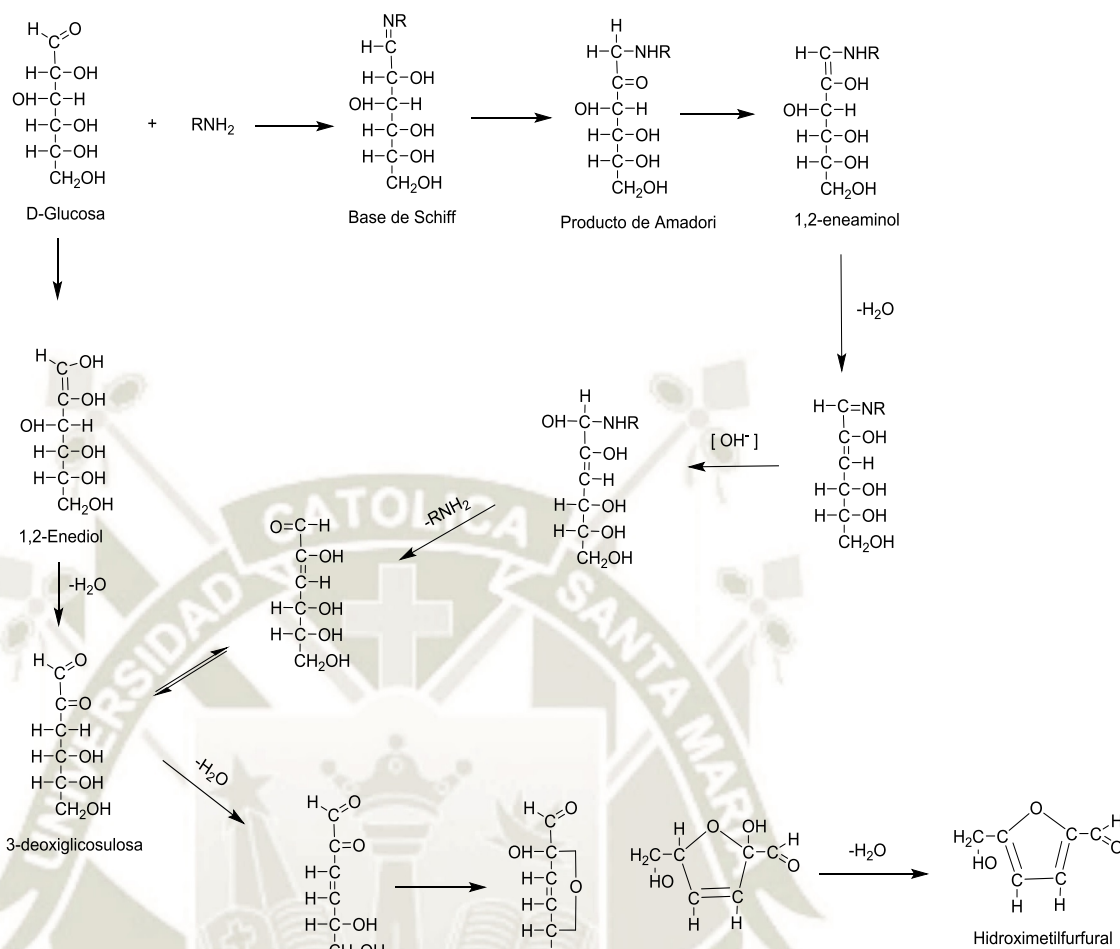


Figura 1.3: Principales rutas de formación del 5- Hidroximetilfurfural. Adaptado de Lorenzo, G (18).

2.2.1. REACCIONES DE OSCURECIMIENTO O DE PARDEAMIENTO:

Durante la fabricación, el almacenamiento y otros procedimientos en que intervienen, muchos alimentos desarrollan una coloración que, en ciertos casos, causa la mejora de sus propiedades sensoriales, mientras que en otros las deteriora; la complejidad química de los alimentos hace que se propicien diversas transformaciones responsables de estos cambios.

En estas reacciones se sintetizan compuestos de colores que van desde un ligero amarillo hasta el café oscuro; dichos mecanismos se han clasificado como reacciones enzimáticas y no enzimáticas en el segundo grupo se incluyen la caramelización y la reacción de Maillard (21). Como se mencionó anteriormente, el HMF es un compuesto intermedio en la Reacción de Maillard y la Caramelización es una ruta alternativa en su formación.

Tabla 1. 4: Aspectos generales de la Caramelización y de la Reacción de Maillard

| Mecanismo de formación | Grupos amino necesarios | Temperatura elevada | pH óptimo | Azúcares reductores |
|------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| Caramelización | No | Sí | Alcalino /ácido | Sí |
| Maillard | Sí | No | Alcalino | Sí |

Fuente: Adaptado de Budai (21).

2.9 Aspectos generales de las reacciones

2.2.2. REACCIÓN DE MAILLARD:

Esta reacción, conocida también como reacción de oscurecimiento de Maillard, designa un grupo muy complejo de transformaciones que traen consigo la producción de múltiples compuestos. Entre ellos pueden citarse las melanoidinas coloreadas, que van desde amarillo claro hasta café oscuro e incluso negro, y afectan también el sabor, aroma y valor nutritivo del alimento; además, dan lugar a la formación de compuestos mutagénicos o potencialmente carcinogénicos, como la Acrilamida y el HMF.

Para que tales reacciones se lleven a cabo se requiere un azúcar reductor (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre, proveniente de un aminoácido o de una proteína.

Esta reacción se da con frecuencia durante el almacenamiento y en procesos como el horneado, tostado, fritura, etc. Confiriéndoles nuevos colores, olores, sabores y texturas agradables para el consumidor, aunque también pueden originarse sustancias aromáticas y compuestos pardos indeseados. Además, puede disminuir el valor nutritivo de los alimentos, principalmente el de afectar la calidad de las proteínas, debido a la destrucción de aminoácidos o disminución de su biodisponibilidad, y la de otros nutrientes (21).

i. QUÍMICA DE LA REACCIÓN DE MAILLARD:

Como se puede observar en la Figura 1.3 el HMF se forma por degradación del producto de Amadori a través de una enolización- 1,2, siendo la 3-deoxiglicosulosa el intermedio clave. Cuando el medio de reacción y las condiciones térmicas son apropiados, el compuesto de Amadori forma el 1,2-eneaminol, el cual pierde un grupo hidroxilo en el C- 3 y sufre una desaminación en el C- 1 formando así el compuesto intermedio 3-deoxiglicosulosa. La 3- deoxiglicosulosa se cicla y genera un hemiacetal el cual se deshidrata formando finalmente el HMF (18).

ii. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA REACCIÓN DE MAILLARD:

a) Carbohidratos:

Los azúcares reductores que más favorecen la reacción de Maillard son, primero, las pentosas, y segundo, las hexosas; asimismo, las aldosas actúan más fácilmente que las cetosas, y los monosacáridos son más efectivos que los disacáridos. De acuerdo con ello y en términos generales, la xilosa es el azúcar más activo, seguido de la galactosa, la glucosa, la fructosa, la lactosa y la maltosa; por su parte, la sacarosa, que carece de poder reductor, interviene sólo si se hidroliza previamente. Este ordenamiento no es estricto, ya que, en el freído de papas, la fructosa es más activa que la glucosa (17).

b) Proteínas y aminoácidos:

El tipo de aminoácido es decisivo ya que será más reactivo en la medida en que se tenga más de un grupo amino. La lisina es el más activo; también pueden intervenir otros aminoácidos, como la arginina, la histidina y el triptófano. Se sabe que en los sistemas modelo de glucosa-aminoácido, la velocidad se incrementa con los aminoácidos cuyo grupo amino está más alejado del carboxilo (17).

c) Concentración de hidratos de carbono y proteínas:

Para que se lleve a cabo la reacción es necesario que estén presentes los 2 sustratos: hidratos de carbono y proteínas. Al aumentar la concentración de estos sustratos en el alimento, mayor será la intensidad de la reacción.

d) Tiempo y temperatura de cocción:

Las temperaturas elevadas aceleran la reacción es decir que, si bien la reacción puede ocurrir a temperatura ambiente, se ve favorecida a altas temperaturas, pero debido a que su energía de activación (E_a) es baja, se observa de igual manera en condiciones de refrigeración, al aumentar el tiempo de cocción, aumenta la intensidad de la reacción. En términos generales, la E_a es del orden de 16 a 30 kcal/mol, y el valor de su coeficiente de temperatura, Q_{10} (en el intervalo de 0 a 70°C), es de 2 a 3; es decir, por cada 10°C de aumento, la velocidad se incrementa entre dos y tres veces (17).

e) pH:

A pH alcalino ($pH > 7$) se incrementa la velocidad y alcanza un máximo a pH 9. Por lo contrario, el mecanismo se inhibe en condiciones muy ácidas (pH 3). La cantidad de azúcares acíclicos incrementa al incrementar el pH. El pH de la miel de flores varía entre 3.3 y 4.6, a excepción de la miel de castaña con un

valor de pH de 5 a 6. Las mieles de mielada tienen un pH más alto, debido a su contenido alto en minerales, variando de 4.5 a 6.5 (17).

f) Actividad de agua (a_w):

Los alimentos de humedad intermedia, con valores de actividad de agua de 0.6 a 0.9, son los que más favorecen esta reacción, una actividad de agua menor no permite la movilidad de los reactivos y al contrario una actividad de agua mayor ejerce una acción inhibitoria ya que el agua diluye a los reactivos (17).

g) Metales:

El cobre y el hierro tienen un efecto catalizador sobre la formación de las melanoidinas en la última etapa de esta reacción. El oxígeno y las radiaciones electromagnéticas actúan de manera semejante. La ausencia de estos agentes (metal, luz y oxígeno) no previene el inicio de la reacción, ya que sólo favorecen la polimerización final (17).

h) Inhibidores:

Los inhibidores más comunes son los sulfitos, metabisulfitos, bisulfitos y anhídrido sulfuroso, actúan retardando la aparición de productos coloreados, pero no evitan la pérdida del valor biológico de los aminoácidos. Su uso está limitado ya que produce efectos adversos a la salud (17).

2.2.3. CARMELIZACIÓN:

Es la reacción de pardeamiento de azúcares calentados a altas temperaturas (>80°C) en ausencia de proteínas y aminoácidos. Esta reacción puede ser benéfica o dañina para la calidad del alimento y puede ser prevenida evitando altas temperaturas durante el procesado y utilizando bajas temperaturas para el

almacenamiento. Se favorece en condiciones alcalinas o ácidas. Requiere mayor energía de activación y temperaturas más elevadas que la Reacción de Maillard, aunque, de manera similar, también se forma el intermedio 3-desoxglicosulosa. En la Figura 1.3 se observa que durante la caramelización, los azúcares reductores a través de la enolización- 1,2 sufren reacciones de deshidratación y ciclación para formar finalmente el HMF (18).

2.3. HIDROXIMETILFURFURAL COMO INDICADOR DE CALIDAD EN LA MIEL:

Si bien actualmente el HMF se usa como indicador de la calidad y frescura de la miel, ya que es un indicador del calentamiento o de un inadecuado almacenamiento, su contenido está en relación directa con el calor que ha sido sometida la miel y con su grado de envejecimiento. De igual modo, el contenido de HMF va aumentando espontáneamente con el transcurso del tiempo a temperatura ambiente, observándose una notable diferencia del incremento según procedan de zonas frías y cálidas (12).

Se utilizó por primera vez en 1908 como un indicador de la adulteración de la miel con jarabes invertidos (jarabes de glucosa y fructosa). El azúcar de caña (sacarosa) se "invierte" calentándolo con un ácido alimentario, y este proceso crea HMF. Sin embargo, se reparó rápidamente que la miel al ser sometida al calor también tenía niveles altos de HMF y, por lo tanto, pasó de ser un indicador de adulteración a ser un indicador de cambios de calentamiento y almacenamiento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los niveles altos de HMF (más de 100 mg/kg) aún pueden ser un indicador de adulteración con azúcares invertidos.

El contenido de HMF no es intrínseco de la miel por lo que su contenido normalmente está por debajo de 1 mg / kg. Es habitual que HMF esté por debajo de 10 mg / kg en miel fresca extraída (18).

En el estudio realizado por Khalil (23) el contenido de HMF de muestras frescas de miel de Malasia almacenadas por 3-6 meses (2.80-24.87 mg/kg) estuvo dentro de los valores recomendados (80 mg/kg para mieles tropicales), mientras que las muestras de mieles almacenadas por periodos más largos (12-24 meses) contuvo concentraciones de HMF mucho más altas (128.19-1131.76 mg/kg). Por lo tanto, se recomienda que la miel de abeja debería ser consumida dentro del año.

3. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE (UV-Vis):

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde I_0 a I , siendo I_0 la intensidad de la luz incidente y I la intensidad del rayo de luz transmitido, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (P_0) y dejará pasar el resto (P). La mayor parte de la absorción de los compuestos orgánicos resulta de la presencia de enlaces π (es decir, insaturados). Un cromóforo es un grupo molecular que, normalmente, contiene un enlace π . La espectroscopia UV-Vis utiliza la radiación del espectro electromagnético, cuya longitud de onda comprende los 100 y 800 nm.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-Visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto

desde un estado energético basal o fundamental, E1, a un estado de mayor energía (estado excitado), E2. Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental. El método espectrofotométrico se rige por la ley de Lambert-Beer.

3.1. LEY DE LAMBERT-BEER:

La Ley de Lambert establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente. La expresión matemática es:

$$T= I/I_0=e^{-kb} \quad (\text{Ec 1.1})$$

donde I_0 es la intensidad incidente, I es la intensidad transmitida, e es la base de los logaritmos naturales, k es una constante y b es el paso óptico (normalmente en centímetros).

La Ley de Beer es idéntica a la ley de Lambert, excepto porque está expresada en términos de concentración. La cantidad de luz absorbida es proporcional al número de moléculas absorbentes por las que pasa la luz.

Ambas leyes se combinan en una sola, generando la Ley de Lambert-Beer

$$T= I/I_0=e^{-kcb} \quad (\text{Ec 1.2})$$

donde c es la concentración de las especies absorbentes (normalmente expresada en g/L o mg/L). Esta ecuación puede transformarse en una expresión lineal tomando el logaritmo y, normalmente, se expresa de la siguiente forma:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \varepsilon \times b \times c \quad (\text{Ec 1.3})$$

donde ε es la absorción molar o coeficiente de extinción. El coeficiente de extinción (ε) es característico de una sustancia en condiciones definidas de longitud de onda, disolvente y temperatura.

3.2. PARTES BÁSICAS DE UN ESPECTROFOTÓMETRO:

El equipo se compone generalmente de:

- i. **Fuente de luz:** lámpara de tungsteno (rango visible, 900 a 340nm) encendido instantáneo, lámpara de arco de deuterio (rango UV, 340 a 200nm) necesita un calentamiento previo
- ii. **Soporte para la muestra**
- iii. **Dispositivos de dispersión:** prisma, o red de difracción estos dispositivos causan que diferentes longitudes de onda de luz sean dispersadas con ángulos distintos. Cuando se combinan con una rendija adecuada de salida, pueden utilizarse para seleccionar una longitud de onda. Un monocromador consta de una rendija de entrada, un dispositivo de dispersión y una rendija de salida que permite seleccionar la longitud de onda deseada. Idealmente, lo que sale es luz monocromática.
- iv. **Detector:** suele ser un fotodiodo, convierte una señal de luz en una señal eléctrica.

3.3. ESPECTROFOTÓMETRO CONVENCIONAL:

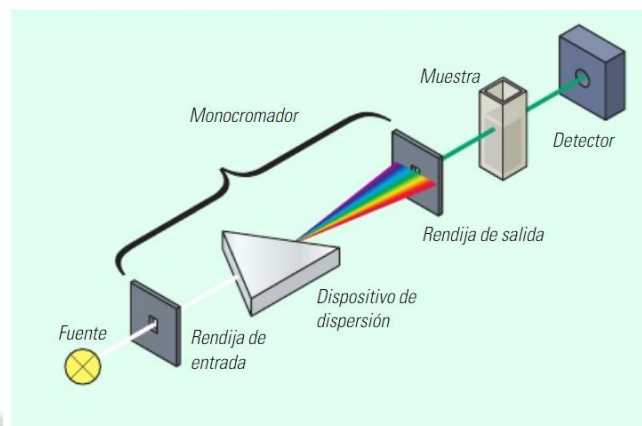


Figura 1. 4: Esquema de un espectrofotómetro convencional de haz simple (24).

Un espectrofotómetro convencional (Figura 1.3) enfoca la luz policromática de la fuente sobre la rendija de entrada de un monocromador, que transmite selectivamente la longitud de onda deseada, por lo que la luz “monocromática” atraviesa la muestra, y llega al detector. La absorbancia de la muestra se determina midiendo la intensidad de luz que alcanza el detector cuando no hay muestra (el blanco) y comparándola con la intensidad de la luz que alcanza el detector después de atravesar la muestra. Este diseño es el adecuado para medir la absorbancia en un solo punto del espectro. Es menos apropiado, sin embargo, para medir diferentes compuestos a diferentes longitudes de onda o para obtener espectros de muestras.

3.4. DISEÑO DE HAZ SIMPLE O DE DOBLE HAZ:

Un espectrofotómetro puede ser de haz simple o de doble haz. En un espectrofotómetro de haz simple, la radiación pasa a través de una sola solución a la vez, es decir, el blanco y la muestra se miden consecutivamente, con un intervalo de varios segundos para una medida a una longitud de onda. En este tipo de instrumentos se requiere de calibrar el aparato a cero de absorbancia con el blanco. Una vez ajustado se retira la celda con el blanco y se colocan las

muestras y estándares que sí contienen la especie absorbente y se efectúa la lectura correspondiente. Los instrumentos de un solo haz son particularmente adecuados para medidas cuantitativas de absorción a una única longitud de onda (medidas puntuales). Las cubetas que contienen la muestra y el blanco se sitúan alternativamente en la trayectoria del haz.

En un espectrofotómetro de doble haz (Figura 1.6), un haz de radiación pasa a través de la solución muestra y otro haz pasa a través de la solución blanco o de referencia. El detector alterna entre la medida del haz de muestra y la del haz de referencia. En esta configuración, se coloca un chopper en el paso óptico, cercano a la fuente. El chopper hace que la luz de referencia y la luz que atraviesa la muestra llegue intermitentemente al detector. Gira a una velocidad tal que las medidas alternas de blanco y muestra ocurren varias veces por segundo.

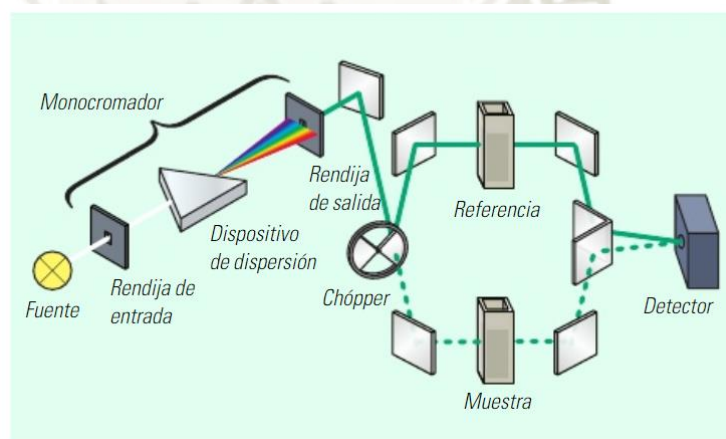


Figura 1.5: Sistema óptico de un espectrofotómetro de doble haz (24).

El detector compara estas dos señales continuamente o muchas veces en un segundo y efectúa la lectura relacionando la lectura de la muestra con la lectura del blanco. De esta manera se compensan las fluctuaciones que pudiesen existir por: ruido, variación de voltaje, variación en la intensidad de la fuente luminosa, así como el funcionamiento irregular de la fuente, detector y transductor.

Tradicionalmente, la mayor estabilidad de los instrumentos de doble haz, ha sido fundamental en el diseño de los espectrofotómetros de alto rendimiento.

Sin embargo, recientes avances en el diseño de lámparas y de la electrónica han mejorado la estabilidad de los espectrofotómetros de haz simple y han llevado a un resurgimiento de esta configuración. Los instrumentos de haz simple ofrecen mayor sensibilidad y más facilidad de uso (24).

4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN:

La cromatografía líquida de alta resolución es un método, usado principalmente para la separación de componentes de una muestra de acuerdo a su polaridad, en la cual los componentes de la muestra se distribuyen en dos fases: una fase estacionaria sólida la cual esta depositaba en la columna cromatográfica donde se produce la separación, esta generalmente compuesta por un sólido poroso, con un tamaño de partícula muy pequeño, y una fase móvil líquida la cual está compuesta por solventes o una mezcla de solventes con un alto grado de pureza, la fase móvil pasa a través de la columna a una velocidad constante transportando la muestra hacia la fase estacionaria, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en salir de la columna (eluir) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y sale antes de la columna (25).

4.1. COMPONENTES:

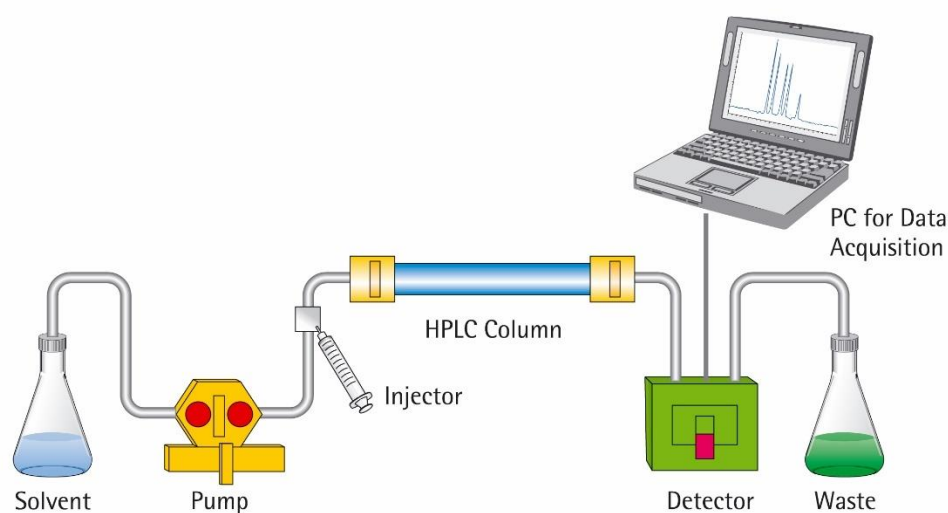


Figura 1.6: Componentes básicos del HPLC (26).

En la Figura 1.6, se muestra los componentes básicos del HPLC y posteriormente se detalla sus partes.

4.1.1. Reservorio de la fase móvil:

Alimenta al sistema con la fase móvil, puede emplearse como reservorio cualquier frasco de laboratorio de buena calidad (el vidrio suele ser el material más utilizado). El reservorio ha de taparse, para evitar la entrada de polvo. A través del tapón discurre el tubo (generalmente de teflón) que conduce la fase móvil al sistema de bombeo. Este tubo suele tener en su extremo un filtro de titanio de 10 μm de poro, que evita el paso hacia el equipo cromatográfico de partículas sólidas que pueda contener la fase móvil.

Se suelen incorporar 2-4 reservorios (con una capacidad típica de 1L cada uno) que permiten la preparación automatizada de mezclas de disolventes como fase móvil o la formación de los correspondientes gradientes. Suelen estar provistos de un sistema de desgasificación (que pueden generar efectos indeseados sobre la bomba, la columna o el detector) (25).

4.1.2. Sistema de bombeo:

Este dispositivo es capaz de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria para atravesar, al flujo seleccionado, la columna y el resto del sistema. Las principales características que debe reunir una bomba son: la obtención de flujos o caudales de 0,1 a 10 ml/min y la capacidad de trabajar a presiones de hasta 6.000 psi (400 bar) (25).

4.1.3. Inyector (manual o automático):

Permite incorporar la muestra a la fase móvil antes de la columna, sin interrumpir el caudal del solvente a través de sistema. Los inyectores de válvulas, conocidos como inyectores de bucle (loop), se utilizan prácticamente

en el 100% de los cromatógrafos, destacando por la precisión de la inyección y el mantenimiento de la presión de la bomba. Resisten presiones de hasta 7.000 psi. Los inyectores pueden ser manuales y automáticos. En los manuales, se puede cambiar fácilmente el bucle (loop), que es el que determina el volumen de muestra que entra en la columna. Los inyectores automáticos o automuestreadores trabajan de permitiendo variar el rango de volumen inyectado, presentan una mayor precisión que los manuales, optimizando el rendimiento del equipo HPLC (25).

4.1.4. Columna:

La columna es la parte más importante del sistema cromatográfico. La columna tiene que tener una longitud suficiente para separar los compuestos de interés, una columna más larga de lo necesario implica un mayor consumo de disolvente y de horas de trabajo. Las columnas más habituales tienen longitudes entre 10 y 30 cm. El diámetro, suele ser de 4-5 mm; este diámetro es un compromiso entre el consumo de disolvente, el tiempo de análisis y la resolución cromatográfica. Las primeras fases estacionarias estaban formadas por partículas de 35 a 70 μm , porosas, actualmente se están formados por partículas de 5 μm o menores. Una primera exigencia para la fase estacionaria es su estabilidad y resistencia a las altas presiones. La carcasa de las columnas suele ser de acero inoxidable, ya que se trata de un material inerte, resistente a las altas presiones y con el interior liso (25).

4.1.5. Detectores:

El detector permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra. Los detectores deben de reunir ciertas características, tales como (25):

- i. Tener un amplio rango de respuesta ya que un cambio de la concentración produce un cambio en la señal.
- ii. Poseer una respuesta lineal, el detector tiene que ser capaz de medir propiedades del analito que se incrementen linealmente al aumentar su concentración.
- iii. Responder a todos los solutos.
- iv. Tener sensibilidad apropiada
 - v. Los cambios de temperatura no deben de modificar la señal emitida por los detectores.
- vi. Poseer una buena relación señal/ruido: Estas perturbaciones que se producen en la línea base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica, o a fluctuaciones en el caudal.
- vii. No destruir la muestra, ésta propiedad es característica de casi todos los detectores de HPLC, a excepción del detector electroquímico.
- viii. Tener una constante de tiempo baja: la constante de tiempo de un detector indica la velocidad con que éste responde a un cambio instantáneo a la concentración del analito.

El detector UV-Visible posee buena sensibilidad, no es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo, además es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura. Es el detector de primera elección y el más empleado, debido a su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Cuando no es posible su empleo porque el analito carece de grupos cromóforos o porque su respuesta es baja, es posible usar otros detectores (25).

4.1.6. Sistema de toma y procesamiento de datos:

Un dispositivo de recolección y salida de datos está conectado a la salida electrónica del detector. El dispositivo de recogida de datos toma la señal

electrónica producida por el detector y emite un gráfico de respuesta en función del tiempo. Este cromatograma resultante puede evaluarse para información tanto cualitativa como cuantitativa (25).

4.2. CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA:

La cromatografía de fase reversa es la técnica de separación por cromatografía líquida más utilizada actualmente en los laboratorios. Se habla de fase reversa cuando la cadena funcional R tiene carácter apolar (hidrófobo). El grupo R suele ser una cadena C8 (n-octil) o C18 (n-octadecil). Dichas cadenas alifáticas se orientan paralelas unas a otras, perpendicularmente a la superficie de las partículas (a modo de peine). Es importante no utilizar eluyentes con valores de pH superiores a 7,5 para evitar la hidrólisis de los grupos siloxano. La polaridad de los grupos funcionales de los analitos es determinante en el orden de elución de los compuestos. El orden de elución en fase reversa es de más polar a menos polar. La fase móvil suele tener un marcado carácter polar, siendo habitual utilizar mezclas de agua con distintas concentraciones de metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano (25).

5. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO:

5.1. MÉTODO ANALÍTICO:

El método analítico se refiere al procedimiento que explica detalladamente todas las operaciones necesarias para efectuar un análisis concreto. Puede incluir a las preparaciones de la muestra, los estándares de referencia y los reactivos, uso de aparatos, generación de la curva de calibración, uso de la fórmula para los cálculos, etc.; pero no se limita sólo a ello.

5.2. VALIDACIÓN:

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (27).

En general, se establece que el laboratorio DEBE validar (27):

- i. Métodos no normalizados: Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- ii. Método normalizado con una modificación significativa: Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, tiene poco sentido encarar una validación como si fuera una metodología desconocida para estos casos se puede realizar una validación retrospectiva, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados como curvas de calibración, resultados de ensayos, entre otros. En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una validación prospectiva.

En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como *validación menor o verificación* cuando se trate de (27):

- i. Métodos normalizados.
- ii. Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.
- iii. Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.

- iv. Métodos previamente validados, que haya sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser; cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.

Tiene como objetivo el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo (27).

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado (27).

En relación a los parámetros de validación o verificación estos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. Para este fin la Tabla 1.5 puede ser utilizada como guía:

Tabla 1. 5: Parámetros analíticos de acuerdo al método cuantitativo

| PARÁMETROS ANALITICOS | MÉTODO CUANTITATIVO | | |
|---|---------------------|------------|-------|
| | NORMALIZADO | MODIFICADO | NUEVO |
| Linealidad | Sí | Sí | Sí |
| Sensibilidad | Sí o No | Sí | Sí |
| Límites de Detección y de Cuantificación | Sí o No | Sí | Sí |
| Precisión | Sí | Sí | Sí |

Fuente: Adaptado del Instituto de Salud Pública de Chile (27).

5.3. PARÁMETROS ANALÍTICOS:

5.3.1. LINEALIDAD:

Es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Con el fin de determinarlo se realiza un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como función respuesta (normalmente llamada recta de calibrado) (24).

5.3.2. SENSIBILIDAD:

Es la capacidad de un método analítico para detectar pequeñas concentraciones de analito. En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración. Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, visualiza cómo se comporta el instrumento (24).

5.3.3. LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN:

El límite de detección es la mínima cantidad de analito que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud. El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión (24).

5.3.4. PRECISIÓN:

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea en condiciones predeterminadas. Engloba los siguientes tipos de estudios (24):

- i. Repetibilidad:** Evalúa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (mismo analista, mismos aparatos y reactivos) en un mismo laboratorio y un periodo corto de tiempo
- ii. Precisión intermedia:** Evalúa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio
- iii. Reproducibilidad:** Evalúa la variabilidad del método entre laboratorios diferentes bajo condiciones operativas diferentes.

En la Tabla 1.6, se resumen los factores que pueden o no variar en los estudios de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

Tabla 1. 6: Variación de factores en el estudio de la precisión.

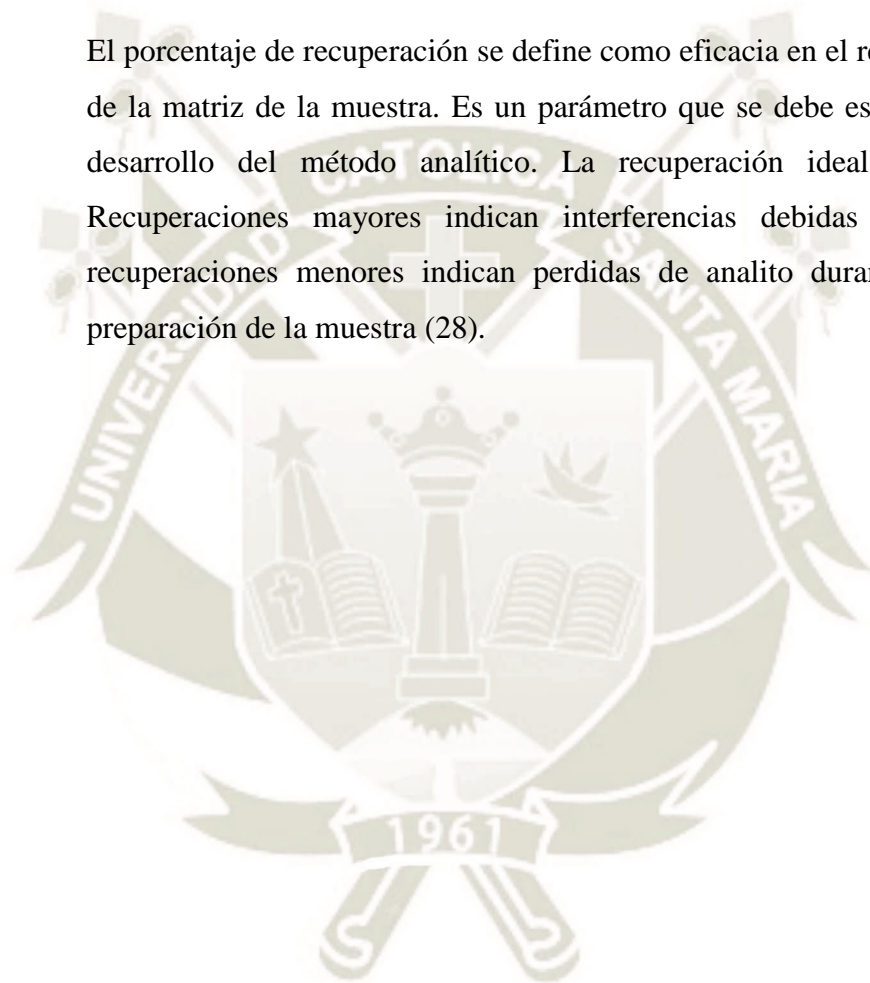
| Factores | Repetibilidad | Precisión intermedia | Reproducibilidad |
|---------------------------|---------------|----------------------|------------------|
| Instrumento | Igual | Diferente | Diferente |
| Día de análisis | Igual | Diferente | Diferente |
| Analista | Igual | Diferente | Diferente |
| Otros factores: | | | |
| • Columna cromatográfica | Igual | Diferente | Diferente |
| • Condiciones ambientales | | | |
| • Reactivos, etc. | | | |
| Laboratorio | Igual | Igual | Diferente |

Fuente: Validación de Métodos Analíticos, AEFI (28).

5.3.5. EXACTITUD:

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero (nominal, teórico, o de referencia) y el valor encontrado experimentalmente. Es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico o nominal.

El porcentaje de recuperación se define como eficacia en el rescate del analito de la matriz de la muestra. Es un parámetro que se debe estudiar durante el desarrollo del método analítico. La recuperación ideal es del 100%. Recuperaciones mayores indican interferencias debidas a la matriz y recuperaciones menores indican pérdidas de analito durante las fases de preparación de la muestra (28).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN:

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, en el pabellón H-204/205.

2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

2.1. EQUIPOS:

i. Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución:

| | |
|-----------|--------------------------------|
| Marca: | Merck Hitachi |
| Modelo: | LaChrom Elite |
| Detector: | UV-Visible |
| Columna: | LiChroCART RP-18 125mmx4mmx5µm |
| Software: | EZ Chrom Elite |

ii. Espectrofotómetro UV Visible:

| | |
|---------|----------|
| Marca: | Shimadzu |
| Modelo: | UV-1700 |

iii. Balanza analítica:

| | |
|---------------|-----------|
| Marca: | OHAUS |
| Modelo: | Discovery |
| Sensibilidad: | 0.1 mg |

iv. Purificador de agua:

Marca: ELGA LabWater
Modelo: PURELAB Classic
Resistividad a 25 °C: 18,2 MΩ•cm

v. Agitador tipo vórtex:

Marca: Thermo SCIENTIFIC
Modelo: Maxi Mix II

vi. Bomba de aspiración:

Marca: Lab Companion
Modelo: VE-11

2.2. REACTIVOS:

- Estándar de Hidroximetilfurfural $\geq 98\%$ (Merck)
- Metanol grado HPLC (Merck)
- Agua calidad ultra pura
- Solución de Carrez I: Ferrocianuro de Potasio
- Solución de Carrez II: Acetato de Zinc
- Bisulfito de sodio

2.3. MATERIALES:

- Fiolas de 5, 10, 50, 100 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 mL.
- Probetas de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 25, 50 y 100 mL.

- Baguetas.
- Espátulas.
- Embudo
- Celdas de cuarzo (Purshee)
- Sistema de filtración al vacío
- Papel filtro
- Tubos de ensayo 18x150mm
- Gradilla
- Frascos de vidrio de 1L

2.4. OTROS MATERIALES:

- Jeringas descartables de 10 mL.
- Filtro de membrana de nylon 0.45 μm (Whatman)
- Filtros de jeringa ANOTOP 0.22 μm (RephiQuik)

3. MÉTODOS:

3.1. MUESTRAS DE ESTUDIO:

Se seleccionó seis mieles al azar de diferentes marcas provenientes de denominadas tiendas orgánicas, mercados y supermercados de la ciudad de Arequipa en el mes de junio, a cada muestra se le asignó un código (A, B, C, D, E, F) con el objetivo de diferenciarlas. La muestra A y E provienen de supermercados, las muestras C y D de denominadas tiendas orgánicas y las muestras B y F de mercados. Se tuvo en cuenta el origen botánico de la miel (mieles poliflorales).

3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC):

3.2.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

- **Equipo:** Cromatógrafo líquido de alta resolución
- **Columna:** LiChroCART RP-18 125mmx4mmx5µm
- **Sistema:** Isocrático
- **Fase móvil:** Agua ultrapura:Metanol (90:10)
- **Detector:** UV-Visible, 284 nm
- **Velocidad de flujo:** 1mL/minuto
- **Volumen de inyección:** 20 µL
- **Tiempo de retención:** 3.4 minutos
- **Tiempo de corrida:** 10 minutos

3.2.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DEL ESTÁNDAR DE HMF:

Se pesó 2.19 mg del estándar de HMF y se enrasó con agua ultra pura en una fiola de 10 mL (219 ppm), luego se transfirió 2.28mL de esta solución a una fiola de 5mL y se enrasó con agua ultra pura para obtener una concentración stock de 100 ppm (concentración real de 99.86 ppm).

3.2.3. PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL:

Se filtró al vacío 1L de metanol grado HPLC y se utilizó el Purificador de agua para obtener 1L de agua ultra pura.

3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO (HPLC):

3.3.1. LINEALIDAD:

Preparación de la gráfica de calibración:

A partir de la solución stock de 99.86 mg/L filtrada por filtro anotop 0.22 μm , haciendo uso del inyector automático del HPLC se inyectó 18 μL , 16 μL , 10 μL , 8 μL , 6 μL y 4 μL para así obtener concentraciones de 89.88 ppm, 79.89 ppm, 49.93 ppm, 39.95 ppm, 29.96 ppm, y 19.97 ppm (Tabla 2.1). Este procedimiento se realizó por triplicado para evaluar los estimadores de regresión (coeficiente de regresión lineal, pendiente e intercepto de las curvas de calibración).

Tabla 2. 1: Concentraciones de HMF para la Gráfica de Calibración por el Método de HPLC.

| Volumen inyectado por HPLC | Concentración real |
|-------------------------------|--------------------|
| 20 μL | 99.86 ppm |
| 18 μL | 89.88 ppm |
| 16 μL | 79.89 ppm |
| 10 μL | 49.93 ppm |
| 8 μL | 39.95 ppm |
| 6 μL | 29.96 ppm |
| 4 μL | 19.97 ppm |

Fuente: Elaboración propia.

La linealidad es la relación entre la concentración de un analito y su respuesta. El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica, sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Luego de realizar la gráfica de calibración, se establece la ecuación de la recta:

$$Y = bx \pm a \quad (\text{Ec 2.1})$$

Siendo (a) el intercepto, (b) la pendiente, (x) la concentración del analito en mg/L, (y) la señal del método analítico y (n) el número de mediciones.

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (\text{Ec 2.2})$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad (\text{Ec 2.3})$$

La pendiente (b) se encuentra relacionada con la sensibilidad del método por lo cual es un parámetro indicativo de la sensibilidad del método, de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El intercepto (a), término independiente, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo, por lo que se determina para evaluar que la recta pase por el origen y que cualquier desviación se adjudique únicamente a un error aleatorio.

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si (r) es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Si $r=0$ indica ausencia de relación lineal entre las variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 .

3.3.2. SENSIBILIDAD:

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. La sensibilidad de calibración corresponde a la pendiente de la curva de calibración. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son:

- i. **Límites de detección:** Según la USP XXII, es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.)
- ii. **Límites de cuantificación:** Según la misma referencia anterior, es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. También se expresa en unidades de concentración.

Se pueden estimar estos parámetros a partir de la gráfica de calibración, para ello se realizaron las siguientes determinaciones:

- i. Determinación de la pendiente (b) y la ordenada (a) de la gráfica de calibración (concentración vs respuesta). El valor de Y_{bl} es igual a la ordenada (a).
- ii. Determinación de la desviación estándar correspondiente a cada concentración, para así obtener una segunda gráfica de calibración (concentración vs desviación estándar). El valor de S_{bl} es igual a la ordenada obtenida en esta gráfica.

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n medidas individuales.

$$\text{Límite de detección (LD)} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec 2.4})$$

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec 2.5})$$

3.3.3. PRECISIÓN:

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea en condiciones predeterminadas.

i. Repetibilidad del sistema instrumental:

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma concentración o muestra de forma consecutiva en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La estimación de la repetibilidad instrumental, se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Ec 2.6})$$

Donde:

s=desviación estándar

\bar{x} = media aritmética de los resultados

Para la determinación de este parámetro se inyectó en el HPLC 5 veces el punto medio de la gráfica de calibración (49.93 ppm).

ii. Repetibilidad del método:

Este ensayo se efectúa sobre una serie de concentraciones que se analiza de manera independiente por el mismo instrumento y el mismo analista. Para lo cual se debe de analizar un mínimo de 3 concentraciones por triplicado. Para

este ensayo se toman los datos obtenidos de la gráfica de calibración. De igual manera, este parámetro se expresa matemáticamente por el CV%.

3.3.4. EXACTITUD:

La exactitud es el parámetro que mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. La exactitud se expresa mediante el porcentaje de recuperación dada por la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida.

Este parámetro se expresa mediante el porcentaje de recuperación el cual se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Recuperación (\%R)} = \frac{[M.E] - [M]}{[St]} \times 100 \quad (\text{Ec 2.7})$$

Donde:

M.E: Concentración muestra enriquecida

M: Concentración de la muestra

St : Concentración del estándar

Para el desarrollo de este parámetro, se utilizó el método de porcentaje de recuperación, para lo cual se elaboraron 3 soluciones, las cuales fueron:

i. Preparación de la solución estándar:

Se preparó una solución estándar de HMF a una concentración aproximada de 5 ppm. Se filtró e inyectó al HPLC.

ii. Preparación de la solución muestra:

Se pesó aproximadamente 5g de la muestra de miel en un vaso de precipitado de 50mL. Se disolvió la muestra en aproximadamente 25mL de agua ultrapura y se transfirió a una fiola de 50mL. Se añadió 0.5 mL de la solución de Carrez I y se mezcló, luego se añadió 0.5mL de la solución de Carrez II y se mezcló, finalmente se enrasó con agua ultra pura. Se realizó una dilución 1:10, se filtró e inyectó al HPLC.

iii. Preparación de la solución muestra enriquecida:

En una fiola de 50mL se añadió 5mL de la solución muestra y 1 mL de la solución estándar y se enrasó con agua ultra pura. Se filtró e inyectó al HPLC.

3.3.5. CUANTIFICACIÓN DE HMF POR HPLC:

El contenido de HMF en las 6 muestras fue medida por el método de HPLC propuesto por la Comisión Internacional de la Miel (IHC).

Se homogenizó la muestra de miel, mezclando a profundidad por al menos 3 minutos. Se pesó aproximadamente 5g de la muestra de miel en un vaso de precipitado de 50mL. Se disolvió la muestra en aproximadamente 25mL de agua ultrapura y se transfirió a una fiola de 50mL. Se añadió 0.5 mL de la solución de Carrez I y se mezcló, luego se añadió 0.5mL de la solución de Carrez II y se mezcló, finalmente se enrasó la fiola a 50mL con agua ultrapura. Se filtraron por filtro Anotop 0.22 μm y se procedió a inyectar por HPLC por duplicado.

3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO (ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE):

3.4.1. LINEALIDAD:

Preparación de la gráfica de calibración:

Para llevar a cabo la determinación de este parámetro se pesó 6.12 mg del estándar de HMF y se disolvió en 25mL de agua ultra pura, obteniendo una solución stock de 244.8 ppm. A partir de esta solución stock se tomaron alícuotas de 0.5 mL, 2mL, 3.5 mL, 5mL, 3.25 mL y 4 mL para obtener concentraciones de 12.24 ppm, 48.96 ppm, 85.68 ppm, 122.4 ppm, 159.12 ppm y 195.84 ppm (Tabla 2.2). Luego de preparar cada uno de los patrones, estos fueron tratados por el método 980.23 de la AOAC. Este procedimiento se realizó por triplicado para evaluar los estimadores de regresión (coeficiente de regresión lineal, pendiente e intercepto de las curvas de calibración).

Tabla 2. 2: Concentraciones de HMF para la Gráfica de Calibración por el Método de Espectrofotometría UV-Vis.

| Volumen tomado | Volumen final | Concentración |
|----------------|---------------|---------------|
| 0.50 mL | 10 mL | 12.24 ppm |
| 2.00 mL | 10 mL | 48.96 ppm |
| 3.50 mL | 10 mL | 85.68 ppm |
| 5.00 mL | 10 mL | 122.4 ppm |
| 3.25 mL | 5 mL | 159.12 ppm |
| 4.00 mL | 5 mL | 195.84 ppm |

Fuente: Elaboración propia.

La linealidad es la relación entre la concentración de un analito y su respuesta. El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica, sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Luego de realizar la gráfica de calibración, se establece la ecuación de la recta:

$$Y = bx \pm a \quad (\text{Ec 2.8})$$

Siendo (a) el intercepto, (b) la pendiente, (x) la concentración del analito en mg/L, (y) la señal del método analítico y (n) el número de mediciones.

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (\text{Ec 2.9})$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad (\text{Ec 2.10})$$

La pendiente (b) se encuentra relacionada con la sensibilidad del método por lo cual es un parámetro indicativo de la sensibilidad del método, de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). El intercepto (a), término independiente, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo, por lo que se determina para evaluar que la recta pase por el origen y que cualquier desviación se adjudique únicamente a un error aleatorio.

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si (r) es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Si r=0 indica ausencia de relación lineal entre las variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es $\geq 0,999$.

3.4.2. SENSIBILIDAD:

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. La sensibilidad de

calibración corresponde a la pendiente de la curva de calibración. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son:

- i. **Límites de detección:** Según la USP XXII, es la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.)
- ii. **Límites de cuantificación:** Según la misma referencia anterior, es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas. También se expresa en unidades de concentración.

Se pueden estimar estos parámetros a partir de la gráfica de calibración, para ello se realizaron las siguientes determinaciones:

- i. Determinación de la pendiente (b) y la ordenada (a) de la gráfica de calibración (concentración vs respuesta). El valor de Y_{bl} es igual a la ordenada (a).
- ii. Determinación de la desviación estándar correspondiente a cada concentración, para así obtener una segunda gráfica de calibración (concentración vs desviación estándar). El valor de S_{bl} es igual a la ordenada obtenida en esta gráfica.

Se calcula el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n medidas individuales.

$$\text{Límite de detección (LD)} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec 2.11})$$

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec 2.12})$$

3.4.3. PRECISIÓN:

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea en condiciones predeterminadas.

i. Repetibilidad del sistema instrumental:

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma concentración o muestra de forma consecutiva en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La estimación de la repetibilidad instrumental, se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Ec 2.13})$$

Donde:

s=desviación estándar

\bar{x} = media aritmética de los resultados

Para la determinación de este parámetro se inyectó en el HPLC 5 veces el punto medio de la gráfica de calibración (85.68 ppm).

ii. Repetibilidad del método:

Este ensayo se efectúa sobre una serie de concentraciones que se analiza de manera independiente por el mismo instrumento y el mismo analista. Para lo cual se debe de analizar un mínimo de 3 concentraciones por triplicado. Para este ensayo se toman los datos obtenidos de la gráfica de calibración. De igual manera, este parámetro se expresa matemáticamente por el CV%.

3.4.4. EXACTITUD:

La exactitud es el parámetro que mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. La exactitud se expresa mediante el porcentaje de recuperación dada por la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida.

Este parámetro se expresa mediante el porcentaje de recuperación el cual se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Recuperación (\%R)} = \frac{[M.E] - [M]}{[St]} \times 100 \quad (\text{Ec 2.14})$$

Donde:

M.E: Concentración muestra enriquecida

M: Concentración de la muestra

St : Concentración del estándar

Para el desarrollo de este parámetro, se utilizó el método de porcentaje de recuperación, para lo cual se elaboraron 3 soluciones, las cuales fueron:

i. Preparación de la solución estándar:

Se preparó una solución estándar de HMF a una concentración aproximada de 5ppm. Se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis.

ii. Preparación de la solución muestra:

Se pesó aproximadamente 5g de la muestra de miel en un vaso de precipitado de 50mL. Se disolvió la muestra en aproximadamente 25mL de agua ultrapura y se transfirió a una fiola de 50mL. Se añadió 0.5 mL de la solución de Carrez I y se mezcló, luego se añadió 0.5mL de la solución de Carrez II y se mezcló, finalmente se enrasó con agua ultra pura. Se realizó una dilución 1:10, se filtró, y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis.

iii. Preparación de la solución muestra enriquecida:

En una fiola de 50mL se añadió 5mL de la solución muestra y 1 mL de la solución estándar y se enrasó con agua ultra pura. Se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE HMF POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISIBLE:

El contenido de HMF en las 6 muestras fue medida por el método espectrofotométrico de White propuesto por la Comisión Internacional de la Miel (IHC).

Se homogenizó la muestra de miel, mezclando a profundidad por al menos 3 minutos, se pesó aproximadamente 5g de la muestra de miel en un vaso de precipitado de 50mL. Se disolvió la muestra en aproximadamente 25mL de agua ultrapura y se transfirió a una fiola de 50mL. Se añadió 0.5 mL de la solución de Carrez I y se mezcló, luego se añadió 0.5mL de la solución de Carrez II y se mezcló, finalmente se enrasó con agua ultrapura. Se filtró a través de papel filtro, rechazando los primeros 10mL del filtrado. Se pipeteó 10mL del filtrado y se transfirió 5mL a cada tubo de ensayo. Se añadió 5mL de agua ultra pura al primer tubo (solución de muestra) y 5mL de la solución de bisulfito de sodio al 0.1% al segundo tubo y se mezcló bien (solución de referencia)

Se determinó la absorbancia de la solución muestra y de la solución de referencia a 284 y 336nm en celdas de cuarzo de 1cm. Cuando la absorbancia a 284nm excedió un valor de 0.6 se procedió a realizar una dilución.

Para el cálculo y expresión de resultados, se utilizó la siguiente formula:

$$HMF \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{A_{284} - A_{336} \times F \times D \times \text{Peso teórico}}{\text{Peso real}} \quad (Ec 2.8)$$

$$\text{Factor } 14.97 = \frac{126 \text{ g/mol}}{16830 \text{ L/mol}} \times \frac{1L}{1000 \text{ mL}} \times \frac{10 \text{ mL}}{5\text{mL}} \times \frac{1000g}{1kg} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1g} \quad (Ec 2.9)$$

Donde:

A_{284} = Absorbancia a 284 nm

A_{336} = Absorbancia a 336 nm

14.97 = Factor

126 = Peso molecular del HMF

16830 = Absortividad molar de HMF a una $\lambda=284\text{nm}$

D = Factor de dilución (mL/g)

1000 = Conversión de g a mg

10/5 = Volumen total a analizar (10mL) entre volumen de muestra (5mL)

1/1000 = conversión de L a mL

1000 = conversión de g a mg

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC):

1.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO:

1.1.1. LINEALIDAD:

La linealidad es la relación entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta.

Para su desarrollo fue necesario elaborar una gráfica de calibración con el estándar de HMF, para lo cual se prepararon 7 soluciones con las siguientes concentraciones: 12.24 ppm, 48.96 ppm 85.68 ppm, 122.4 ppm, 159.12ppm y 195.84ppm las cuales fueron procesadas por HPLC por triplicado. En la Tabla 3.1 figuran las áreas cromatográficas de acuerdo a cada concentración evaluada, así como los promedios de las áreas cromatográficas.

Tabla 3. 1: Datos para la determinación de la linealidad del método.

| Concentración (ppm) | ÁREA I (mUA) | ÁREA II (mUA) | ÁREA III (mUA) | PROMEDIO DE ÁREAS |
|---------------------|--------------|---------------|----------------|-------------------|
| 19.97 | 9964515 | 9970665 | 9941622 | 9958934 |
| 29.96 | 14811372 | 14835732 | 14896399 | 14847834.3 |
| 39.95 | 19698726 | 19764065 | 19711953 | 19724914.7 |
| 49.93 | 24738606 | 24742364 | 24714526 | 24731832 |
| 79.89 | 39042656 | 39008248 | 39078703 | 39043202.3 |
| 89.88 | 43843791 | 43850136 | 43601943 | 43765290 |
| 99.86 | 48472765 | 48800062 | 48333225 | 48535350.7 |

Fuente: Elaboración propia (Excel)

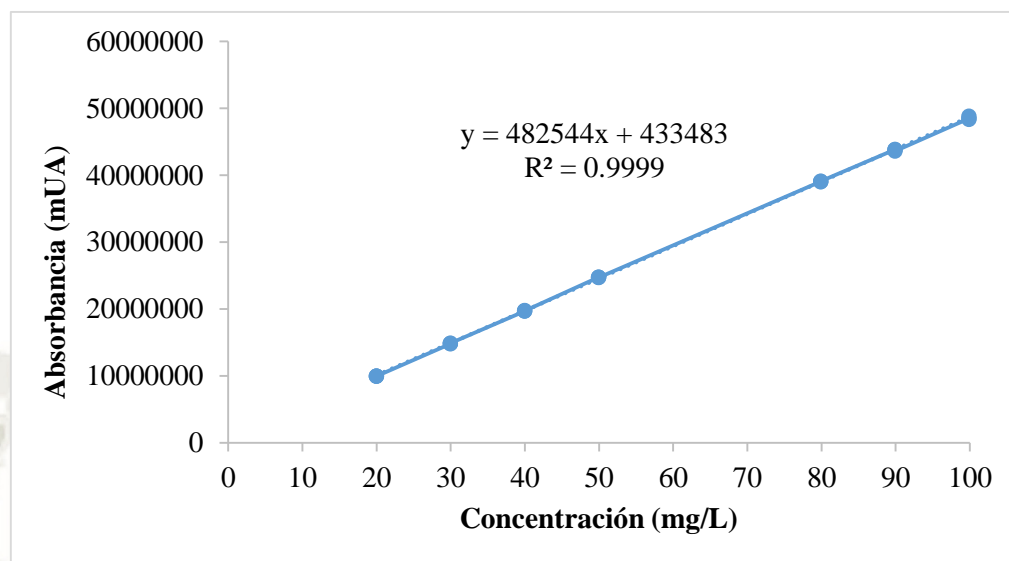


Figura 3.1: Gráfico de calibración correspondiente al HMF por HPLC

En la Figura 3.1 se observa el gráfico de calibración correspondiente a los datos de la Tabla 3.1, permitiéndonos obtener los valores de a,b y r^2 , donde:

| | |
|-------|--------|
| a | 433483 |
| b | 482544 |
| r^2 | 0.9999 |

El valor de $r^2=0.9999$, indica que existe un alto grado de correlación ya que este valor es cercano a la unidad.

Khalil (23), en su investigación utilizando el mismo método, obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9997. Mientras que, Truzzi (29) obtuvo un $r^2=0.9999$. Kukurová (30) realizó algunas modificaciones, utilizando una fase móvil compuesta por 90% de agua ultra pura y 10% de acetonitrilo, y un detector UV a una longitud de onda de 280 nm, obteniendo un $r^2=0.9993$.

Murillo (31), desarrollo un método utilizando un detector UV a 285nm en serie con detector de índice de refracción, una fase móvil compuesta por 5mM de

ácido sulfúrico en modo isocrático con un flujo de 0.6 mL/min, obteniendo un $r^2=0.9956$.

Martysiak- Żurowska (32), desarrollo un método en el cuál disolvió 1 g de miel en 10mL de agua destilada acidificada (25mL de 0.35 mol/L de solución de HCL en 1 L de agua destilada), la cual fue filtrada y procesada por HPLC, así como una fase móvil compuesta de 85mL de agua y 15mL de acetonitrilo, obteniendo así un $r^2=0.9971$

Spano (4) propuso un método alternativo, debido a que al determinar HMF en la miel del árbol de fresa encontró un pico interferente en el cromatograma el cual determino que se trataba del ácido homogentísico (marcador de origen botánico de la miel del árbol de fresa), para eliminar esta interferencia desarrollo un método con una elución en gradiente utilizando : ácido sulfúrico 0.01M en agua-metanol (90:10) por 2 minutos y ácido sulfúrico 0.01M en agua-metanol (70:30) por 5 minutos, obteniendo un $r^2=0.999$.

En el presente trabajo, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.99994, obteniéndose mejores resultados de linealidad de los autores anteriores, los cuales también concluyeron que existe una correlación lineal entre el analito y su respuesta.

1.1.2. SENSIBILIDAD:

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son límites de detección y límites de cuantificación.

En la Tabla 3.2 se puede observar las áreas cromatográficas de acuerdo a cada concentración evaluada, así como los promedios de las áreas cromatográficas y la desviación estándar.

Tabla 3. 2: Áreas cromatográficas y su desviación estándar para la determinación del parámetro sensibilidad.

| Concentración (ppm) | ÁREA I (mUA) | ÁREA II (mUA) | ÁREA III (mUA) | S |
|---------------------|--------------|---------------|----------------|------------|
| 19.97 | 9964515 | 9970665 | 9941622 | 15304.7258 |
| 29.96 | 14811372 | 14835732 | 14896399 | 43786.3853 |
| 39.95 | 19698726 | 19764065 | 19711953 | 34544.1722 |
| 49.93 | 24738606 | 24742364 | 24714526 | 15104.7631 |
| 79.89 | 39042656 | 39008248 | 39078703 | 35230.6772 |
| 89.88 | 43843791 | 43850136 | 43601943 | 141498.221 |
| 99.86 | 48472765 | 48800062 | 48333225 | 239628.714 |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

Con los datos de la Tabla 3.1, se realizó el gráfico de la concentración vs el promedio de áreas (Figura 3.1), y con los datos de la Tabla 3.2 se realizó el gráfico de concentración vs desviación estándar (Figura 3.3) correspondientes al HMF, para poder hallar los límites de detección y cuantificación.

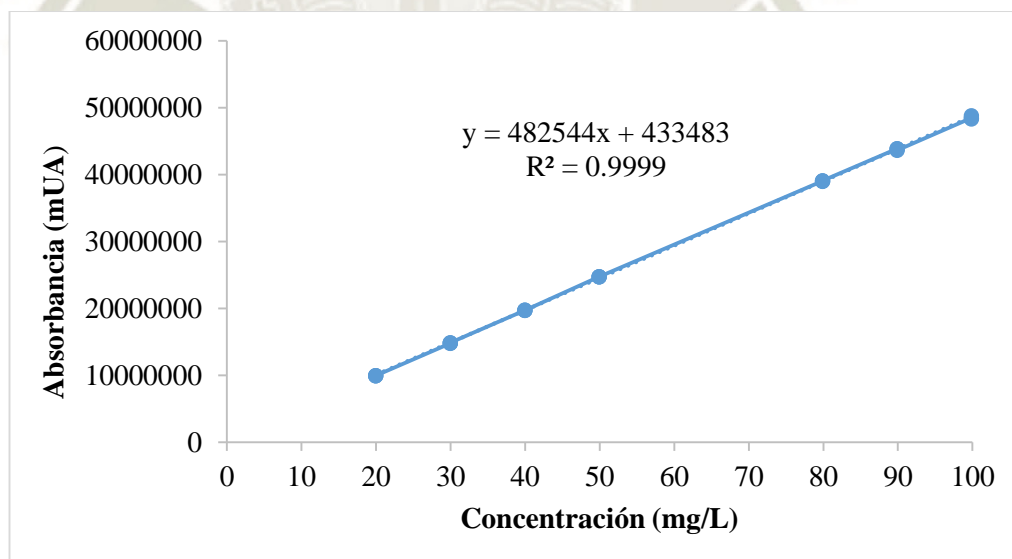


Figura 3.2: Gráfico de concentración vs absorbancia

El valor de Y_{bl} para este caso es igual a la ordenada del origen obtenida en la gráfica concentración vs área

$$y = 482544x + 433483$$

$$Y_{bl} = 433483$$

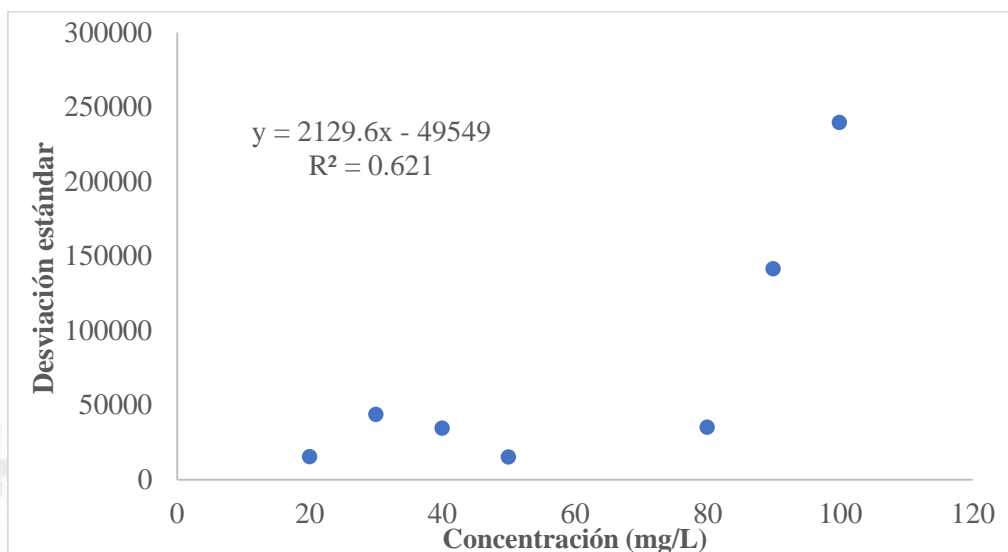


Figura 3.3: Gráfico de concentración vs desviación estándar

El valor de S_{bl} para este caso es igual a la ordenada del origen obtenida en la gráfica concentración vs desviación estándar.

$$y = 2129.6x - 49549$$

$$S_{bl} = 49549$$

Luego, usando la ecuación de la gráfica de calibración para HMF.

$$y = 482544x + 433483$$

Tomamos la pendiente ($b = 482544$), para calcular el límite de detección (LD) (ecuación 2.4) y de cuantificación (LC) (ecuación 2.5). Determinándose así el valor de LD de 0.46 mg/L y el LC de 0.73 mg/L.

En la investigación realizada por Truzzi (29), se obtuvo un LD de 0.09 y un LC de 0.27 mg/L, en el método desarrollado por Spano (4) se obtuvo un LD de 0.2 mg/L y un LC de 0.4 mg/L, Martysiak- Żurowska (32) en su investigación obtuvo un LD de 3.36 mg/L y un LC de 10.08 mg/L.

1.1.3. PRECISIÓN:

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea en condiciones predeterminadas.

La repetibilidad del sistema instrumental estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma concentración o muestra de forma consecutiva en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La estimación de la repetibilidad instrumental, se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación porcentual (CV%) de una serie de medidas.

Se analizó por HPLC 5 veces una misma concentración de 49.93 mg/L, las áreas obtenidas se muestran en la Tabla 3.3, donde se observa un CV% de 0.31% estando los resultados dentro de lo estipulado por la USP, la cual indica en general un CV% del sistema no mayor del 2%, inyectando 5 veces una solución estándar, pudiéndose obtenerse valores inferiores al 1% e incluso menores.

Tabla 3. 3: Áreas cromatográficas correspondientes de HMF a una concentración de 49.93 mg/L.

| Repetición | Área |
|-----------------|------------|
| 1 | 24837509 |
| 2 | 24766198 |
| 3 | 24715867 |
| 4 | 24659308 |
| 5 | 24655511 |
| Promedio | 24726878.6 |
| S | 76755.2543 |
| CV% | 0.31% |

Fuente: Elaboración propia.

Kmecl (33), en su investigación utilizó como fase móvil una solución de hidrogenofosfato de sodio (pH=3) y metanol (950:50), y un detector UV-Vis a 284nm, obteniendo un coeficiente de variación de 0.5%.

Para la determinación de la repetibilidad del método, se utilizaron los CV% de las concentraciones utilizadas para hallar la linealidad.

En la Tabla 3.4 se muestran los coeficientes de variación para cada concentración del parámetro de linealidad.

Tabla 3.4: Datos obtenidos para determinar el coeficiente de variación porcentual

| Conc. (ppm) | ÁREA I (mUA) | ÁREA II (mUA) | ÁREA III (mUA) | Promedio | S | CV% |
|-------------|--------------|---------------|----------------|------------|------------|-------|
| 19.97 | 9964515 | 9970665 | 9941622 | 9958934 | 15304.7258 | 0.15% |
| 29.96 | 14811372 | 14835732 | 14896399 | 14847834.3 | 43786.3853 | 0.29% |
| 39.95 | 19698726 | 19764065 | 19711953 | 19724914.7 | 34544.1722 | 0.18% |
| 49.93 | 24738606 | 24742364 | 24714526 | 24731832 | 15104.7631 | 0.06% |
| 79.89 | 39042656 | 39008248 | 39078703 | 39043202.3 | 35230.6772 | 0.09% |
| 89.88 | 43843791 | 43850136 | 43601943 | 43765290 | 141498.221 | 0.32% |
| 99.86 | 48472765 | 48800062 | 48333225 | 48535350.7 | 239628.714 | 0.49% |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

Para definir si el método era repetible o no, se consideró los límites establecidos por la AOAC. Como la concentración máxima considerada para la realización de la gráfica de calibración fue de 99.86 ppm de HMF, se consideró entonces un de CV% aceptable de no mayor al 5.3% (el cual corresponde a una concentración de 100 ppm) como se puede observar en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Precisión esperada (repetibilidad) en función a la concentración del analito.

| Unidad | | CV (%) |
|--------|-----|--------|
| 100 | % | 1.3 |
| 10 | % | 1.9 |
| 1 | % | 2.7 |
| 0.1 | % | 3.7 |
| 100 | ppm | 5.3 |
| 10 | ppm | 7.3 |
| 1 | ppm | 11 |
| 100 | ppb | 15 |
| 10 | ppb | 21 |
| 1 | ppb | 30 |

Fuente: AOAC internacional (34).

Por lo observado en la Tabla 3.4, los valores de coeficiente de variación obtenidos (con un valor mínimo de 0.06% y máximo de 0.49%. no sobrepasan el valor límite mencionado de 5.3%, lo cual permite concluir que el método aplicado posee repetibilidad.

1.1.4. EXACTITUD:

La exactitud es el parámetro que mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. Se expresa como porcentaje de recuperación

Para el desarrollo de este parámetro, se prepararon 6 fiolas: una fiola con estándar de HMF a una concentración aproximada de 5 ppm, 2 fiolas con muestra y 2 fiolas con muestra más estándar. Esta operación se realizó por duplicado.

Tabla 3. 6: Porcentaje de recuperación del HMF.

| | Muestra (área) | Estándar (área) | Muestra+Estándar (área) |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Repetición 1 | 7667027 | 2075269 | 9563009 |
| Repetición 2 | 7654931 | 2080083 | 9534910 |
| Promedio | 7660979 | 2077676 | 9548959.5 |
| % de Recuperación | | | 90.87% |

Fuente: Elaboración propia

La recuperación fue de 90.87%, ubicándose dentro del rango esperado según la concentración del analito (80-110%) expresado en la Tabla 3.7, por lo que se considera que el método es exacto.

Tabla 3. 7: Porcentaje de recuperación esperado en función a la concentración del analito.

| Unidades | % de Recuperación |
|-----------------|--------------------------|
| 100% | 98-102 |
| 10% | 97-103 |
| 1% | 95-105 |
| 0.10% | 90-107 |
| 100 ppm | 80-110 |
| 10 ppm | 60-115 |
| 1 ppm | 40-120 |
| 100 ppb | 80-110 |
| 10 ppb | 60-115 |
| 1 ppb | 40-120 |

Fuente: AOAC internacional (34).

1.2. CUANTIFICACIÓN DE HMF EN MIEL POR HPLC:

Los resultados de la concentración de HMF en mg/kg de las diferentes mieles son detallados en la tabla que se presenta a continuación, el cálculo de las concentraciones fue realizado tomando como relación la concentración de estándar conocida y el área del pico de cada muestra, así como la dilución realizada para cada muestra. En la Tabla 3.8 se muestra los resultados del contenido de HMF en mg/kg de las 6 marcas analizadas (n=3) e inyectadas por duplicado.

Tabla 3. 8: Contenido de HMF (mg/kg) por el Método de HPLC.

| Muestras | Tiempo de retención | Área | HMF (mg/kg) | Promedio HMF(mg/kg) | S |
|----------|---------------------|----------|-------------|---------------------|--------|
| A1 | 3.49 | 496746 | | | |
| A1 | 3.53 | 514727 | | | |
| A2 | 3.52 | 448850 | nd | nd | - |
| A2 | 3.53 | 447627 | | | |
| A3 | 3.53 | 489078 | | | |
| A3 | 3.53 | 494427 | | | |
| B1 | 3.53 | 27459016 | 1357.0640 | | |
| B1 | 3.51 | 27116005 | 1339.7890 | | |
| B2 | 3.5 | 29580788 | 1375.6620 | 1365.634 | 16.391 |
| B2 | 3.49 | 29710185 | 1381.7860 | | |
| B3 | 3.5 | 29249104 | 1379.9170 | | |
| B3 | 3.49 | 28825769 | 1359.5870 | | |
| C1 | 3.49 | 30639975 | 598.9840 | | |
| C1 | 3.47 | 30612075 | 598.4290 | | |
| C2 | 3.45 | 30999898 | 589.9680 | 585.418 | 14.429 |
| C2 | 3.44 | 31010989 | 590.1830 | | |
| C3 | 3.44 | 29269382 | 567.7420 | | |
| C3 | 3.42 | 29241952 | 567.2010 | | |
| D1 | 3.42 | 18375029 | 854.6120 | | |
| D2 | 3.43 | 18538615 | 862.4390 | | |
| D3 | 3.41 | 18418783 | 873.5710 | 867.472 | 7.411 |
| D4 | 3.4 | 18365840 | 870.9880 | | |
| D5 | 3.38 | 17384399 | 871.8160 | | |
| D6 | 3.37 | 17376494 | 871.4070 | | |
| E1 | 3.37 | 339987 | | | |
| E1 | 3.35 | 333337 | | | |
| E2 | 3.35 | 448478 | nd | nd | - |
| E2 | 3.34 | 452494 | | | |
| E3 | 3.34 | 327092 | | | |
| E3 | 3.32 | 314222 | | | |
| F1 | 3.32 | 40785052 | 838.1820 | | |
| F1 | 3.3 | 40823349 | 838.9790 | | |
| F2 | 3.29 | 42149788 | 859.9750 | 853.259 | 18.08 |
| F2 | 3.28 | 43431753 | 886.4540 | | |
| F3 | 3.27 | 41902959 | 848.4870 | | |
| F3 | 3.26 | 41853638 | 847.4760 | | |

*nd= no detectable.

El Codex Alimentarius (Alinorm 01/25 2000) ha establecido que el contenido de HMF en miel no debe ser superior a 80 mg / kg. La Unión Europea (Directiva de la UE 110/2001), sin embargo, recomienda un límite inferior de 40 mg / kg con las siguientes excepciones: se permite 80 mg / kg para la miel que se origina en países o regiones con temperaturas tropicales (23). La Norma Técnica Peruana NTP (209.168.1999) establece un contenido de 80mg/kg como máximo de HMF en miel (3).

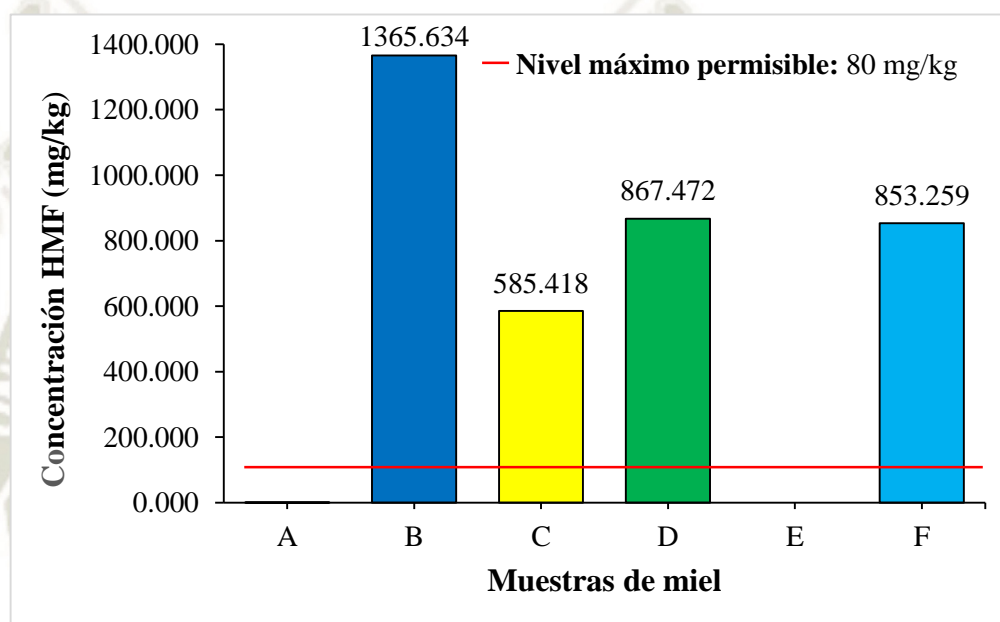


Figura 3.4: Comparación del contenido de HMF (mg/kg) en las diferentes muestras de miel

Como se puede observar en la Figura 3.4 la concentración de HMF en las muestras B (1365.6 mg/kg), C (585.4 mg/kg), D (867.5 mg/kg) y F (853.3 mg/kg) se encuentran por encima de 80 mg/kg incumpliendo así los niveles máximos permitidos. Estos niveles de HMF sugiere la posibilidad que: 1) la miel haya sido sometida a altas temperaturas, 2) almacenamiento inadecuado o prolongado (miel añeja) y 3) adulteración con jarabe de azúcar invertido. En contraste, en las muestras A y E las concentraciones de HMF se encuentran por debajo del límite de detección y del límite de cuantificación, por lo que el método es inexacto a concentraciones de HMF < 1mg/kg.

En la Figura 3.5 se puede observar el Cromatograma correspondiente a la muestra C, que muestra la presencia del HMF.

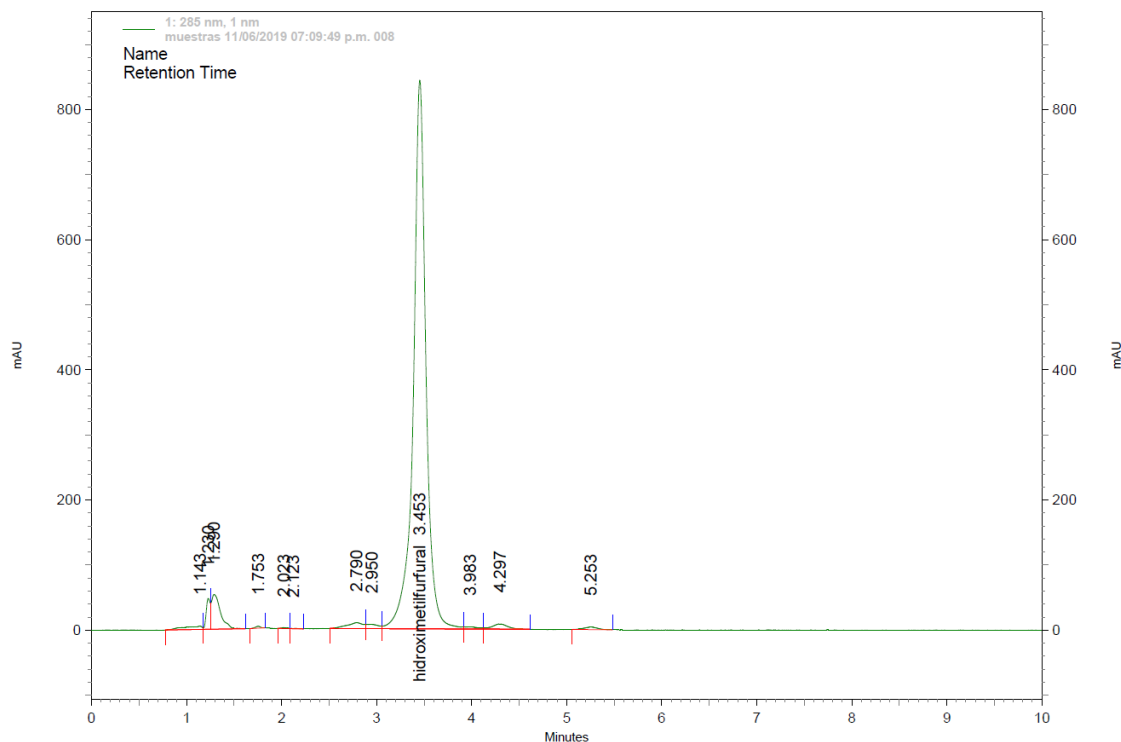


Figura 3.5: Cromatograma correspondiente a la muestra C, que muestra la presencia del HMF

2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE:

2.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO:

2.1.1. LINEALIDAD:

La linealidad es la relación entre la concentración de un analito y su respectiva respuesta.

Para su desarrollo fue necesario elaborar una gráfica de calibración con el estándar de HMF, para lo cual se prepararon 6 soluciones con las siguientes concentraciones: 12.24 ppm, 48.96 ppm 85.68 ppm, 122.4 ppm, 159.12ppm y 195.84ppm. Luego de preparar cada uno de los patrones, estos fueron tratados por el método de White. Este procedimiento se realizó por triplicado para evaluar los estimadores de regresión (coeficiente de regresión lineal, pendiente e intercepto de las curvas de calibración).

Tabla 3.9: Datos para la determinación de la linealidad del método.

| Concentración (mg/L) | Absorbancia I (AUC) | Absorbancia II (AUC) | Absorbancia III (AUC) | Promedio |
|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|----------|
| 12.24 | 0.083 | 0.077 | 0.08 | 0.080 |
| 48.96 | 0.298 | 0.278 | 0.283 | 0.286 |
| 85.68 | 0.534 | 0.532 | 0.541 | 0.536 |
| 122.4 | 0.753 | 0.756 | 0.769 | 0.759 |
| 159.12 | 0.98 | 0.985 | 1.003 | 0.989 |
| 195.84 | 1.189 | 1.208 | 1.228 | 1.208 |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

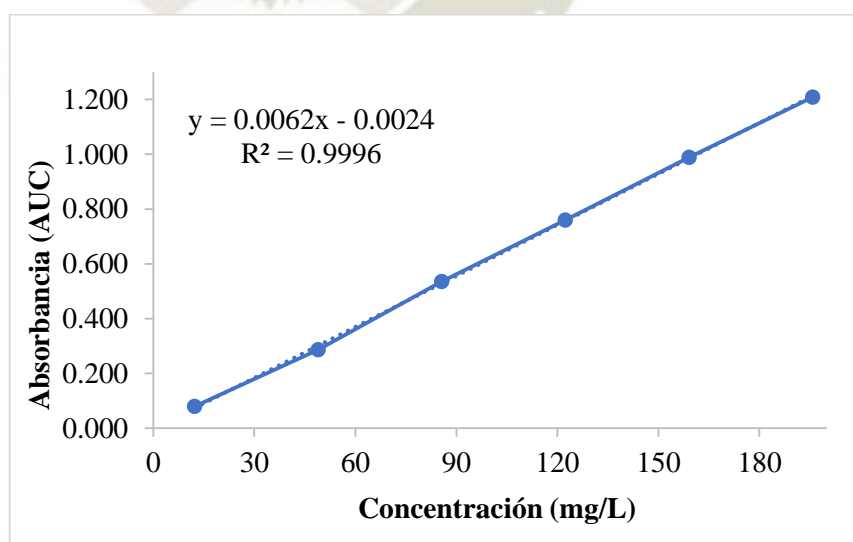


Figura 3.6: Gráfico de calibración correspondiente al HMF por Espectrofotometría UV-Vis.

En la Figura 3.6 se observa el grafico de calibración correspondiente a los datos de la Tabla 3.9, permitiéndonos obtener los valores de a,b y r^2 , donde:

| | |
|-------|--------|
| a | 0.0024 |
| b | 0.0062 |
| r^2 | 0.9996 |

El $r^2=0.9996$ indica que existe un alto grado de correlación ya que este valor es cercano a la unidad.

Truzzi (29) en su investigación utilizando el mismo método obtuvo un $r^2=0.9989$. Zambrano (16) obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9981 en una de sus gráficas de calibrado.

En el presente trabajo, se obtuvo un $r^2=0.9996$, obteniéndose mejores resultados de linealidad de los autores anteriores, los cuales también concluyeron que existe una correlación lineal entre el analito y su respuesta.

2.1.2. SENSIBILIDAD:

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son límites de detección y límites de cuantificación.

En la Tabla 3.10 se puede observar los resultados obtenidos para el cálculo del límite de detección y de cuantificación.

Tabla 3. 10: Áreas cromatográficas y su desviación estándar para la determinación del parámetro sensibilidad.

| Concentración (mg/L) | Absorbancia I (AUC) | Absorbancia II (AUC) | Absorbancia III (AUC) | S |
|----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-------|
| 12.24 | 0.083 | 0.077 | 0.08 | 0.003 |
| 48.96 | 0.298 | 0.278 | 0.283 | 0.010 |
| 85.68 | 0.534 | 0.532 | 0.541 | 0.005 |
| 122.4 | 0.753 | 0.756 | 0.769 | 0.009 |
| 159.12 | 0.98 | 0.985 | 1.003 | 0.012 |
| 195.84 | 1.189 | 1.208 | 1.228 | 0.020 |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

Con los datos de la Tabla 3.10, se determinó el gráfico de la concentración vs el promedio (Figura 3.7), y el gráfico de concentración vs desviación estándar (Figura 3.8) correspondientes al HMF, para poder hallar los límites de detección y cuantificación.

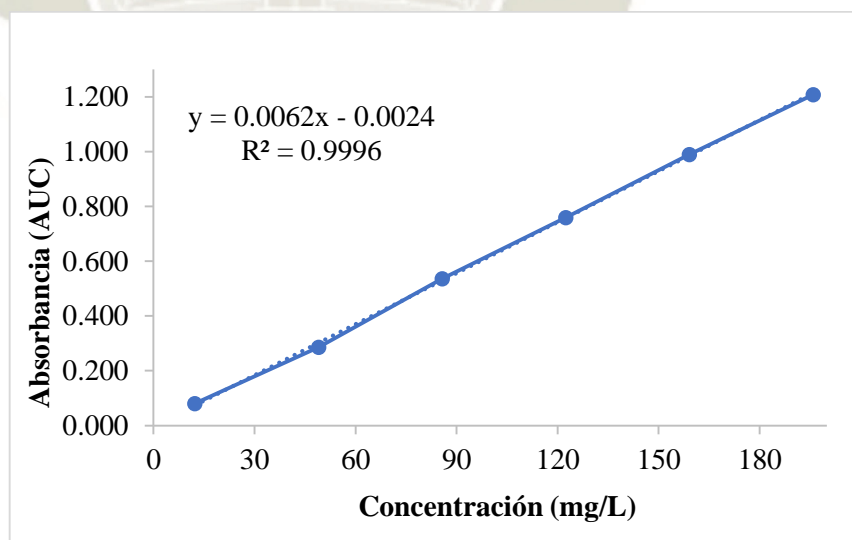


Figura 3.7: Gráfico de concentración vs área

El valor de Y_{bl} para este caso es igual a la ordenada del origen obtenida en la gráfica concentración vs área

$$y = 0.0062x - 0.0024$$

$$Y_{bl} = 0.0024$$

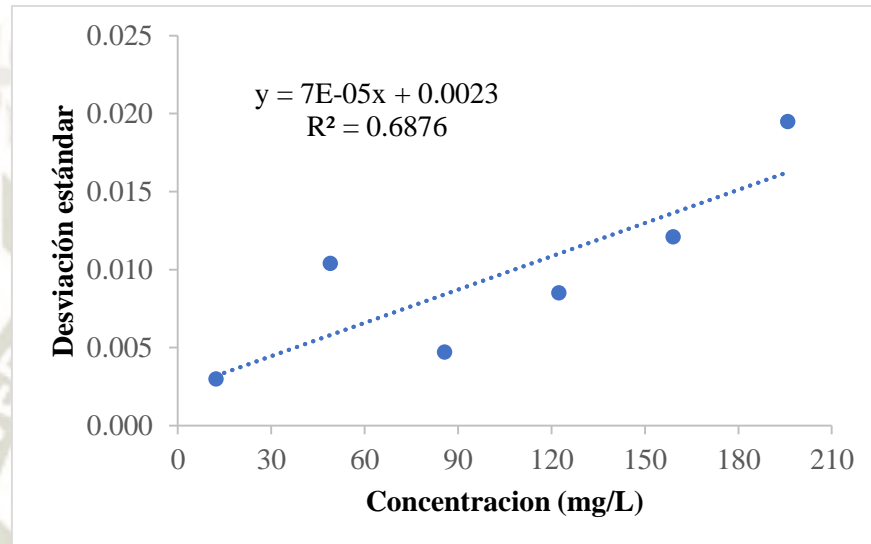


Figura 3.8: Gráfico de concentración vs desviación estándar

El valor de S_{bl} para este caso es igual a la ordenada del origen obtenida en la gráfica concentración vs desviación estándar.

$$y = 7E-05x + 0.0023$$

$$S_{bl} = 0.0023$$

Luego, usando la ecuación de la gráfica de calibración para HMF.

$$y = 0.0062x - 0.0024$$

Tomamos la pendiente ($b= 0.0024$) para calcular el límite de detección (LD) (ecuación 2.4) y de cuantificación (LC) (ecuación 2.5). Determinándose así el valor de LD de 0.61 mg/L y el LC de 1.67 mg/L.

En la investigación realizada por Truzzi (29), se obtuvo un LD de 0.23 y un LC de 0.70 mg/L. Zambrano (16) obtuvo un LD= 0.97 mg/L y LC=1.4 mg/L.

2.1.3. PRECISIÓN:

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples de una misma muestra homogénea en condiciones predeterminadas.

La repetibilidad del sistema instrumental estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma concentración o muestra de forma consecutiva en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La estimación de la repetibilidad instrumental, se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación porcentual (CV%) de una serie de medidas.

Para el ensayo de repetibilidad del sistema instrumental se analizó por espectrofotometría UV-Vis 5 veces una misma concentración de 85.68 mg/L, las absorbancias obtenidas se muestran en la Tabla 3.11 donde se observa un CV% de 1.23% estando los resultados dentro de lo estipulado por la USP, la cual indica en general un CV% del sistema no mayor del 2%, analizando 5 veces una solución estándar, pudiéndose obtenerse valores inferiores al 1% e incluso menores.

Tabla 3. 11: Absorbancias correspondientes de HMF a una concentración de 85.68 ppm.

| Repetición | Absorbancia |
|-----------------|-------------|
| 1 | 0.534 |
| 2 | 0.532 |
| 3 | 0.541 |
| 4 | 0.545 |
| 5 | 0.529 |
| Promedio | 0.006610598 |
| S | 0.5362 |
| CV% | 1.23% |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

Para la determinación de la repetibilidad del método, se utilizaron los CV% de las concentraciones utilizadas para hallar la linealidad.

En la Tabla 3.12 se muestran los coeficientes de variación para cada concentración del parámetro de linealidad.

Tabla 3.12: Datos obtenidos para determinar el coeficiente de variación porcentual.

| Conc. (ppm) | Absorbancia I | Absorbancia II | Absorbancia III | Promedio | S | %CV |
|-------------|---------------|----------------|-----------------|----------|-------|-------|
| 12.24 | 0.083 | 0.077 | 0.08 | 0.08 | 0.003 | 3.75% |
| 48.96 | 0.298 | 0.278 | 0.283 | 0.286 | 0.010 | 3.64% |
| 85.68 | 0.534 | 0.532 | 0.541 | 0.536 | 0.005 | 0.88% |
| 122.4 | 0.753 | 0.756 | 0.769 | 0.759 | 0.009 | 1.12% |
| 159.12 | 0.98 | 0.985 | 1.003 | 0.989 | 0.012 | 1.22% |
| 195.84 | 1.189 | 1.208 | 1.228 | 1.208 | 0.020 | 1.61% |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

Para definir si el método era repetible o no, se consideró los límites establecidos por la AOAC. Como la concentración máxima considerada para la realización de la gráfica de calibración fue de 195.64 ppm de HMF, se consideró entonces

un de CV% aceptable de no mayor al 5.3% (el cual corresponde a una concentración de 100ppm) como se puede observar en la Tabla 3.5.

Por lo observado en la Tabla 3.12, los valores de coeficiente de variación obtenidos (con un valor mínimo de 1.12% y máximo de 3.75%. no sobrepasan el valor límite mencionado de 5.3%, lo cual permite concluir que el método aplicado posee repetibilidad.

2.1.4. EXACTITUD:

La exactitud es el parámetro que mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. Se expresa como porcentaje de recuperación.

Para el desarrollo de este parámetro, se prepararon 6 fiolas: una fiola con estándar de HMF a una concentración aproximada de 5 ppm, 2 fiolas con muestra y 2 fiolas con muestra más estándar. Esta operación se realizó por duplicado.

Tabla 3. 13: Porcentaje de recuperación del HMF.

| | Muestra (Absorbancia) | Estándar (Absorbancia) | Muestra+Estándar (Absorbancia) |
|--------------------------|--|---|---|
| Repetición 1 | 0.099 | 0.662 | 0.834 |
| Repetición 2 | 0.093 | 0.618 | 0.839 |
| Promedio | 0.096 | 0.640 | 0.8365 |
| % de Recuperación | | 115.70% | |

Fuente: Elaboración propia

La recuperación fue de 115.70%, ubicándose por encima del rango esperado según la concentración del analito (80-110%) expresado en la Tabla 3.7.

Los porcentajes de recuperación por encima del 100% indican interferencias debidas a la matriz. Este hallazgo concuerda con lo descrito por Zappala (6) el cual indica que el método de HPLC es mejor que el método espectrofotométrico debido a que el método por HPLC separa el HMF de otros componentes evitando así las interferencias en la determinación. Estas interferencias podrían ser debido a varios aldehídos presentes en mieles de acuerdo a su origen floral o a productos que aparecen durante el acondicionado o almacenamiento.

2.2. CUANTIFICACIÓN DE HMF EN MIEL POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS:

Los resultados de la concentración de HMF en mg/kg de las seis mieles analizadas (n=3) son detallados en la Tabla 3.14. El cálculo de las concentraciones se realizó utilizando las ecuaciones 2.8 y 2.9 detalladas anteriormente.

Tabla 3.14: Contenido de HMF (mg/kg) por el Método de Espectrofotometría UV-Visible.

| Muestras | Absorbancia (A284-A336) | HMF (mg/kg) | Promedio | S |
|----------|-------------------------|-------------|----------|-------|
| A1 | 0.014 | 20.2 | | |
| A2 | 0.013 | 19.4 | 19.9 | 0.44 |
| A3 | 0.015 | 20.2 | | |
| B1 | 0.212 | 1493.2 | | |
| B2 | 0.214 | 1472.8 | 1471.9 | 21.68 |
| B3 | 0.218 | 1449.8 | | |
| C1 | 0.401 | 590.7 | | |
| C2 | 0.408 | 604.4 | 596.4 | 7.11 |
| C3 | 0.413 | 594.1 | | |

| | | | | |
|-----------|-------|--------|--------|-------|
| D1 | 0.143 | 1001.3 | | |
| D2 | 0.141 | 987.3 | 1018.5 | 15.91 |
| D3 | 0.14 | 1021.4 | | |
| E1 | 0.005 | 7.4 | | |
| E2 | 0.004 | 5.9 | 7.4 | 1.53 |
| E3 | 0.006 | 9.0 | | |
| F1 | 0.267 | 877.9 | | |
| F2 | 0.267 | 873.0 | 886.2 | 18.85 |
| F3 | 0.273 | 907.8 | | |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

En un primer análisis de las muestras utilizando 5g y disolviendo en 50mL, los valores de las absorbancias a 284nm excedían el límite de absorbancia de 0.6 especificado por White, llegando a alcanzar valores de 4, la cuál es la máxima absorbancia del espectrofotómetro UV-Vis.

Por los motivos mencionados se procedió de la siguiente manera: para las muestras A, C y E se realizaron diluciones de 1:100 (0.5g de muestra en 50mL), para la muestra B y D 1:500 (0.1g de muestra en 50mL) y para la muestra F 1:250 (0.1g de muestra en 25mL). Utilizando la formula detallada anteriormente, se calcularon los valores detallados en la Tabla 3.14.

Como se puede observar en la Figura 3.9 la concentración de HMF en las muestras B (1471.9mg/kg), C (596.4mg/kg), D (1018.5mg/kg) y F (886.2 mg/kg) se encuentran por encima de 80 mg/kg incumpliendo así los niveles máximos permitidos. Estos niveles de HMF sugiere la posibilidad que: 1) la miel haya sido sometida a altas temperaturas, 2) almacenamiento inadecuado o prolongado (miel añeja) y 3) adulteración con jarabe de azúcar invertido.

En contraste, en las muestras A y E las concentraciones de HMF se encuentran por debajo del nivel máximo permitido, por lo que la miel: 1) es fresca, 2) ha sido almacenada en un ambiente fresco y 3) no ha sido sometida a tratamientos térmicos, es decir, su calidad es satisfactoria en términos de contenido de HMF.

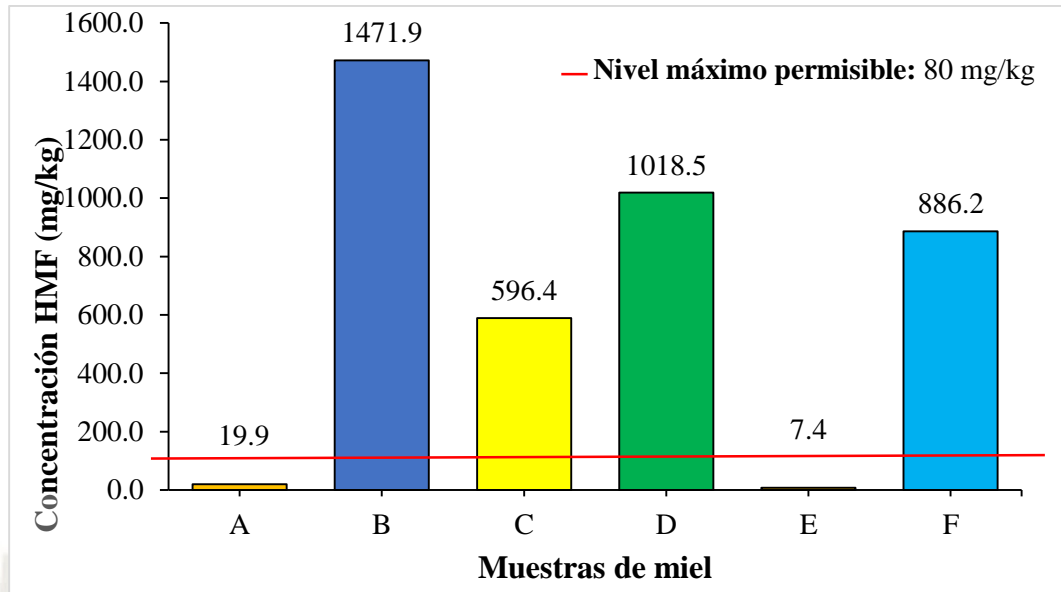


Figura 3.9: Comparación del contenido de HMF (mg/kg) en las 6 mieles analizadas por Espectrofotometría UV-Vis por el Método de White.

3. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS:

En contenido de HMF en las 6 muestras fue medido por dos métodos (White y HPLC), propuestos por la Comisión Internacional de la Miel. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15: Comparación del contenido de HMF (mg/kg) por el Método de HPLC y por el Método UV-Vis (White).

| Muestras | HMF (mg/kg) | |
|----------|-----------------|-----------------------|
| | Método HPLC | Método UV-Vis (White) |
| A | nd | 19.9 ± 0.44 |
| B | 1365.634 ± 16.4 | 1471.9 ± 21.68 |
| C | 585.418 ± 14.4 | 596.4 ± 7.11 |
| D | 867.472 ± 7.4 | 1018.5 ± 15.91 |
| E | nd | 7.4 ± 1.53 |
| F | 853.259 ± 18.1 | 886.2 ± 18.85 |

Fuente: Elaboración propia.

Un análisis de varianza de dos factores (Tabla 3.16) fue aplicado con el objetivo de determinar si existe diferencia significativa entre los métodos utilizados (HPLC y Espectrofotometría UV-Vis)

Tabla 3. 16: Análisis estadístico de ANOVA para la determinación de diferencia significativa entre los métodos de HPLC y Espectrofotometría UV-Vis.

| Origen de las variaciones | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|--------------------|---------------------------|-------------|--------------|----------------------|
| Método | 1 | 25829.25 | 139.6888479 | 1.71088E-11 | 4.25967727 |
| Muestras | 5 | 1866749.3 | 10095.68837 | 4.80834E-39 | 2.62065415 |
| Interacción | 5 | 5531.53623 | 29.91546111 | 1.44273E-09 | 2.62065415 |
| Dentro del grupo | 24 | 184.905598 | | | |
| Total | 35 | | | | |

Fuente: Elaboración propia (Excel).

Se obtuvo un $p < 0.05$ por lo que se rechaza la hipótesis nula, concluyendo así que existe diferencia significativa entre ambos métodos a un nivel de confianza del 95%. Este hallazgo coincide con el estudio realizado por Zappala (6) que indica que el método de White y el método HPLC difieren significativamente, a un rango de concentraciones de 0-108.8 mg/kg. A su vez, también coincide por lo reportado por Jalili (35) a un rango de concentraciones de 16.61-843-51 mg/kg.

El método por HPLC es más apropiado para la determinación de HMF en miel debido a que este método separa el HMF de otros componentes y así evita las interferencias en la determinación, estas interferencias pueden ser debidas a sustancias probablemente derivadas del calentamiento de la miel o de un mal almacenamiento y a varios aldehídos presentes en las mieles de acuerdo a su origen floral. Estas sustancias interfieren con los métodos espectrofotométricos, los cuales, en contraste con los métodos cromatográficos, no son capaces de revelarlos.

CONCLUSIONES

PRIMERA:

Se desarrolló y validó dos técnicas analíticas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Espectrofotometría UV-Visible para la cuantificación de Hidroximetilfurfural. Para la validación se evaluó los parámetros de: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud. Estando los resultados dentro de lo aceptado por la AOAC y USP, a excepción del porcentaje de recuperación por el método de Espectrofotometría UV-Visible a causa de interferencias debidas a la matriz.

SEGUNDA:

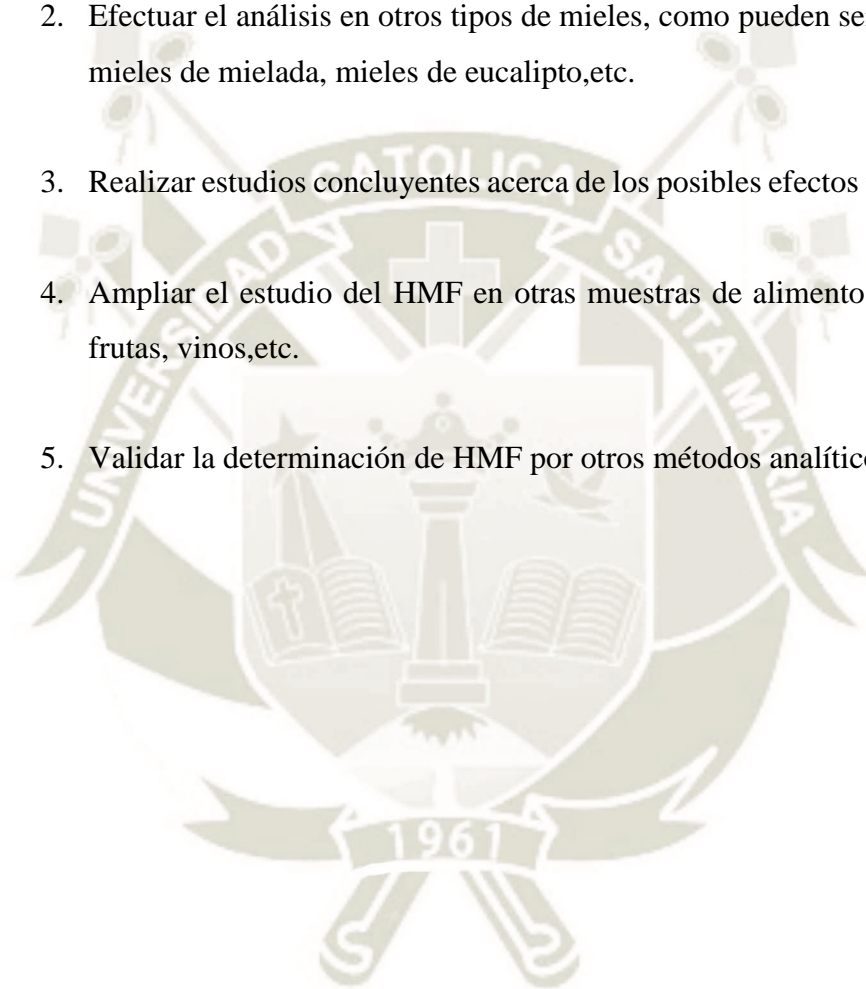
Se determinó la concentración de Hidroximetilfurfural en seis muestras de miel por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Espectrofotometría UV-Visible obteniendo en cuatro de las muestras niveles por encima del límite permisible de 80 mg/kg que establece la Norma Técnica Peruana, a excepción de dos muestras con niveles por debajo de dicho límite.

TERCERA:

La técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución es más apropiada para la determinación de Hidroximetilfurfural en miel debido a que separa este compuesto de otros componentes evitando interferencias en la determinación las cuales pueden ser debidas a sustancias derivadas del calentamiento de la miel o de un mal almacenamiento y a varios aldehídos presentes en las mieles de acuerdo a su origen floral.

SUGERENCIAS

1. Un mayor control por parte de la autoridad responsable en las mieles de la ciudad de Arequipa, para asegurar el cumplimiento de la Norma Técnica Peruana.
2. Efectuar el análisis en otros tipos de mieles, como pueden ser: mieles frutales, mieles de mielada, mieles de eucalipto, etc.
3. Realizar estudios concluyentes acerca de los posibles efectos tóxicos del HMF.
4. Ampliar el estudio del HMF en otras muestras de alimentos, como jugos de frutas, vinos, etc.
5. Validar la determinación de HMF por otros métodos analíticos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro E. Evaluación de indicadores para la diferenciación de mieles provenientes de la zona cafetera de la Sierra Nevada de Santa Marta [Trabajo de investigación]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2015.
2. Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Jiménez JJ, Martín M.T. High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A*.2001; 917:95-103.
3. INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Perú). Miel: Definiciones, requisitos y rotulado. NTP 209.168.1999. Lima, Perú. 8 p
4. Spano N, Casula L, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Scanu R, et al. An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey: The case of strawberry tree honey. *Talanta The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*.2006;68:1390-1395.
5. Bogdanov S. Harmonised methods of the International Honey Commission. *International Honey Commission (IHC)*. 2009 ;1-63.
6. Zappala M, Fallico B , Arena E , Verzera A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Journal of Food Control*. 2005;16:273-277
7. Comisión del Códex Alimentarius, 2001: Norma Códex para la miel. Roma (Italia), Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas y Organización Mundial de la Salud (CODEX STAN 12)
8. Delgado F. Determinación de las concentraciones de ácido ascórbico, hidroximetilfurfural y actividad de la diastasa en mieles con propiedades antibacterianas desde la IV región hasta la VII región, Chile [Seminario de Graduación]. Chile: Universidad Austral de Chile;2014.
9. Bogdanov S. Honey Composition. In: *Book of Honey*, Chapter 5;2009.
10. Correa AM. Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos; 2015.

11. Estrada J.E. Procesamiento y vida en anaquel de miel de abejas peruanas [Trabajo Monográfico]. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2017.
12. Jiménez VH. Evaluación de Hidroximetilfurfural en diferentes marcas de miel de abeja, comercializadas en un supermercado de guayaquil [Tesis de maestría]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química; 2016
13. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria y Coordinación General de Ganadería. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Miel. México.
14. Ministerio de Agroindustria. Guía de Buenas Prácticas Apícolas y de Manufactura. Buenos Aires; 2016
15. Mouteira MC. Principios básicos para la elaboración de un manual de calidad en sala de extracción de miel. Primera ed. Buenos Aires: Ministerio de Asuntos Agrarios Provincia de Buenos Aires; 2014.
16. Zambrano P., Ortega S. Validación de la determinación de hidroximetilfurfural (HMF) en miel de abejas por el método 980.23 de la AOAC para el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira [Proyecto de Grado]. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2015.
17. Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. Chem Cent J. 2018;12(1):35.
18. Lorenzo G.A. Análisis, Inhibición e Ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas; 2013.
19. Abraham K, Gurtler R, Berg K, Heinemeyer G, Lampen A, Appel KE. Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. Mol. Nutr. Food Res. 2011;55:667–678.
20. Svendsen C, Husøy T, Glatt H, Paulsen JE, Alexander J. 5-Hydroxymethylfurfural and 5-Sulfoxymethylfurfural Increase Adenoma and Flat ACF Number in the Intestine of Min/+ Mice. Anticancer Research. 2009;29:1921-1926.
21. Badui D.S. Química de los alimentos. 4a ed. México: Pearson Educación; 2006.

22. Airborne.com[Internet].Nueva Zelanda:Airborne.com;2019 [Consultado el 7 de julio del 2019] Disponible en:<https://www.airborne.co.nz/hmf.shtml>
23. Khalil M.I , S.A. Sulaiman, Gan S.H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Journal of Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48:2388-2392.
24. Owen T. Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna. Alemania:Agilent Technologies; 2000.
25. Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Introducción a la HPLC, Aplicación y Practica. 1a ed. Buenos aires: Artes Gráficas Farro;1992.
26. Töppner K, Hansen D, Herbig. HPLC Analysis:The Role of Ultrapure Water. Sartorius.
27. Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición:“Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago de Chile ; 2010.
28. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. España: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001.
29. Truzzi C, Annibaldi A, Illuminati S, Finale C, Rossetti M, Scarponi G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *Journal of Food Science*. 2012;77:784-789
30. Kukurová K, Karovičová J, Greif G, Kohajdová Z, Lehkoživová J.Determination of 5-hydroxymethylfurfural after Winkler and by the HPLC method for authentication of honey.*Chemical Papers- Slovak Academy of Sciences*. 2006;60:186-191
31. Murillo C, Villamizar A, Pico S, Jaimes J, Lopez L. Implementación de un método analítico por cromatografía líquida para evaluar la calidad en mieles del nororiente colombiano. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2017;25:32-42
32. Martysiak-Żurowska, D, Borowicz A. A Comparison of Spectrophotometric Winkler Method and HPLC Technique for Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Natural Honey 939:946. *Chemia Analityczna: Chemical Analysis (Warsaw)*. 2009;54:

33. Kmecl V, Smodis M.I. A comparison of two methods for determination of HMF in honey and bee food: HPLC method versus spectrophotometric Winkler method. In: 49th Croatian & 9th International Symposium on Agriculture. Dubrovnik. p. 471-475
34. AOAC Official Methods of Analysis. "Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements." (2012).
35. Jalili M. Evaluating the Quality and Physicochemical Properties of Honey Commercialized in Iran. Journal of Chemical Health Risks. 2016; 6:175-184.

