

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOMO EN MIEL DE ABEJA POR
VOLTAMPEROMETRÍA Y SU APLICACIÓN COMO BIOINDICADOR DE
CONTAMINACIÓN AMBIENTAL, AREQUIPA-2012”**

Tesis presentada por Bachiller
IDRIS SOREM CÁCERES SÁNCHEZ

Para optar el título de
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

Asesor:

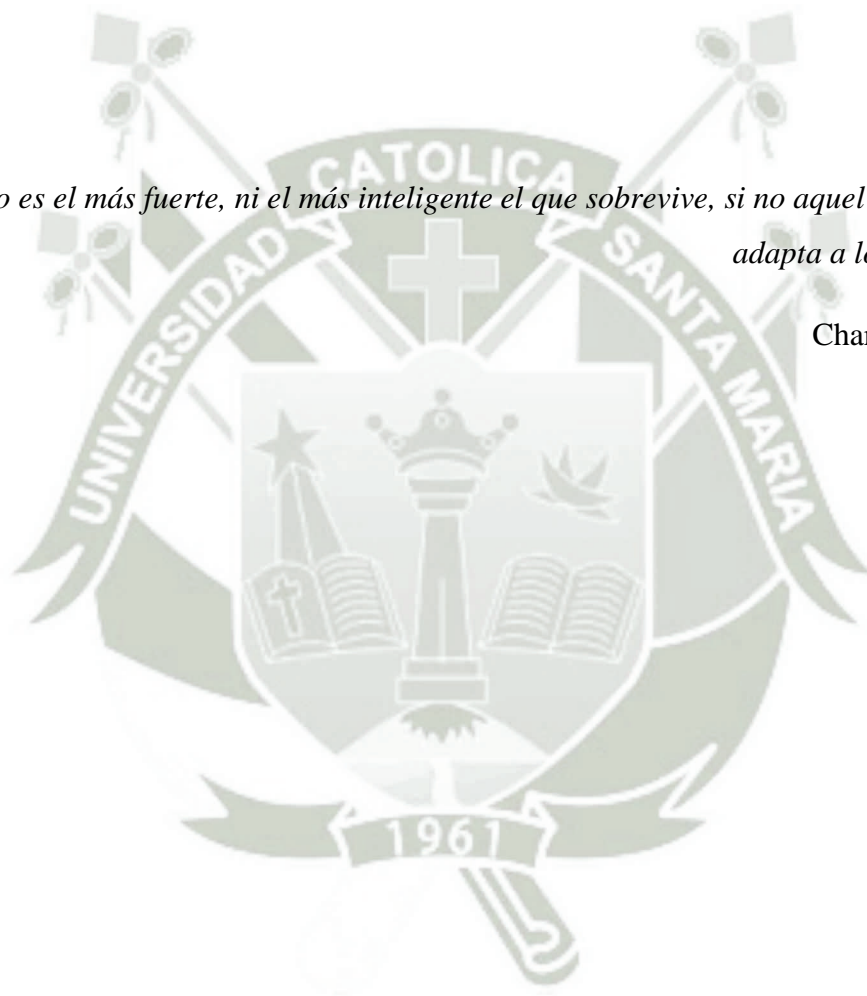
Dr. José A. Villanueva Salas, PhD.

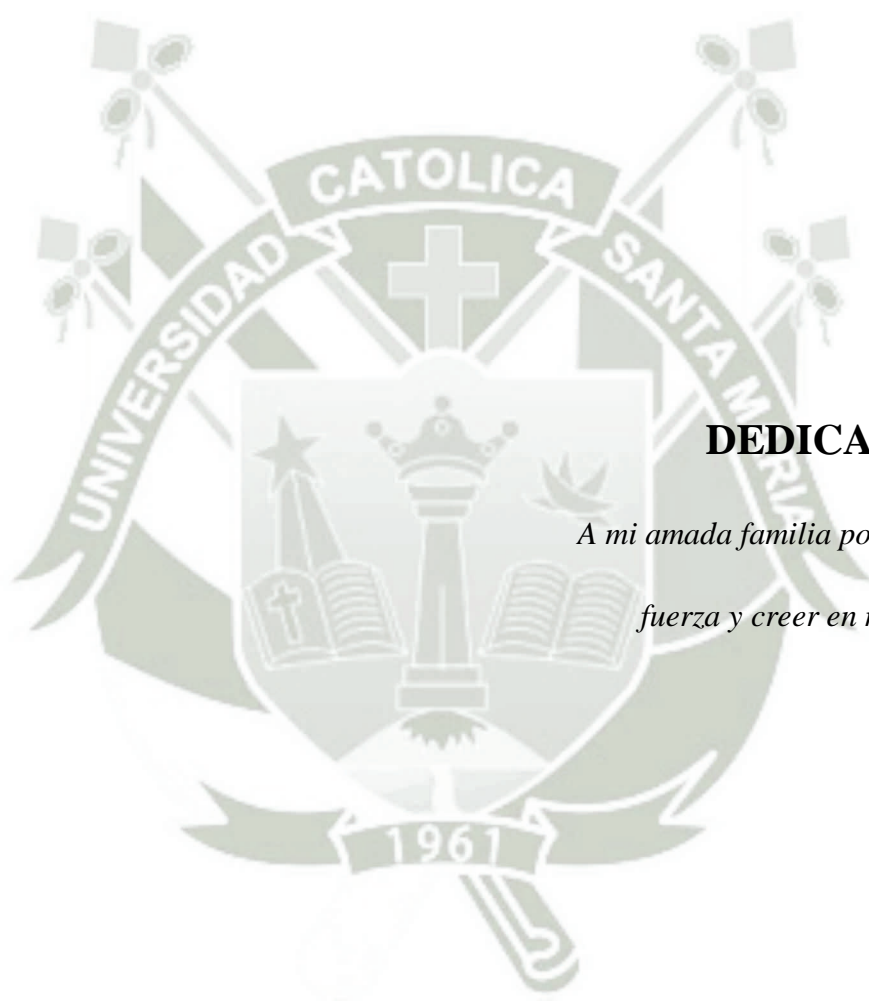
AREQUIPA - PERÚ

2014

No es el más fuerte, ni el más inteligente el que sobrevive, si no aquel que más se adapta a los cambios.

Charles Darwin





DEDICATORIA

*A mi amada familia por su apoyo,
fuerza y creer en mí siempre.*



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fuerza para seguir adelante y guiar mis pasos siempre.

A mis amados padres Edgar y Luz y a mí querido hermano Iqbal, por su amor, paciencia, sobre todo por siempre creer en mí y en mis sueños.

A mamá Elly por su amor, paciencia, te quiero mucho. A toda mi familia por siempre apoyar cada paso que doy.

Al Doc. José Villanueva por su apoyo y consejos durante mi formación y el desarrollo de este trabajo.

A mis queridas amigas Kerly, Angela, Charito y Dere, por estar siempre ahí, escucharme y acompañarme en los buenos y malos momentos.

A la Doctora Yulitza, Chani, Ceci, Ever y Stamber por acompañar mis largas horas en el laboratorio, por su ayuda y sus consejos.

A los apicultores del departamento de Arequipa por apoyarme desde el principio y permitirme usar sus productos para el desarrollo de este trabajo.

A todos los que contribuyeron e influyeron directa o indirectamente para dar este gran paso.

Muchas gracias a todos.

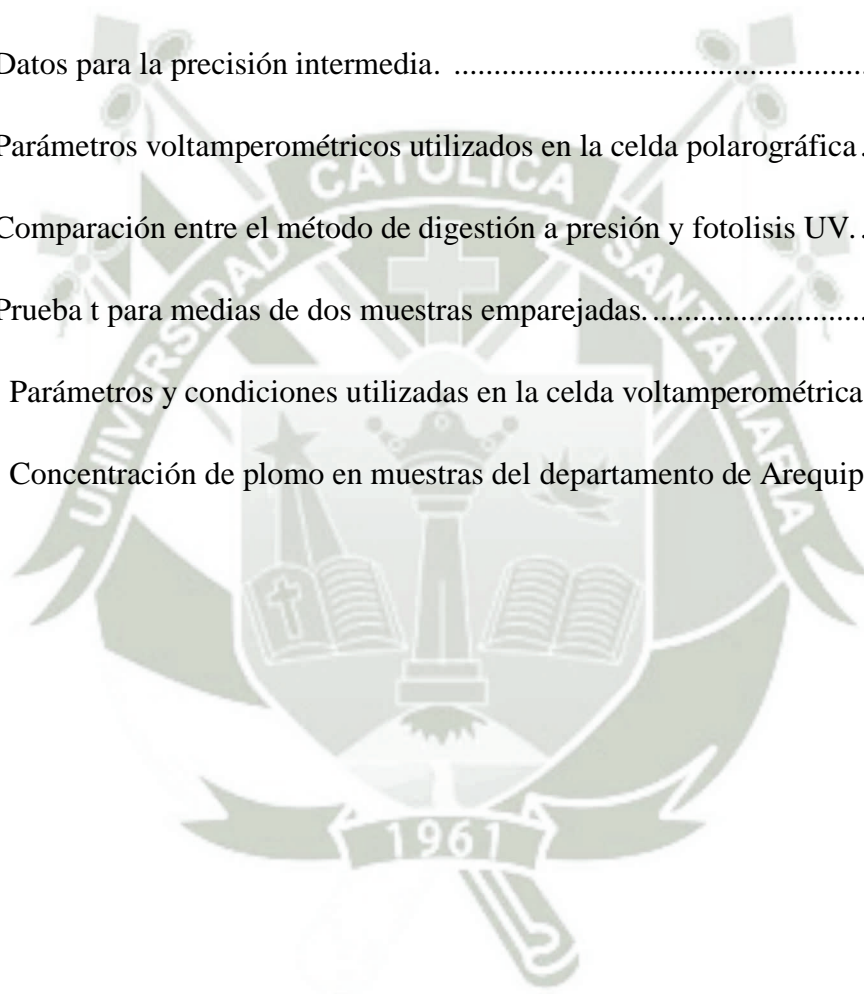
ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS.....	6
CAPÍTULO I	7
MARCO TEÓRICO	7
1.1 Apicultura y miel	7
1.2 Clasificación de la mieles según su origen botánico	8
1.3 La miel como alimento humano	9
1.4 Cosecha de la miel	9
1.5 Propiedades y aspectos nutricionales	10
1.5.1 Composición química de la miel	10
1.6 Componentes que influencia la calidad de la miel de abejas	14
1.6.1 Metales pesados	14
1.6.2 Residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios.....	14
1.7 Metales pesados.....	15
1.7.1 Plomo	15
1.7.2 Metales en alimentos	21
1.8 Voltamperometría y polarografía	23
1.8.1 Introducción	23
1.8.2 Instrumentación en voltamperometría	24
1.8.3 Principio de voltamperometría	25
1.8.4 Métodos voltamperométricos	26
1.8.5 Preparación de muestras para análisis de metales	30
1.9 Preparación de muestras para análisis de metales	29
1.9.1 Métodos de digestión húmeda	30
CAPÍTULO II	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1 Lugar de ejecución del análisis	33
2.2 Materiales, reactivos y equipos	33
2.3 Métodos analíticos	35

2.3.1 Recolección de muestras	35
2.3.2 Validación del equipo voltamperométrico	35
2.3.3 Validación del método para muestras biológicas	36
2.3.4 Métodos para la determinación de la concentración de plomo en miel	41
2.3.5 Preparación de reactivos	45
2.3.6 Métodos estadísticos	46
CAPÍTULO III	49
RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
3.1 Recolección de las muestras	49
3.2 Validación del equipo	50
3.3 Validación del método	52
3.3.1 Linealidad	53
3.3.2 Precisión	54
3.3.3 Límites de detección y cuantificación	55
3.4 Comparación de métodos de digestión	57
3.5 Determinación de la concentración de plomo en miel	61
3.5.1 Preparación de la muestra	62
3.5.2 Digestión de la muestra	62
3.5.3 Determinación voltamperométrica de plomo	63
3.6 Concentración de plomo en miel del departamento de Arequipa	64
3.7 Aplicación de la miel como bioindicador ambiental	67
CAPÍTULO IV	74
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	80

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1: Composición química promedio de la miel	11
Tabla 2: Reactivos comúnmente usados en la digestión/disolución de muestras	30
Tabla 3: Valores Aceptables de CV según la AOAC	40
Tabla 4: Datos para la linealidad del método	53
Tabla 5: Datos para la repetibilidad del método.....	54
Tabla 6: Datos para la precisión intermedia.	55
Tabla 7: Parámetros voltamperométricos utilizados en la celda polarográfica.....	58
Tabla 8: Comparación entre el método de digestión a presión y fotólisis UV.....	58
Tabla 9: Prueba t para medias de dos muestras emparejadas.....	59
Tabla 10: Parámetros y condiciones utilizadas en la celda voltamperométrica.	63
Tabla 11: Concentración de plomo en muestras del departamento de Arequipa.	65



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Abejas dentro del panal	9
Figura 2:	Abejas libando néctar	9
Figura 3:	Modelo metabólico del plomo en el ser humano.	19
Figura 4:	Costo de los daños relacionados con la salud ambiental en el Perú	21
Figura 5:	Instrumentación en voltamperometría.	24
Figura 6:	Principio de voltamperometría.	25
Figura 7:	Muestras de miel del departamento de Arequipa.....	33
Figura 8:	Digestión UV.	42
Figura 9:	Digestión a presión.	43
Figura 10:	Mapa de muestras de miel de abejas.....	49
Figura 11:	Validación electrónica para linealidad.....	50
Figura 12:	Validación electrónica del pico.....	51
Figura 13:	Validación química.	52
Figura 14:	Linealidad del método voltamperométrico.	53
Figura 15:	Determinación del límite de detección y cuantificación.....	55
Figura 16:	Concentración vs. Intensidad (nA).....	56
Figura 17:	Desviación estándar vs. Intensidad (nA).....	56
Figura 18:	Comparación gráfica entre los métodos de digestión.	59
Figura 19:	Digestión a presión por microondas de las muestras.	61
Figura 20:	Digestión por fotólisis UV de muestras de miel de abejas.	61
Figura 21:	Cambios de las muestras digeridas por UV	62
Figura 22:	Analizador voltamperométrico	63

Figura 23: Gráfica obtenida del análisis voltamperométrico64

Figura 24: Concentración de plomo en miel de abeja.66



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar los niveles de plomo en miel de abeja producida en el departamento de Arequipa, la importancia de un muestreo constante de este metal en un producto tan común en la alimentación peruana.

Se utilizaron muestras recolectadas de 15 panales ubicados en diferentes distritos productores de miel de abeja como Yura, Majes, Cercado, Lluta, Uchumayo, Caráveli, Characato, Condesuyos, La Unión, Polobaya, Socabaya, Pocsi y Chiguata todos ubicados dentro del departamento de Arequipa. Por cada punto de muestreo se colectó una muestra; las cuales fueron llevadas al laboratorio donde se pesaron 50 mg de cada una de ellas para su análisis haciendo uso de una técnica voltamperométrica de redisolución anódica, previa digestión por fotólisis por UV y digestión a presión por microondas.

La eficiencia en la digestión de la muestra es esencial para el análisis de elementos traza como el plomo por ello se comparó los métodos de digestión por fotólisis por UV y a presión por microondas mostrando que no hay diferencia significativa entre ambos métodos, se procedió a utilizar la digestión por fotólisis por UV.

Con la metodología empleada, la validación del método y los resultados. Se encontró que la cantidad de plomo en las muestras de miel se encontraban en el rango de 0.68 a 2.74 mg de plomo por kilogramo de miel de abeja, estando por encima de lo establecido en el reglamento técnico de la MERCOSUR sobre límites máximos permisibles de contaminantes inorgánicos en alimentos que es de 0.3 mg kg^{-1} .

En este trabajo se presenta la aplicación de la miel de abejas como bioindicador ambiental para detectar la contaminación por plomo procedentes de fuentes tales como el tráfico vehicular, zonas industriales y rurales del departamento de Arequipa, determinando y cuantificando este compuesto con un promedio de 1.22 mg kg^{-1} de plomo con lo cual podemos concluir que la miel de abejas es un indicador ambiental válido, presentando ventajas como el fácil manejo, obtención, bajo coste y muestreo selectivo limitado a un área de varios km^2 .



ABSTRACT

The objective of this research was to determine the levels of lead in honey produced in the city of Arequipa, to determine the importance of the constant collection of samples of this heavy metal in a product so common in Peruvian food.

We used samples collected from 15 honeycombs located in different places of honey production as Yura, Majes, Cercado, Lluta, Uchumayo, Caravelí Characato Condesuyos, La Union, Polobaya, Socabaya, Poci and Chiguata being located inside Arequipa's city. For each sample a point is taken, all samples were brought to the laboratory and weighed 50 mg of each sample for analysis using anodic stripping voltammetry technique after digestion by UV photolysis and digestion under pressure for microwaves.

The efficiency in the digestion of the sample is essential for the analysis of elements trace like the lead for it compared the methods of digestion for UV photolysis and digestion under pressure for microwaves showing that there is no significant difference between both methods of digestion, so that proceeded to use the digestion for UV photolysis.

The methodology, validation of the method and the results are discussed. We found that the amount of lead in the honey samples were in the range 0.68 a 2.74 mg of lead per kilogram of honey, still above set out in the the MERCOSUR Technical Regulation on Maximum inorganic contaminants in food is 0.3 mg kg^{-1} of lead.

We presented the application of bees' honey like environmental bioindicador to detect the contamination of lead coming from traffic, zones industrials and rural of Arequipa's department, present in bees' honey to evaluate the risk that implies in nutrition, determining and quantifying this compound with an average $1,22 \text{ mg kg}^{-1}$ of lead in honey of bees, we can conclude than the honey of bees is an environmental valid indicator, offering advantages such as easy handling, collection, low cost and selective sampling limited to an area of several km^2 .

INTRODUCCIÓN

La miel es una sustancia dulce natural y se utiliza ampliamente por todo el mundo ya que es un alimento popular. Es producida por las abejas a partir del néctar de las flores, de la secreción de partes vivas de las plantas. La miel está compuesta principalmente de carbohidratos, minerales y vitaminas. Por esta razón, desde los tiempos más remotos viene siendo recomendada para el tratamiento de ciertas dolencias, ya que, sus constituyentes le confieren innegables propiedades medicinales y dietéticas.

La contaminación por metales está localizada en áreas de tráfico intenso, industrial, rural y urbano en el departamento de Arequipa. El aumento intenso y constante de las actividades antropogénicas e industriales han favorecido la emisión de sustancias contaminantes hacia los ecosistemas, los cuales están íntimamente relacionados con las especies animales, en particular, las domésticas incluyendo al hombre, lo que facilita la entrada a dichas sustancias tóxicas en la cadena trófica. Las abejas exploran áreas de 7 km² para recolectar los elementos vitales para el desarrollo de su colonia (agua propóleos, polen, néctar y mielatos) y por consiguiente los productos de la colonia se puede relacionar con la contaminación local. Por otra parte, la facilidad de transporte y manejo de la colmena, junto a un coste razonable, permiten utilizar estos productos como indicadores ambientales.¹

La ingestión de Plomo presente en los alimentos es una importante y persistente vía de exposición para niños y adultos, en un estudio realizado en el 2000 se reportó que el 59% y el 81% del consumo total de plomo de los adultos podría ser atribuible a la dieta en las zonas urbanas y rurales, respectivamente.²

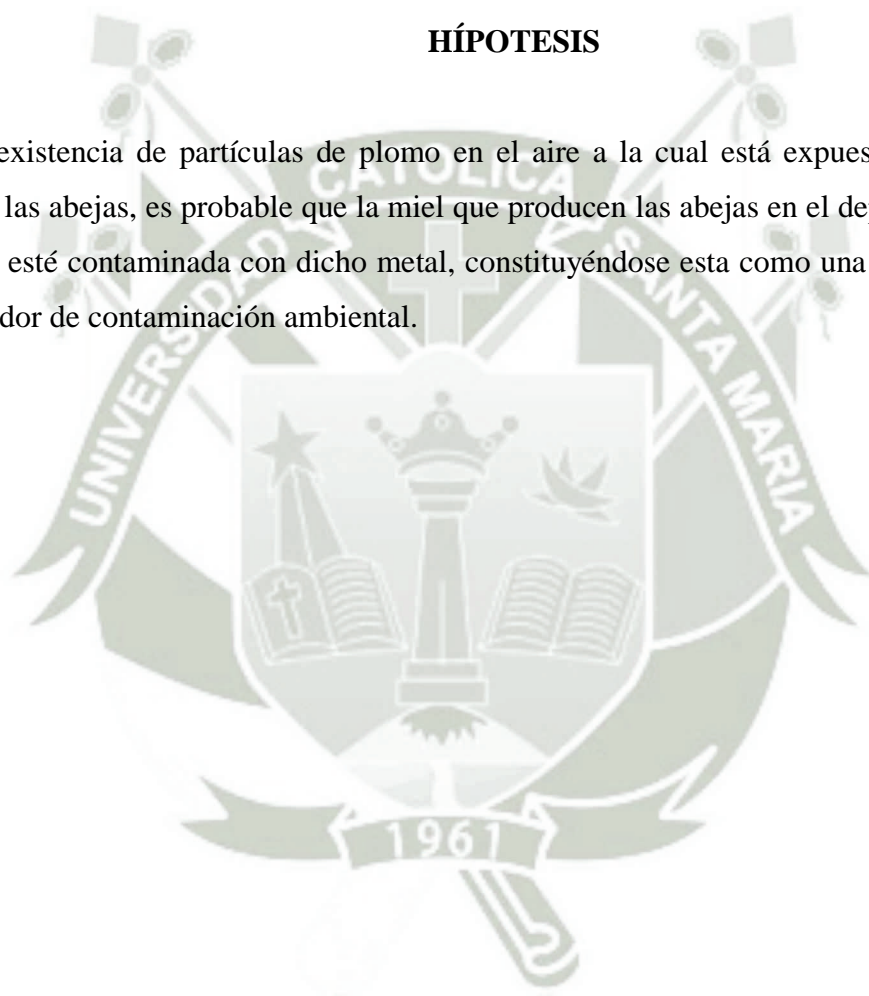
El plomo es un metal versátil con una amplia gama de aplicaciones importantes. Por desgracia, también es un metal tóxico que si se absorbe en el cuerpo en grandes cantidades ya sea a través de un episodio de alta exposición o a través de exposición crónica a cantidades menores, puede resultar en efectos adversos para la salud.³ Entre los síntomas que se presentan destacan las convulsiones, coma y muerte causada por los niveles sanguíneos de Pb superior a 800 mg/L, además del acorte en los lapsos de atención, problemas de conducta entre los niños y retraso en el crecimiento y desarrollo cognitivo.⁴

Es por esto que se propone el desarrollo de un estudio para determinar la concentración de plomo presente en alimentos básicos en la dieta de la población arequipeña, como es la miel de abejas pudiendo establecerse este como un indicador de calidad, cuyo objetivo final es asegurar y poder ofrecer un alimento inocuo con una adecuada riqueza nutricional.



HÍPOTESIS

Dada la existencia de partículas de plomo en el aire a la cual está expuesto el material vegetal y las abejas, es probable que la miel que producen las abejas en el departamento de Arequipa esté contaminada con dicho metal, constituyéndose esta como una alternativa de bioindicador de contaminación ambiental.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar los niveles de plomo en miel de abeja por voltamperetría y su aplicación como bioindicador de contaminación ambiental en el departamento de Arequipa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Validar una técnica voltamperométrica para la determinación de plomo en miel de abeja.
2. Comparar los métodos de digestión asistida por microondas y digestión por fotólisis UV para la determinación de plomo en miel de abeja.
3. Determinar la concentración de plomo en muestras de miel de abeja de los panales ubicados en los diversos puntos del departamento de Arequipa
4. Evaluar si la concentración de plomo se encuentra dentro de los límites máximos permisibles.
5. Valorar la aplicación de la miel de abeja como bioindicador de contaminación ambiental.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Apicultura y miel

Si analizamos etimológicamente la palabra Apicultura vemos que proviene del latín *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo), es decir, la ciencia que se dedica al cultivo de las abejas o a la cría de las abejas. Una definición completa sería la que la define como “la ciencia aplicada que estudia la abeja melífera y la tecnología por la que se obtienen beneficios económicos a partir de ella. La miel, constituye el único material endulzante que puede ser almacenado y usado tal cual es producido en la naturaleza. Para apreciar sus propiedades particulares, no Requiere procesamiento o purificación alguna. Si bien al comienzo, se usó exclusivamente con fines religiosos o medicinales posteriormente los griegos y romanos lo incorporaron como ingrediente a su dieta. Durante siglos constituyó el único endulzante utilizado hasta que en los últimos 100 años fue remplazado totalmente por el azúcar de caña o remolacha.⁶

La definición de miel de abejas según el *CODEX ALIMENTARIUS*, el cual es una colección reconocida internacionalmente de estándares, códigos de prácticas, guías y otras recomendaciones relativas a los alimentos, su producción y seguridad alimentaria bajo el objetivo de la protección del consumidor. Se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas *aphis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias propias que luego depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje (**Figuras 1 y 2**).⁵

La recolección del néctar u otras secreciones corresponden a las abejas pecoreadoras o recolectoras que parten de la colmena unas 12 veces al día para realizar vuelos de recogida que pueden llegar a los 10-12 Km de distancia, en los que visitarán entre 100 y 170 flores, recogiendo unos 50 mm³ de néctar¹². En estas visitas pueden realizar la recolección en 7 Km² de área¹. A las sustancias recogidas las abejas libadoras

añaden saliva, las fluidifican y las enriquecen en enzimas (diastasas, invertasas y glucoxidasas), transportándolas después en su buche hasta la colmena. En el interior de ésta otras obreras y los propios zánganos la distribuyen en las celdillas donde la miel sufrirá un proceso de concentración por pérdida de agua. El procesamiento que efectúan las abejas consiste en la reducción del contenido acuoso desde un 30 a 60% en el néctar a un 15-18%, inversión de la sacarosa por una invertasa y la adición de glucosa oxidasa que produce un incremento de la acidez (por producción de ácido glucónico) y pequeñas cantidades de H_2O_2 que contribuyen junto con la baja actividad del agua a la preservación de la miel⁶. En este momento las celdillas, con la miel ya madura, son taponadas con una fina capa de cera llamada opérculo.

El proceso de maduración tiene lugar dentro de las celdas abiertas del panal las cuales son selladas cuando la miel alcanza su densidad máxima. Los panales generalmente son contruidos por las abejas a partir de la cera que ellas secretan. La cantidad de cera producida debe ser de 8 a 10 veces la cantidad de miel a almacenar.⁶

1.2. Clasificación de mieles según su origen botánico

En base, a lo dicho anteriormente las mieles se pueden dividir según su origen botánico en:

- **Miel de néctar de flores:** La producida por las abejas a partir del néctar de las flores. Son levorrotatorias Se distinguen muchas variedades:

- **Monofloral:** predominio del néctar de una especie. Las más usuales son de castaño, romero, Ulmo, tomillo, brezo, naranjo o azahar, tilo, acacia, eucalipto, lavanda o cantueso, zarzamora, alfalfa, etcétera.
- **Multifloral:** del néctar de varias especies vegetales diferentes, y en proporciones muy variables.

- **Mieles de Mielada:** Estas mieles no proceden del néctar de flores, sino de secreciones o exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes sobre ellas por la acción de

ciertos insectos. Se denominan como miel de bosque o con el calificativo de la especie de origen (miel de encina, abeto, etc.). A diferencia de las mieles de néctar de flores son dextrorrotatorias.



Figura 1. Abejas dentro del panal.⁶



Figura 2. Abejas libando néctar.⁶

1.3. La miel como alimento humano

Desde hace algunos años se ha planteado el uso de la miel como bioindicador, pero como alimento los seres humanos la conocen y consumen, según los antropólogos, desde hace unos 200.000 años. Durante milenios fue la única fuente de obtención de edulcorantes. Para las primeras civilizaciones la miel era una especie de milagro: “La miel cae del cielo, principalmente al salir las estrellas”, escribe Aristóteles. Y anteriormente, los egipcios pensaban que ésta procedía de las lágrimas del dios Ra y que las abejas se limitaban a recogerla.¹³

Por su constitución, rica en hidratos de carbono, la miel es un alimento altamente energético, que además aporta a la dieta minerales y vitaminas. Por esta razón, desde los tiempos más remotos viene siendo recomendada para el tratamiento de ciertas dolencias, ya que, sus constituyentes le confieren innegables propiedades medicinales y dietéticas (cardiotónicas, digestivas, diuréticas, laxantes).¹³

1.4. La cosecha de la miel

Los apicultores consideran lista para la cosecha la miel cuando está sellada con una capa de cera. La miel en este estado es pura y perfecta, ya sea que se encuentre en un panal

silvestre, una colmena cuidada o en una colmena industrial más sofisticada. Es fundamental preservar la pureza de la miel durante las actividades de cosecha y transformación a pesar del riesgo de contaminación, recalentamiento o sobre-filtración. Esto significa que los apicultores rurales, usando materiales sencillos, pueden producir miel de alta calidad. Si los apicultores están trabajando en lugares remotos, lejos de caminos e industrias, la miel puede ser certificada como de origen orgánico para demandar un precio de primera. La transformación de la miel en pequeña escala necesita los mismos materiales utilizados en otras formas de elaboración de alimentos: marmitas, tazas, coladores o filtros de tela y envases.¹³

1.5. Propiedades y aspectos nutricionales

La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente fructosa y glucosa además de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas derivadas de la recolección. El color de la miel varía de casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, o total o parcialmente cristalizada. El sabor y el aroma varían, pero derivan de la planta de origen.³ Como producto natural, la composición de la miel es altamente variable.

1.5.1. Composición química de la miel

La miel es una solución sobresaturada de fructosa y glucosa que contiene otros carbohidratos en menor proporción como sacarosa, disacáridos reductores, oligosacáridos, dextrinas y otros componentes tales como, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, sustancias minerales y varias enzimas.

La **Tabla 1**. Muestra la composición química de la miel resultante del promedio de análisis efectuados sobre diferentes tipos de mieles.

A. Azúcares: Son los componentes mayoritarios de la miel. Representan aproximadamente el 80% de los componentes totales y el 95% al 99% de los sólidos totales. En consecuencia son responsables de las propiedades fisicoquímicas de la misma tales como viscosidad,

higroscopicidad, poder rotario, propiedades térmicas, etc. Además las propiedades antibacterianas dependen de su concentración ⁶

Los azúcares mayoritarios son fructosa y glucosa resultantes de la hidrólisis de la sacarosa del néctar por acción de la invertasa de las abejas. La sacarosa es el principal disacárido no reductor.⁶

Tabla 1. Composición química promedio de la miel de abejas.⁸

COMPONENTES MIEL	PROMEDIO
Agua	17.1 g
Carbohidratos (Totales)	82.4 g
Fructosa	38.5 g
Glucosa	31.0g
Maltosa	7.20 g
Sucrosa	1.50 g
Proteínas y Vitaminas	0.50 g
Energía	304 Kcal
Grasas (Lípidos)	0.0 g
Colesterol	0.0 g
Vitaminas	100 mg
Tiamina	< 0.00 mg
Riboflavina	<0.06 mg
Niacina	<0.36 mg
Acido pantoténico	<0.11 mg
Piridoxina (B6)	<0.32
Ácido ascórbico	2.2-2.4 mg
Minerales	100 mg
Calcio	4.4-9 - 20 mg
Cobre	0.003 - 0.10 mg
Fierro	0.06 – 1.5 mg
Magnesio	1.2 – 3.5 mg
Manganeso	0.02 – 0.4 mg
Fósforo	1.9 – 6.30 mg
Potasio	13.2 – 16.8 mg
Humedad	17.20%
pH	3.91
Acidez Libre	22.03 meq/ kg
Lactona	7.11 meq/ kg
Acidez Total	29.12 meq/kg
Cenizas	0.17%
Nitrógeno Total	0.04%
Índice de Diastasa	20.80

B. Agua: El contenido en agua de la miel deberá ser de un 20% como máximo, según lo establecido por el C.A.A. La miel es higroscópica, debido a su baja actividad de agua con respecto al medio ambiente ($a_w = 0.55$), tiene gran tendencia a captar agua.⁶

El contenido de agua es uno de los parámetros más importantes porque influye en el peso específico, viscosidad, sabor, y condiciona por ello la conservación, palatabilidad, solubilidad y en definitiva el valor comercial. Cuando el contenido en agua es superior al 20%, la miel puede fermentar, cambiar el olor, sabor y aumentar la tendencia a cristalizar. Cuando la humedad es inferior al 15%, la miel tiene una viscosidad demasiado elevada lo cual dificulta su manejo durante la comercialización y puede ocasionar la cristalización de la misma en una masa excesivamente dura.⁶

C. Ácidos: La elevada acidez de la miel contribuye en gran medida a su flavor característico y puede ser responsable de sus propiedades antisépticas y estabilidad contra el desarrollo microbiano. El pH medio de la miel es 3,92 (**Tabla 1**) con un rango de 3,42 a 6,2.⁶

El principal ácido es el glucónico, que se forma por acción de la glucosa oxídasa (de la abeja) sobre la glucosa. Se supone que este ácido se genera a partir del néctar por acción de las abejas, durante el proceso de transformación del néctar a miel.⁶

D. Sustancias Minerales: Las proporciones varían según el origen floral y geográfico. Existe una cierta correlación entre el contenido de sustancias minerales y el color: en general cuanto más oscura es una miel, mayor es su contenido en sales minerales. Esta posee la mayoría de los elementos minerales esenciales para el organismo humano.

E. Proteínas y Aminoácidos: el porcentaje de proteínas y aminoácidos en miel son bajos.⁶

F. Enzimas: Las enzimas presentes en la miel, de mayor interés por sus aplicaciones en la industria alimentaria y su efecto en las características organolépticas y fisicoquímicas de la misma son: amilasa, invertasa y glucosa oxidasa. Otras enzimas presentes son la catalasa y fosfatasa acida.⁶

- **Invertasa:** Esta enzima es incorporada al néctar por la abeja y es la responsable de la transformación de la sacarosa (presente en el néctar) a fructosa y glucosa durante el proceso de elaboración y maduración de la miel dentro de los panales. La cantidad presente después de la recolección y procesamiento de la miel es pequeña, ya que se inactiva casi totalmente por calentamiento durante 10 minutos.
- **Amilasa:** La importancia de esta enzima reside en que su presencia en la miel es considerada como un índice de calidad. En efecto, debido a que esta enzima es muy estable al calor, la cantidad presente en la miel indica el tratamiento térmico al que ha sido sometida la miel. Así el *CODEX ALIMENTARIUS* incluye su determinación como un estándar de calidad. El origen de la misma no está claro, algunos dicen que proviene del néctar, otros de la abeja y otros del polen.
- **Glucosa oxidasa:** La glucosa oxidasa presente en las glándulas de las abejas es la responsable en gran medida de la acidez de la miel. En efecto, por acción de la misma sobre la glucosa presente en el néctar se produce ácido glucónico y pequeñas cantidades de H_2O_2 que contribuyen junto con la baja actividad del agua la preservación de la miel. La actividad de la misma cesa cuando la miel alcanza su máxima viscosidad durante el proceso de transformación del néctar en miel. La presencia del H_2O_2 explica las propiedades bactericidas de la miel.
- **Catalasa:** Se encuentra en muy pequeñas cantidades y proviene de la glándula de la abeja. Produce la descomposición del peróxido de hidrógeno (producida por la glucosa oxidasa) en H_2O y O_2 . Esto explicaría las cantidades variables de H_2O_2 encontradas entre diferentes mieles y su correspondiente actividad bacteriostática.
- **Fosfatasa ácida:** La principal fuente de la fosfatasa en la miel es el polen y podría ser la responsable de la presencia de fósforo inorgánico en la miel.

G. Vitaminas: Proviene del néctar y polen. Se encuentran presentes en muy pequeña proporción, dependiendo, la cantidad y calidad del origen floral de la miel. La B y la C son las que se encuentran en mayor proporción, aunque también se han detectado pequeñas cantidades de vitamina A, E, D, y K.⁶

H. Polen: parte de contenido celular de los granos de polen (aminoácidos, enzimas y pigmentos) pueden atravesar la pared celular enriqueciendo la composición de la miel.⁶

1.6. Componentes que influencia la calidad de la miel de abejas

La miel vendida como tal no deberá contener ningún ingrediente adicional, incluidos los aditivos alimentarios, ni tampoco adición alguna que no sea miel. La miel no deberá contener ninguna materia, sabor, aroma o mancha objetables que hayan sido absorbidas en materias extrañas durante su procesamiento y almacenamiento. La miel no deberá haber comenzado a fermentar o producir efervescencia. No se podrá extraer polen ni ningún constituyente particular de la miel excepto cuando sea imposible evitarlo para garantizar la ausencia de materias extrañas, inorgánicas u orgánicas.⁵

1.6.1. Metales pesados

La miel estará exenta de metales pesados en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud humana según el *CODEX ALIMENTARIUS*, pero como se conoce en estos tiempos no hay nada exento de plomo, por lo que este trabajo se ajusta a los niveles máximos permisibles para metales pesados determinados por el reglamento técnico de la MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos (Derogación de la RES.GMC N°102/94 y N° 35/96) la miel de abejas tiene como límite máximo permisible de plomo 0.3 ppm (mg/kg).⁹

1.6.2. Residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios

Actualmente en el Perú, DIGESA ha establecido criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad que deben cumplir los alimentos y bebidas en estado natural, elaborados o procesados, para ser considerados aptos para el consumo humano. La verificación de su cumplimiento está a cargo de los organismos competentes en vigilancia sanitaria de alimentos y bebidas a nivel nacional. Dichos criterios fueron promulgados según Resolución Ministerial N° 591-2008-SA/DM del Ministerio de Salud.¹⁰

1.7. METALES PESADOS

Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0.1% y casi siempre menor del 0.01%. Junto a estos metales pesados hay otros elementos químicos que aunque son metales ligeros o no metales se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; este caso del As, B, Ba y Se.¹¹

Dentro de los metales hay dos grupos:

- A) Oligoelementos o micronutrientes, que son los requeridos en pequeñas cantidades traza por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasando cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: As, B, Co, Cr, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- B) Metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva a disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son, principalmente: Cd, Hg, Cu, Ni, Sb, Bi.

Los metales pesados sin función incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación; pueden ser absorbidos por las plantas y ahí incorporarse a las cadenas tróficas, pueden pasar a la atmósfera por volatilización y pueden movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas.¹¹

1.7.1. Plomo

El plomo está presente naturalmente en la corteza de la tierra en pequeñas concentraciones, pero durante siglos se ha extraído y difundido en todo el entorno, desde donde gradualmente se ha ido incorporando en el tejido estructural de las plantas, los

animales y los seres humanos.¹⁴ El plomo es un metal pesado que no juega ningún papel en la fisiología humana, por lo que el nivel plasmático ideal debería ser cero. En la actualidad es prácticamente imposible encontrar alguna persona en la que no se detecten niveles de plomo en sangre.¹⁵

La evidencia del uso de plomo se remonta a casi 6000 años, y síntomas de saturnismo fueron reconocidos por los médicos egipcios, griegos y romanos. Por ejemplo, en el 370 Bc Hipócrates describió un ataque severo de cólico en un hombre extractor de metales, Plinio reportó casos de envenenamiento por plomo entre los años 23 y 79 AD. Incluso la caída del Imperio Romano se ha atribuido a la intoxicación crónica por plomo. En la historia más reciente, en 1831 Thackrah asoció el envenenamiento por plomo con “La enfermedad del minero”, descrito por primera vez por Paracelso en el siglo XVI y apoyada posteriormente por un estudio contemporáneo de la mala salud de los mineros en Derbyshire en 1857. Si bien los casos de intoxicación directa industrial han sido en gran parte controlados, el grado de contaminación por plomo en todo el mundo ha aumentado enormemente en los últimos 60 años.

A nivel mundial, aproximadamente 4,5 millones de toneladas de plomo refinado se consumen cada año. Se ha encontrado en el aire urbano, los estudios han demostrado que la contaminación con plomo de los hielos polares y remotas aguas oceánicas también han aumentado más de 400 veces. El grado de contaminación por plomo es tan alto que la media occidental ha mostrado una carga corporal total de plomo de 500-1000 veces mayor que el nivel “natural” de fondo encontrados por el hombre pre-tecnológico. Cabe señalar, sin embargo, que un estudio ha concluido que los niveles de plomo en el medio ambiente (y humano) se han reducido desde finales de 1960.¹⁴

A. Fuentes de exposición al plomo

Este metal existe en forma inorgánica y orgánica. La forma inorgánica puede encontrarse en las pinturas, tierra, polvo y en otros productos de manufactura. Los gases de la combustión de la gasolina, a la que se le ha agregado plomo, contiene la forma orgánica del metal (plomo tetraetilo); nuestro cuerpo absorbe esta forma más fácilmente, por lo que resulta más tóxica que la forma inorgánica.¹⁶

La exposición ambiental al plomo es un problema detectado hace décadas, principalmente en sectores urbanos o rurales cercanos a fundiciones o mineras, con contaminación geológica del suelo o aguas en ciudades con alta contaminación por combustión de gasolina con aditivos de plomo, entre otros. La exposición ocupacional al plomo se produce en actividades de minería, fundiciones, fabricación y empleo de pinturas, baterías, tuberías, plaguicidas, envases con soldaduras de plomo, así como en la industria del cable, del plástico, vajillas, cerámicas, del vidrio y del cristal. La exposición doméstica se produce por la ingestión de pinturas con aditivos de plomo, el empleo de cañerías con plomo o por ingesta de alimentos ácidos (jugos de frutas y vegetales) que liberan dióxido de plomo de los esmaltes de recipientes de cerámica. Los cigarrillos, juguetes para niños, loncheras de vinilo y joyería son otras fuentes de exposición.¹⁷

La dieta es una importante fuente de exposición al plomo. Un adulto sano expuesto al plomo ingiere diariamente de 0.3 a 0.5 mg de este metal, el 80% del mismo es eliminado por el riñón. Si la ingesta es superior a 0.6 mg/día, el plomo se acumula y puede provocar una intoxicación. Por consiguiente los contenidos máximos deben de ser lo más bajos posibles.¹⁸

En áreas rurales, los niveles de plomo en el aire son del orden de $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de plomo y ocasionalmente pueden ser mucho mayores. Es el uso de plomo como aditivo antidetonante (tetraetilpentil) en las gasolinas lo que más ha contribuido a la acumulación de este metal en el medio ambiente. El plomo procedente de las gasolinas supone el 76% de las emisiones de este metal a la atmósfera.¹⁸

B. Toxocinética

La acumulación de plomo en los organismos hace que la exposición a dosis bajas a largo plazo en el medio laboral o a través del aire, agua o alimentos, dé lugar a la expresión de una toxicidad crónica. Partiendo de que la exposición a una cierta concentración de plomo es inevitable, se considera que la concentración sanguínea en la población no especialmente expuesta, es de $10 \mu\text{g}/\text{dL}$ como máximo, y que el nivel a partir del cual hay que tomar medidas en los niños es de $10-14 \mu\text{g}/\text{dL}$.¹⁷

El plomo penetra en el organismo por tres vías: respiratoria, digestiva y cutánea, siendo esta última de escasa entidad. El plomo que atraviesa la piel pasa a través de los folículos pilosos y glándulas sebáceas y sudoríparas directamente al torrente sanguíneo. En la especie humana la absorción de plomo por vía inhalatoria es mínima en comparación con la vía digestiva. En el caso de penetrar por la vía respiratoria se combina con proteínas o con el CO₂ espirado, formándose PbCO₃ soluble. Por vía respiratoria, la más importante en el medio laboral., se llega a absorber el 40% del plomo, parte de este plomo se fija a la saliva y se traga. Respecto a la absorción digestiva, mientras los adultos absorben el 10% , los niños absorben hasta el 50% del Pb ingerido.¹⁸

Tras ser absorbido, el plomo en el organismo sigue un modelo tricompartmental:

- a) El sanguíneo (el 2% del contenido total ,cuya vida media es de 36±5 días)
- b) El de los tejidos blandos (cuya vida media es algo más prolongada)
- c) El óseo (que representa el 90% del contenido total con una vida entre 10 y 28 años)

El proceso metabólico de plomo en el ser humano como se muestra en la **Figura 3** , el plomo circula unido en un 95-99% transportado por los hematíes, unido a la Hemoglobina y otros compuestos .Se distribuye desigualmente en los tejidos; cerca del 10% del plomo es almacenado en los tejidos blando, conteniendo el tejido óseo el restante 90%. En el hueso el plomo es incorporado a los cristales de hidroxapatita, de los cuales puede ser utilizado lentamente. Si las concentraciones de plomo en sangre son elevadas, el almacenamiento en huesos se ve favorecido, pudiendo acumularse un 94% del plomo absorbido. Se excreta fundamentalmente por orina (80%) y de forma secundaria por heces y saliva. En el caso de baja exposición al plomo, existe un equilibrio entre el aporte del tóxico y la eliminación. Pero pasado un cierto nivel, comienza a acumularse. Este nivel depende no solo del grado de exposición, sino también de la edad y de la integridad de algunos órganos como el hígado y el riñón. La semivida del plomo circulante es de unos 25 días, la del plomo de los tejidos blandos de unos 40 días y la del plomo depositado en los huesos pueden ser hasta de 30 años. Por ello el plomo en el hueso puede ser utilizado para describir, en el tiempo, el contenido corporal del mismo.¹⁸

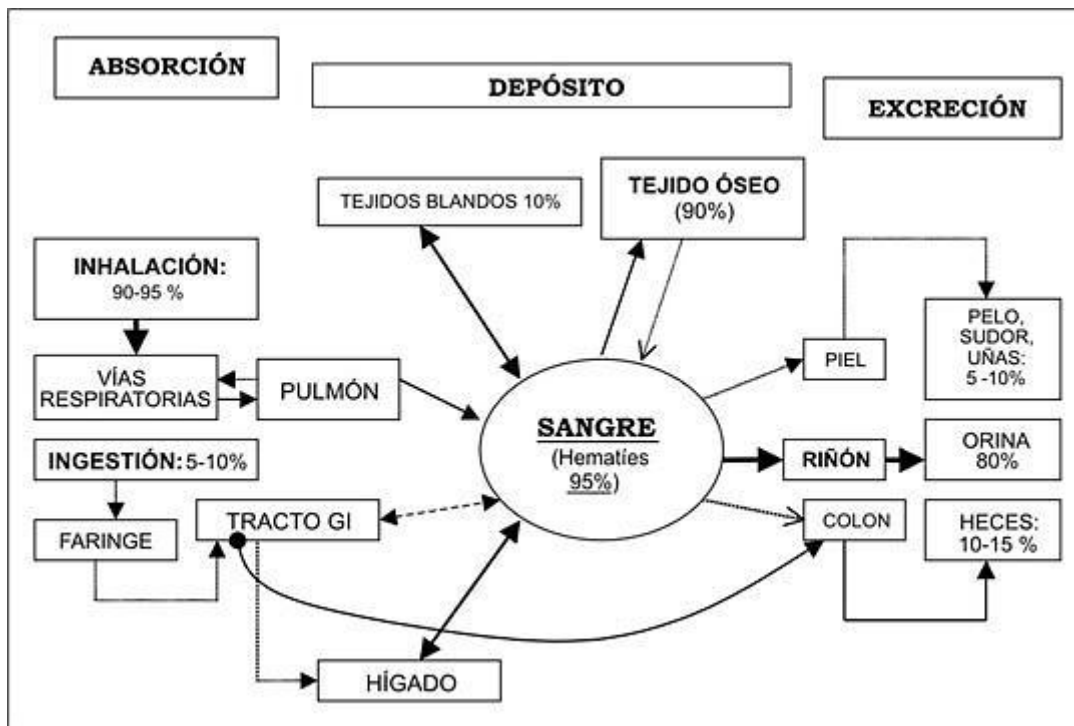


Figura 3. Modelo metabólico del plomo en el ser humano, extraído del cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo, pág.57.

C. Síntomas de toxicidad por plomo

Los síntomas clásicos de la toxicidad del plomo por lo general se correlacionan con las concentraciones de plomo en sangre, de 25 -50 $\mu\text{g/dL}$ niños y 40 a 60 $\mu\text{g/dL}$ en adultos. Los síntomas gastrointestinales son muy comunes en la toxicidad del plomo, pero puede ser engañoso en ausencia de una exposición sospechosa. Cólicos y estreñimiento son los síntomas más comunes y pueden ser atribuibles a la disminución de la liberación de acetilcolina preganglionar y a la inhibición Na^+ , K^+ -ATPasa intestinal resultando en anomalías del flujo de agua. Además se presenta dolor de cabeza, agitación y disminución de la actividad de los cambios de estupor y en intoxicaciones severas, convulsiones. Los adultos expuestos al plomo presentan los mismos tipos de síntomas neurológicos que los niños, sólo que a niveles más altos de plomo en sangre.¹⁹

Debido a su afinidad por varios grupos funcionales, particularmente grupos sulfhidrilos, el plomo inhibe tres enzimas importantes en la síntesis del grupo hemo: ácido δ -aminolevulínico, coproporfirinógeno, y ferroquelatasa, la intoxicación por plomo se caracteriza por una anemia microcítica o normocítica hipocrómica con reticulocitosis que

pueden estar asociados a bajos niveles de hierro. La anemia inducida por plomo se hace evidente cuando el nivel de plomo en la sangre sigue siendo significativamente elevado durante períodos prolongados de tiempo. La exposición crónica disminuye tanto la biosíntesis del grupo hemo y la supervivencia de los glóbulos rojos. Exposiciones agudas a altos niveles de plomo también puede causar anemia hemolítica.¹⁹

Los signos característicos de la toxicidad crónica por plomo disminuyen la condición nerviosa, lo que provoca una neuropatía periférica y debilidad del extensor del antebrazo, provocando caída de la muñeca. La neuropatía periférica es el efecto más común reportado en la exposición ocupacional a plomo y puede ser mal diagnosticada como síndrome del túnel carpiano, siendo más común en adultos que en niños.¹⁹

D. La problemática del plomo en el Perú

En el Perú, la calidad ambiental es un factor que afecta de manera considerable el estado general de salud y el bienestar de la población. En la **Figura 4** se indican las causas determinantes del impacto adverso sobre la salud. Se estima que el costo de los daños ambientales en el Perú alcanza un poco más de 8 mil millones de nuevos soles anuales, equivalentes a casi 4 por ciento del PBI del país en 2003. Más de 70 por ciento de este costo estimado es decir, 6 mil millones de nuevos soles anuales se atribuyen a los costos causados a la salud por los problemas ambientales, y la exposición a la contaminación por plomo representa un mil millones de nuevos soles.²⁰ La utilización de gasolina con alto contenido de plomo es la principal vía para el envenenamiento por ese metal. En la década de 1990 se encontraron en el Perú concentraciones importantes de plomo, habitualmente del orden de 0.75 g/L, en la gasolina. En el mismo período se registraron también elevados niveles de plomo en la atmósfera. Concretamente, en 1993 el Ministerio de Salud informó que la concentración media mensual de plomo en la atmósfera estaba comprendida entre 1.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y 2.18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, y como se sabe los niveles máximos permisibles para el plomo en aire el Perú son de 1.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ mensual y 0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ anual según los Estándares Nacionales de Calidad de Aire, D.S. N° 074-2001.PC y en el valor de tránsito anual es de 1.0 anual según D.S. N° 069-2003-PCM.²¹

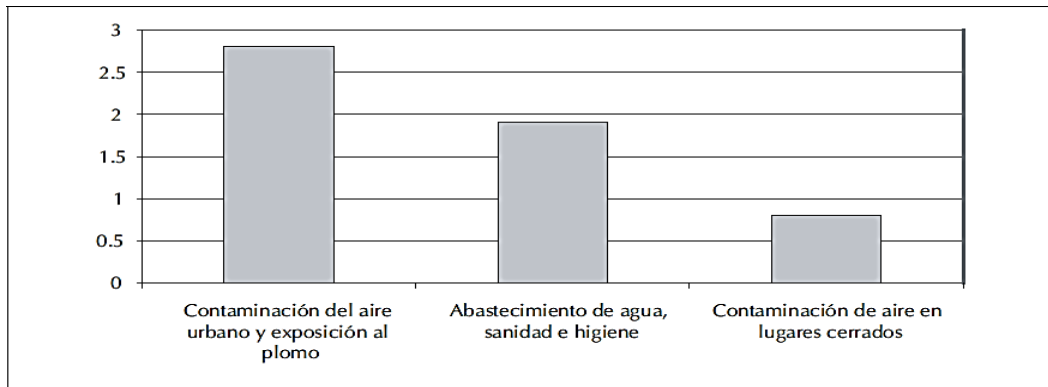


Figura 4. Costo de los daños relacionados con la salud ambiental en el Perú (Miles de millones de Nuevos soles anuales).extraído de “República del Perú: Análisis Ambiental del Perú: Retos para un desarrollo sostenible”

Según la OMS, en regiones en desarrollo el 25% de la carga de mortalidad eran atribuibles a actores ambientales y ocupacionales, mientras que en regiones desarrolladas sólo el 17% se atribuye a estas causas. Las enfermedades con la mayor carga absoluta atribuible a estos factores son la diarrea, las infecciones de las vías respiratorias inferiores, las lesiones accidentales, la malaria, el retraso mental causado por plomo, etc.²²

En respuesta, el Gobierno del Perú aprobó una estrategia para suprimir gradualmente la gasolina con plomo, y dio pasos encomiables para eliminar el uso de la gasolina de aditivos que contuvieran plomo, con efectos a partir del 1 de enero de 2005. A pesar de la disminución de las concentraciones de plomo en la atmósfera conseguida hasta la fecha gracias a las citadas iniciativas del Gobierno, es necesario abordar la contaminación por plomo procedente de fuentes todavía activas, como las industrias de fundición o de fuentes difusas como el transporte y el almacenamiento de plomo en las ciudades. Además, como el plomo tiende a acumularse en la sangre con el tiempo, el organismo mantiene depósitos sustanciales de este metal.²³

1.7.2. Metales en alimentos

El aumento intenso y constante de las actividades antropógenas e industriales han favorecido la emisión de sustancias contaminantes hacia ecosistemas, los cuales están íntimamente relacionados con las especies animales, en particular, las domésticas, incluyendo al hombre, lo que facilita la entrada de dichas sustancias tóxicas en la cadena

trófica. El contenido residual de algunos elementos en la miel de abeja es un importante indicador directo del grado de contaminación.

Son muchos los ejemplos de elevados niveles de plomo, cadmio, mercurio y otros metales en zonas de amplia actividad siderúrgica, en las proximidades de centrales térmicas de carbón, en zonas de gran extracción minera²¹, en las proximidades de autopistas y vías con gran afluencia de vehículos, así como en ciudades con gran concentración de automóviles.

Las abejas exploran áreas de unos 7 Km² para recolectar elementos vitales para el desarrollo de su colonia (agua, propóleos, polen, néctar y mielatos) y por consiguiente los productos de la colonia se pueden relacionar con la contaminación local.¹

Existen cuatro vías de entrada de contaminantes a la colonia: el cuerpo y aparato bucal de la abeja; el néctar; la ventilación de la propia colmena; las prácticas del apicultor sanitarias, sus manipulaciones, materiales en contacto con la miel, etc.¹

Sin embargo, la mayoría de la contaminación por plomo en los alimentos es causada directamente por el desprendimiento de partículas de plomo presentes en el aire procedentes de las emisiones de la gasolina. La naturaleza ha proporcionado barreras naturales en las raíces de los cultivos alimentarios, que impiden en gran medida la absorción de plomo que se encuentra en el suelo. Sin embargo, el plomo transmitido al aire por lluvia radiactiva es especialmente peligroso porque pasa por alto estas barreras naturales.

En consecuencia, los cultivos agrícolas que se encuentran cerca de carreteras con mucho tráfico pesado, o cerca de fuentes estacionarias de plomo, tienen concentraciones significativamente más altas de plomo depositado en ellos; el plomo parece tener una afinidad particular por el tejido superficial de la planta y es parcialmente removido por la lluvia o el lavado. El consumo de frutas o verduras contaminadas así como la carne de animales de granja que pastaban en la hierba contaminada, puede resultar en una carga corporal considerable de plomo.

Es así que diversos metales entre los que se encuentran el plomo, podrían estar llegando a alimentos tan comunes en la mesa como la miel de abejas por varias vías como ya se ha expuesto.

1.8. VOLTAMPEROMETRÍA

1.8.1. Introducción

Voltamperometría y Polarografía son nombres de métodos analíticos basados en la respuesta corriente-potencial en celdas electrolíticas. La señal analítica es la corriente, normalmente corriente de Faraday, la cual fluye en la celda durante la reacción del analito en el electrodo de trabajo. El analito puede ser un catión, anión o molécula.

El fundador de estos métodos, Jaroslav Heyroský (1890-1967 premio Nobel en Química 1959) introdujo el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo. Electrodo consiste en un capilar de vidrio de paredes gruesas del cual las gotas de mercurio caen en la solución de la muestra bajo la presión de una columna de mercurio, además introdujo el término de polagrafía.

El termino voltamperometría resulta de volt-am(perios)-metry y no debe ser confundido con voltametría (con una sola m) el cual es descrito como una valoraciónpotenciométrica con corriente controlada.

Los términos polarografía y voltamperometría son frecuentemente usados inadecuadamente. De acuerdo a la IUPAC, el término polarografía debe ser usado cuando la curva de la corriente en función del potencial es graficada empleando un electrodo de trabajo con un líquido, del cual la superficie puede ser renovada periódica o continuamente (ej. Gotas). Esto incluye el clásico electrodo de goteo de mercurio (DME) y el subsecuente electrodo de gota de mercurio estática (SMDE).

La voltamperometría incluye todos los métodos en el cual la medición de potencial de la corriente está hecha de un electrodo fijo y estacionario. Esto incluye el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), el electrodo de capa fina de mercurio (TMFE), electrodo de glassy carbón (GCE) y electrodo de pasta de carbón (CPE). Los electrodos de

trabajo hechos de metales nobles (oro, platino) son usados menos frecuentemente. Varios métodos son atribuidos a los términos de polarografía y voltamperometría; estos difieren en la técnica de medición y el tipo de potencial eléctrico de excitación usado en el proceso de la determinación.²⁵

1.8.2. Instrumentación en voltamperometría

El sistema voltamperométrico en la **Figura N° 5** consiste en una fuente de voltaje, un porta electrodos con los electrodos y la celda electroquímica, y una unidad de registro de la corriente.²⁶ Aunque los primeros métodos voltamperométricos hacían uso de sólo dos electrodos, la voltamperometría moderna hace uso de tres electrodos sumergidos en una solución que contiene analito y un exceso de un electrolito de soporte.²⁷

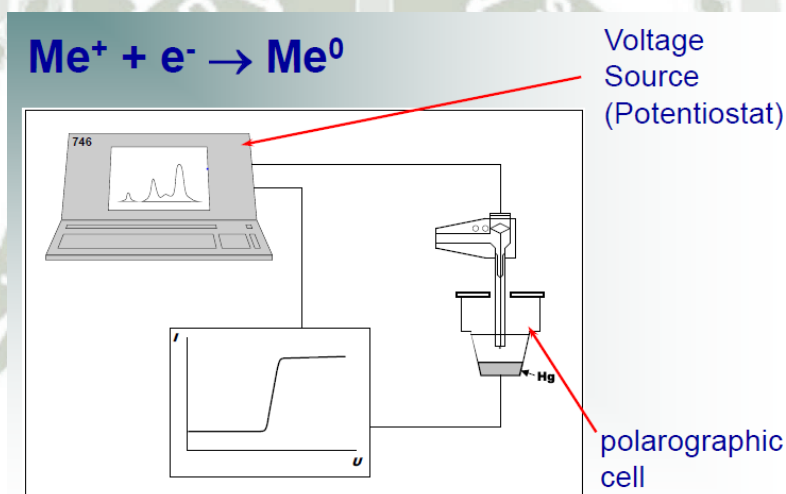


Figura 5. Instrumentación en voltamperometría

- El electrodo de trabajo (WE), el más importante del sistema electroquímico, su potencial varía de manera lineal con el tiempo, existen dos tipos el MME (electrodo multimodo) que incluye todos los tipos de electrodos de mercurio (DME, SMDE, HMDE) y el RDE para aplicaciones especiales.
- El electrodo de referencia (RE): que ofrece un potencial estable. Los potenciales en el WE se aplican con respecto al potencial de referencia constante. Hoy en día se utiliza principalmente sistemas de Ag/AgCl.

- El tercer electrodo es el electrodo auxiliar (AE): La corriente fluye entre el trabajo y electrodo auxiliar. Existen dos tipos disponibles: Platino (Pt) y Carbón vítreo (GC).^{26,27}

En voltametría se han empleado mucho los electrodos de mercurio, por varias razones una de ellas es por el potencial negativo relativamente grande que se puede lograr con el mercurio, debido al alto sobrevoltaje del hidrógeno sobre el mercurio. Este sobrevoltaje permite la determinación de metales que se reducen con potenciales negativos, hasta amalgamar en la superficie de un electrodo de mercurio. Además, se forma rápidamente una superficie metálica fresca con una nueva gota de mercurio.²⁷

1.8.3. Principio de la Voltamperometría

La voltamperometría se basa (**Figura 6**) en la aplicación de una rampa de voltaje (a), al alcanzarse el potencial de reducción del metal este se reduce se disuelve en el mercurio del electrodo (b), esta reacción produce una corriente, que es medida (c). La corriente fluye cuando la sustancia es oxidada o reducida en el electrodo. Sin reacción electroquímica no existe corriente.²⁶

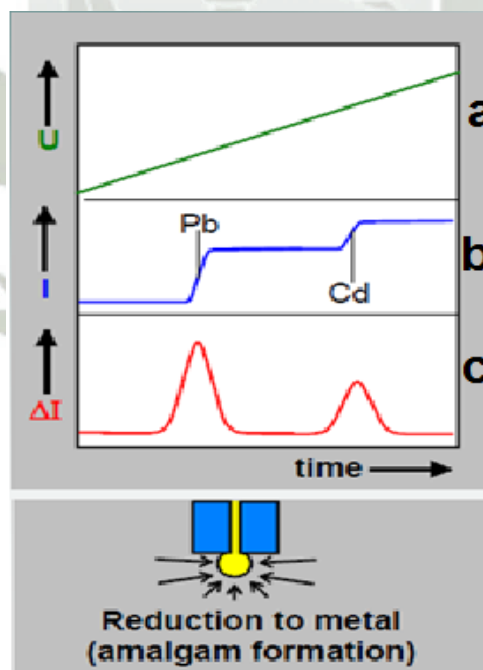


Figura 6. Principio de voltamperometría

1.8.4. Métodos Voltamperométricos

A. Voltamperometría barrido lineal (VBL)

El potencial aplicado (un barrido lineal) varía rápidamente (20-200 mV/seg) y toda la corriente es monitorizada directamente. La sensibilidad no es exactamente alta y algunas distorsiones en el resultado de las ondas pueden ser dificultades para el análisis cuantitativo.²⁶

B. Voltamperometría Directa Simple (DC)

La voltamperometría DC es la clásica, es la medición voltamperométrica más simple con una limitada sensibilidad, Es principalmente utilizado para la investigación de sistemas reversibles redox.²⁶

C. Voltamperometría de Onda Cuadrada (SqW)

La voltamperometría de onda cuadrada es principalmente adecuada para procesos reversibles. Es usada particularmente para voltamperometría de stripping sensitiva en el modo HMDE o RDE.²⁶

D. Voltamperometría de Pulso Diferencial

La voltamperometría de pulso diferencial, es una de las técnicas electroanalíticas que alcanzó una gran popularidad a partir de 1970. Es el modo de medición universal y más frecuentemente usado, es apropiado para sistemas reversibles e irreversibles y ofrece una alta sensibilidad. Para la voltamperometría PD, la corriente (i) es medida en función del voltaje (V) inmediatamente antes del pulso $t(I1)$ y al final del pulso $t(I2)$. De las diferencias entre las dos mediciones de corriente, los picos de la curva obtenidos son evaluados usando base lineal, polinomial, o exponencial.²⁷

E. Voltamperometría de Cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica es principalmente usada para investigar la reversibilidad del proceso de electrodo y para estudios cinéticos.²⁶

F. Voltamperometría de Redisolución

Una de las más importantes técnicas de voltamperometría cuantitativa es la voltamperometría de redisolución ya que proporciona los límites de detección más bajos para los metales (10^{-9} – 10^{-12}). Es decir, detecta iones metálicos con una exactitud razonable, en pocos minutos y en un margen de concentración como el antes expresado. Los métodos de redisolución están basados en el siguiente concepto: la sustancia a determinar se pre-concentra en el electrodo y posteriormente es devuelta a la disolución por un proceso inverso.^{25, 26,27}

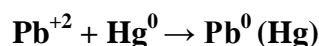
Gracias a la voltamperometría de redisolución se ha conseguido:

- Preconcentrar sustancias que antes no era posible al ser consideradas no electroactivas.
- Desarrollar métodos impulsionales, de onda cuadrada, voltamperometría de corriente alterna, las cuales permiten aumentar la sensibilidad de las determinaciones, pudiéndose llegar en algunos casos a determinar concentraciones de orden $\mu\text{g/dL}$, e incluso pg/mL .

Se compone de tres técnicas relacionadas: anódica, catódica y voltamperometría de adsorción. Ya que la voltamperometría de redisolución anódica ha encontrado la aplicación más amplia, la hemos considerado con mayor detalle.^{25, 26,27}

F.1. Etapa de pre-concentración:

Objetivo: Traspasar el analito de la disolución en que se encuentra al electrodo, es decir, a la gota de mercurio.



Pre-concentración mediante electrolisis.

Distintos aspectos influyen en esta primera etapa:

La sustancia, el analito, puede llegar al electrodo de tres maneras distintas: por migración (debido a atracciones electroestáticas), por difusión (debido al gradiente de concentración) y por convección (fuerzas mecánicas (agitación)). La temperatura, debe estar controlada, ya que, el coeficiente de difusión depende de ella. El tiempo, a medida que aumentamos el tiempo, la cantidad de analito depositado en el electrodo aumenta. Por otro lado la intensidad de corriente disminuye con el tiempo prácticamente constante tendremos que utilizar volúmenes grandes de disolución, superficies pequeñas de electrodo y tiempos de electrodeposición cortos.^{25, 26, 27}

F.2. Etapa de reposo:

En el proceso de reposo se detiene la agitación y se mantiene el potencial aplicado Necesitamos que el analito y el electrodo se homogenicen.

F.3. Etapa de medida:

Objetivo: Obtener desde el punto de vista analítico información acerca del depósito que tenemos.

Existen distintas técnicas y las más comunes es:

Barrido lineal de potencial con respecto al tiempo: Consiste en aplicar al electrodo un potencial cuya variación es una función lineal consistiría en que el potencial de electrodo se hace variar linealmente hacia potenciales más positivos, registrando la intensidad de la corriente.

En redisolución anódica, a medida que aumenta el potencial se produce un aumento de la intensidad, ya que, aumenta la velocidad de reacción.

En redisolución catódica ocurre lo contrario el potencial vería hacia valores más negativos. A partir de un determinado valor de potencial, la intensidad disminuye al igual que la concentración de sustancia electroactiva.^{25, 26, 27}

1.9. Preparación de muestras para análisis de metales

Los metales contenidos en muestras son determinados por una gran variedad de métodos electroanalíticos. Sin embargo, estos metales presentes en las muestras pueden encontrarse en pequeñas hechas que hace necesario pretratamiento de la muestra. La preparación del material para la determinación del metal sirve por varios propósitos, los cuales varían de acuerdo al tipo de muestra y de las demandas particulares del análisis.

Algunas de las mayores funciones de la preparación de la muestra son:

- a) Degradar y solubilizar la matriz para la liberación de los metales para su determinación.
- b) Extraer los metales de la matriz en un solvente más apropiado para el método analítico a usar.
- c) Concentrar los metales presentes a muy baja concentración para llevarlo a una concentración más apropiada para el análisis.
- d) Separar un analito de un grupo de analitos de otras especies que puedan estar interfiriendo en el análisis.
- e) Diluir la matriz para el efecto de la matriz sea constante y medible
- f) Separar diferentes formas químicas del analito para el análisis individual de las especies presentes.²⁶

Los métodos de digestión deben ser seleccionados de acuerdo al tipo de muestra, el metal a ser determinado y finalmente al método analítico, los más comunes son digestión húmeda en soluciones ácidas, digestión seca y extracción del analito de la muestra sin destrucción total de la matriz. La calcinación seca es útil para muchas muestras como alimentos o muestras botánicas, debido a la rápida y fácil destrucción de grandes

cantidades de materia orgánica húmeda; sin embargo si el analito (metal) está presente en forma volátil por ejemplo el metilmercurio la calcinación en seco puede causar la pérdida del analito. Muchas matrices de muestras tanto orgánicas como inorgánicas pueden ser disueltas por calentamiento en una solución oxidante ácida. Otras muestras pueden ser tratadas por extracción de los metales de la matriz. Este método es frecuentemente usado para las muestras de aguas, donde un agente quelante puede ser usado para acomplejar el metal de interés, estableciendo su fácil separación de la matriz acuosa.²⁸

1.9.1. Métodos de digestión húmeda

Los métodos comunes usados para disolver muestras para el análisis de metales son la digestión en envase cerrado, digestión en envase sellado y presurizado, y descomposición asistida con microondas. Los solventes más comunes usados se encuentran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Reactivos comúnmente usados en la digestión/ disolución de muestras.²⁸

Reactivo	Tipo de muestra
Agua	Sales Solubles
Ácidos diluidos	Residuos de cenizas secas, metales y aleaciones fácilmente oxidables, sales
Ácidos concentrados (HNO ₃)	Metales y aleaciones menos fácilmente oxidables, acero, óxidos de metales.
Ácidos concentrados con adición de agentes oxidantes.	Metales, aleaciones, suelos, partículas del aire, minerales refractarios, materia vegetal.
Ácido hidrofúorico	Silicatos u otras muestras de rocas.

Las muestras a ser analizadas para la determinación de metales son preparadas por digestión de la matriz en ácidos fuertes. En el caso de matrices orgánicas, se usa una mezcla de oxidantes para destruir la matriz orgánica entera y solubilizar la muestra. Comúnmente es usado el ácido nítrico, debido a que no hay posibilidad de formar sales insolubles como puede suceder con el HCl o H₂SO₄. El peróxido de hidrógeno puede ser añadido para incrementar el poder oxidante de la solución digestora. Sin embargo el

método no es generalmente recomendado para metales, los cuales tienden a ser perdidos por volatilización.²⁸

A. Digestión ácida

El método más simple para la digestión es llevada a un contenedor abierto. Las muestras son secadas, pesadas y colocadas en un vaso precipitado, el agente digestor es añadido, el beaker es cubierto con una luna de reloj y colocada en una base caliente, se calienta suavemente para prevenir las salpicaduras. El peróxido de hidrógeno puede ser añadido durante la digestión para ayudar en la oxidación de la materia orgánica: cuando la muestra ha sido digerida completamente, esta se evapora a sequedad y luego es diluida con un ácido para su análisis.²⁸

B. Digestión asistida por microondas

Este es un método atractivo, especialmente para muestras pequeñas. Se debe tener extremo cuidado en el uso de vasos cerrado a presión. La aplicabilidad de esta técnica es estrictamente dependiente del tipo de muestra, los carbohidratos son fácilmente mineralizados con ácido nítrico a 180 °C, mientras que las grasas, proteínas y aminoácidos presentan digestiones incompletas debido al relativo bajo potencial de oxidación del ácido nítrico a 200 °C, estos materiales requieren la adición de ácido sulfúrico o perclórico con todos los problemas relacionados a sus altas temperaturas y presiones.²⁹

La digestión de una muestra en un recipiente cerrado en un horno de microondas tiene varias ventajas sobre los métodos de envase abierto. Los contenedores están fabricados con polímeros resistentes a altas temperaturas a menudo policarbonatos o PTFE (politetrafluoroetileno, teflón) y que hace menos probable que contengan contaminantes metálicos que los vasos de vidrio, de cerámica o que los crisoles. El envase sellado elimina la posibilidad de contaminación por polvo en el aire. Los envases sellados, reducen la evaporación a presión, por lo que es necesaria menos solución ácida de digestión. El envase sellado también elimina las pérdidas de las especies metálicas volátiles, que se puede ser un problema en la descomposición de la muestra en un contenedor abierto, especialmente en calcinación en seca³⁰, una de las limitaciones es el tiempo requerido para

el enfriamiento antes de que el envase pueda ser abierto, lo cual puede tomar horas dependiendo del tipo de equipamiento usado. Existen dos diferentes sistemas disponibles para digestión asistida por microondas; Sistema de vaso cerrado a presión y sistema abierto fijo, que funcionan bajo presión atmosférica.²⁹

El sistema de digestión asistida por microondas se compone de un horno microondas, un carrusel giratorio con una o varias bombas de digestión de la muestra, y un sistema de ventilación de estos de manera controlada.²⁸

C. Digestión UV

El proceso de la oxidación fotoquímica UV representa una mejora prometedora para la descomposición de materia orgánica y, en cierta medida, también la materia inorgánica (polifosfatos, por ejemplo) antes del análisis.³¹ La digestión es esencial para la fiabilidad del análisis de trazas y ultratrazas en matrices de muestras naturales. Se utiliza para la preparación de la muestra en la espectroscopía, polarografía, la voltamperometría y cromatografía de iones para eliminar la matriz orgánica.³²

El instrumento ha sido diseñado para la digestión de muestras líquidas que contengan de bajas a moderadas concentraciones de material orgánico. La ventaja de la fotólisis UV es que solo una cantidad pequeña de peróxido de hidrógeno es necesaria y consecuentemente los valores de blanco se mantienen muy bajos.³²

La radiación UV disuelve los componentes de la matriz por la formación de especies oxidantes altamente reactivas (H_2O_2 , radicales hidroxilos, radicales halógenos), los cuales aceleran la descomposición de las sustancias interferentes; el peróxido de hidrógeno es usado como iniciador de la reacción y la energía radiante de la lámpara de mercurio es convertida en calor, la cual acelera la digestión.^{31, 32}

El sistema consta de una unidad de control con temporizador integrado y una parte separada con lámpara UV, equipo de refrigeración y racks de 12 tubos de digestión de la muestra con un volumen de muestra de máximo 12 ml cada uno.³²

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN DEL ANÁLISIS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación docente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María “Proyecto Mercurio” (H-202).

2.2. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Material Biológico

Se trabajó con muestras de miel de abejas provenientes de 15 puntos de muestreo, todos ubicados en los en los distritos de Yura, Uchumayo, Characato, Polobaya, Socabaya, Poci, Majes, Lluta, Atico, Cercado (Rivero), Cercado (Jerusalen), Yanaquihua, Cotahuasi, Socabaya y José Luis Bustamante y Rivero del departamento de Arequipa.



Figura 8. Muestras de miel del departamento de Arequipa

Material de Vidrio

- Embudo de vidrio.
- Fiolas clase A de 10 y 1000 mL.
- Probetas 500 mL.
- Termómetro.
- Tubos de cuarzo.

- Tubos de ensayo.
- Vasos de precipitados de 20, 50 y 100 mL.
- Pipetas volumétricas clase A de 500 μ L, 1, 5, 10 y 20 mL
- Pipetas Pasteur.
- Probeta de 20 mL.

Equipos y Accesorios de Laboratorio

- Balanza analítica Ohaus Pioneer Tm®
- Bomba de digestión Microondas Parr ®
- Equipo Barnstead®Easy Pure II (agua 18.2 M Ω)
- Estación Voltamperométrica (757 VA Computrace). Metrohm®.
- Horno microondas Electrolux EMZ172M1PW.
- Sistema de digestión UV 705 UV Digester Metrohm®
- Vaso de tapa PTFE y O-ring Parr®.
- Vortex mixer 230 Volt.

Reactivos:

- Ácido Nítrico 65 % Suprapur. Merck
- Ácido Acético Glacial. P.A. Merck
- Agua calidad ultrapura (18.2 M Ω)
- Cloruro de potasio P.A. Merck
- Estándar de plomo (1000 ppm) Merck.
- Estándar de cadmio (1000 ppm) Merck.
- Hidróxido de sodio 0.6 N P.A. Merck
- Nitrógeno UHP
- Peróxido de hidrogeno 30 % P.A. Merck

Otros materiales:

- Espátula.
- Guantes quirúrgicos.
- Tubos de plástico.

- Gradilla de tubos de ensayo.
- Micropipetas de 200, 1000 μL

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Recolección de las muestras:

El ámbito geográfico de muestreo se delimitó dentro de la ciudad de Arequipa tomándose muestras de 15 panales, cosechados en el mes de agosto.

Todas las muestras fueron recolectadas en envases de vidrio con tapas herméticas de material plástico, asegurando la protección de la muestra durante el transporte y manipulación.

2.3.2. Validación del equipo voltamperométrico:

Para validar el instrumento 757 VA Computrace de Metrohm, se utilizó la celda estándar incorporada en el equipo. La validación se efectuó en 2 partes expresas en el manual de metrohm 757 VA³³, una validación electrónica y una validación química.

Para la validación electrónica se procede de la siguiente manera:

A. Test de la linealidad

Unir los cables del electrodo del VA Computrace en los conectores de la celda estándar incluida en la estación Voltamétrica.

- Cable del electrodo auxiliar AE al Conector AE.
- Cable del electrodo de referencia RE al Conector RE.
- Cable del electrodo de trabajo WE al Conector WE-L.
- Cargar el método, Test 757_L del directorio de métodos e iniciar el método.
- Se registra una línea diagonal.

B. Test de desempeño del pico

Unir los cables del electrodo del VA Computrace en los conectores de la celda estándar incluida en la estación Voltamétrica.

- Cable del electrodo auxiliar AE al Conector AE.

- Cable del electrodo de referencia RE al Conector RE.
- Cable del electrodo de trabajo WE al Conector WE-L.
- Cargar el método, Test 757_L del directorio de métodos e iniciar el método.
- Se registra una curva y se analiza.

Para la validación química se procede de la siguiente manera:

- Añadir 20 mL de agua ultrapura en la celda electroquímica seguida de 0.5 mL del electrolito KCl (3M) en la celda electroquímica y 100 μ L de la solución estándar de ion Pb (1000 ppm) en la celda de medición.
- Cargar el método “Test Pb in ion standard solution. mth” desde el directorio métodos.
- Iniciar el método en modo DME.
- La solución es desgasificada y el voltagrama es registrado tres veces y aparece la ventana de adición manual estándar.
- Añadir 100 μ L de la solución estándar de Pb (1 g/L) en la celda de medición y presionar “OK”.
- El polarograma de la primera adición estándar es registrado tres veces.
- Añadir 100 μ L de la solución estándar de Pb (1 g/L) en la celda de medición y presionar “OK”.
- El polarograma de la segunda adición estándar es registrado tres veces.
- El reporte final y los voltagramas son impresos y analizados.

2.3.3. Validación del método para muestras biológicas

Para poder llevar a cabo la validación del método voltamperométrico en muestras biológicas se hizo uso del boletín de metrohm³⁴ validados por el laboratorio. Con la finalidad de obtener mejores resultados se optó por validar algunos parámetros como son: Linealidad, Precisión, Límite de detección y cuantificación.^{35, 36}

A. Linealidad

Establecida como la capacidad del método para poder proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Para evaluar la linealidad en voltamperometría es necesario evaluar la linealidad para la adición del estándar ya que es el método de calibración que se usara para la determinación. Para ello se colocó en la celda electroquímica el electrolito de soporte y se programó el software para adicionar 6 veces 25 μL de una solución estándar de plomo de concentración conocida de modo de cumplir la recomendación de examinar al menos 5 niveles de concentraciones, además se analizó por triplicado.

Con los resultados se preparó una tabla relacionando las concentraciones y sus respuestas. La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo:

$$y = a + bx$$

Si la recta no pasa cerca del origen de las coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado.

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesaria una comprobación estadística. Para realizar esta evaluación las formulas aplicadas fueron las siguientes:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{\sum X_i^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, X, la concentración y Y, el valor medido en el ensayo.

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{\sum X_i^2}{n}\right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{\sum Y_i^2}{n}\right)}}$$

El coeficiente de la correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable X y la variable Y . Su valor máximo es 1. Si es cercano a la unidad significa que existe la correlación con una probabilidad elevada. En la práctica, r es generalmente mayor de 0.99 y los valores menores de 0.90 son raros. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{1-r^2}$$

Si el valor observado de test mayor que t_{tabla} , la correlación es lineal significativa con la probabilidad calculada.

B. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio es conocer la variabilidad o el mas-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, etc.) de aquí a importancia del estudio de la precisión.

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

Para evaluar estos parámetros se realizaron:

- 3 mediciones en el voltamperímetro en las mismas condiciones operativas en un día cumpliendo con los requisitos para determinar la repetibilidad.
- Para evaluar la precisión intermedia se efectuaron 4 mediciones en las que se modificaron condiciones operativas como analista, equipo, reactivos y día de análisis.
- El parámetro de reproducibilidad no fue abarcado al no contar con algún otro laboratorio que contara con un voltamperímetro, por otro lado este parámetro no resulta obligatorio ya que solo es necesario en el caso de que se quiera transferir el método a otros laboratorios.

La precisión de un método se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV \% = \frac{S}{X} * 100$$

Donde:

S: Desviación Estándar

X: Media Aritmética

Además se recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiada.

Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

$$x \pm t * s$$

Donde:

x: media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t: valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y $\alpha = 0.05$

s: desviación estándar

La precisión estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real. En la **Tabla 3** se encuentran los valores aceptables de CV.

Tabla 3: Valores aceptables de CV según la AOAC ³⁷

Concentración	Coefficiente de variación (CV)
100%	1 %
10%	1.5 %
1%	2 %
0.1%	3 %
0.01%	4 %
10 µg/g (ppm)	6 %
1 µg/g	8 %
10µg/kg (ppb)	15 %

C. Límite de cuantificación (LC) y detección (LD)

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud, y por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cumple con precisión y exactitud.

Para su evaluación fue necesario:

- Determinar la pendiente de la curva de calibración ya examinada para el parámetro de la linealidad que será la que se extrapola.
- Se extrapolo a concentración cero la ecuación de la recta, obteniéndose como señal ruido la correspondiente al termino independiente, es decir Y_{bl} .
- Se construyó otra recta tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, considerándose que la desviación estándar de las respuestas S_{bl} corresponderá al valor de la ordenada de origen de esta recta.
- Se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las siguientes formulas:

Límite de detección (LD):

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} * \frac{1}{n}$$

Límite de cuantificación (LC):

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} * \frac{1}{n}$$

2.3.4. Métodos para la determinación de la concentración de plomo en miel de abeja

Para poder llevar a cabo la determinación de los niveles de plomo en miel de abeja fue necesario establecer el tipo de digestión a usar para muestras recolectadas, para lo cual, basándonos en revisión bibliográfica^{27, 38, 39}, se realizaron las pruebas de digestión ácida en envase cerrado asistido por microondas; por otro lado, se probó también con el método de digestión por fotólisis UV, en las 15 muestras a fin de comparar ambos métodos de digestión, con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico para determinar si existe diferencia significativa entre ambos métodos de digestión mencionados.

A. Muestras de miel con digestión fotólisis UV

A.1. Preparación de la muestra

Las muestras de miel fueron recolectadas durante el mes de Agosto del año 2012, una vez obtenidas fueron llevadas inmediatamente al laboratorio donde fueron procesadas. Las muestras de miel de un total de 15 distritos fueron extraídas y almacenadas, todas las muestras fueron recolectadas en envases de vidrio con tapa hermética, asegurando su conservación y protección durante el transporte y manipulación.

Para ello se tomó 50 mg de ellas y se depositaron en tubos de cuarzo previamente tarados (para mayor exactitud en el procedimiento se trabajó con el peso registrado por los 50 mg agregados), luego se le agregó 5 mL de agua ultrapura llevando cada tubo de cuarzo al vortex para diluir la muestra, finalmente se les agregó 100 µL de peróxido de hidrógeno y 100 µL de ácido nítrico.

A.2. Digestión de la muestra

La batería de tubos fue colocada en el sistema de digestión UV, el temporizador fue programado para 90 minutos de digestión y se encendió el equipo; la temperatura fue controlada durante el proceso para no sobrepasar los 90°C como se observa en la **Figura 8**.



Figura 8. Digestión UV

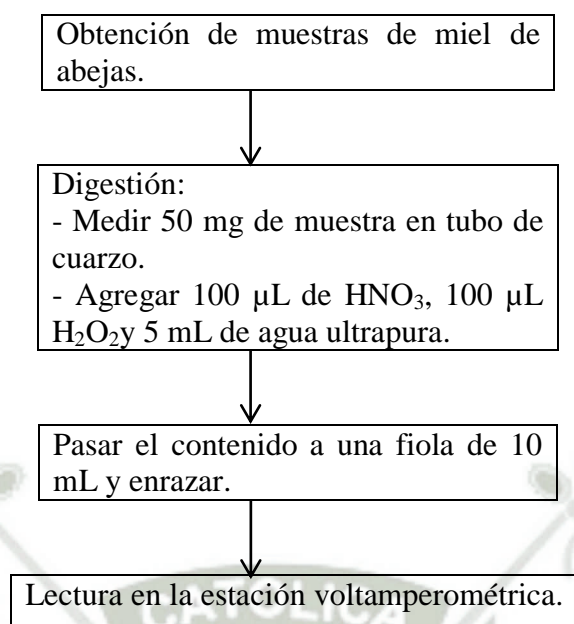
Concluida la digestión las muestras de miel de cada tubo fueron traspasadas a fiolas de 10 mL y enraizadas con agua ultrapura para su posterior análisis voltamperométrico.

A.3. Determinación voltamperométrica de plomo en miel

Un volumen de 2 mL de la solución de las muestras preparadas fue transferido a la celda electroquímica, en la que se habían depositados 10 mL de buffer Acetato de sodio pH 4.6, se procedió a la determinación del plomo presente por voltamperometría de pulso diferencial haciendo uso del método de adición estándar con una solución estándar de plomo 1 ppm, antes de las medir las muestras fueron purgadas con nitrógeno por 300 s.

Los parámetros voltamperométricos del método son: potencial de deposición: -0.9 V; tiempo de deposición: 60 s; velocidad de barrido: 20 mV/s; amplitud de pulso: 0.05 V; tiempo de pulso 0.04 s; potencial inicial: -0.74 V; potencial final: -0.32 V. Todas las medidas voltamperométricas fueron realizadas por voltamperometría de redisolución anódica usando una estación voltamperométrica (757 VA Computrace de Metrohm). Que consta de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3M.

Muestras de miel de abejas:



B. MUESTRAS DE MIEL PARA DIGESTIÓN A PRESIÓN

B.1. Preparación de la muestra

Una vez concluida con la digestión UV y su respectivo análisis voltamperométrico las muestras de miel fueron sometidas a una digestión por presión, se les agregó 500 µL de ácido nítrico y 10 mL de agua ultrapura.

B.2. Digestión de la muestra

Una vez pesadas las muestras de miel y colocadas en el vaso de digestión a presión, se les agregó 500 µL de ácido nítrico para que cubra la muestra de miel, luego se encendió el horno microondas, el temporizador fue programado por 2 min de digestión indicándonos un ciclo, se digirió la muestra en 6 ciclos, se espera un lapso de 30 min para que enfríe el vaso de tapa PTFE. (**Figura 9**)



Figura 9. Digestión a presión

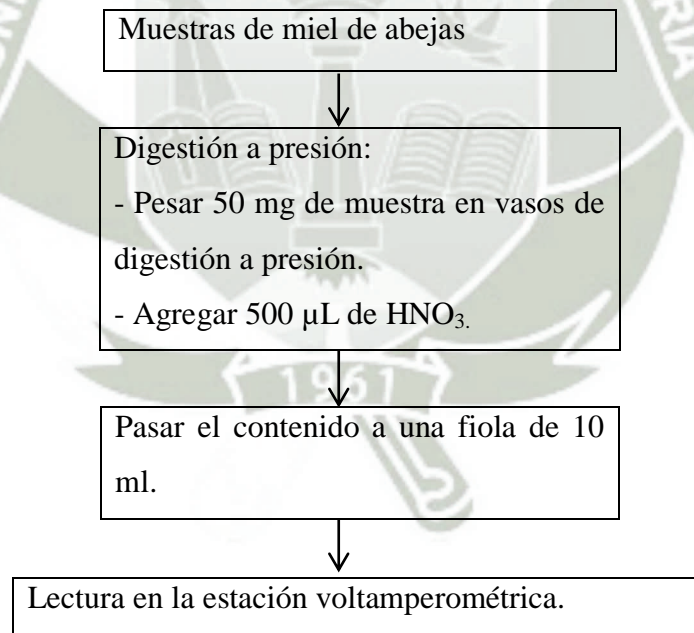
Concluida la digestión, la muestra fue traspasada a fioles de 10 mL y enrazada con agua ultrapura, para su posterior medición en el voltamperómetro.

B.3. Determinación voltamperométrica de plomo en miel de abeja

Un volumen de 2 mL de la solución de las muestras preparadas fue transferido a la celda electroquímica, y se procedió siguiendo los pasos de la determinación voltamperométrica de plomo en sangre.

Los parámetros voltamperométricos del método son: potencial de deposición: -0.9 V; tiempo de deposición: 60 s; velocidad de barrido: 20 mV/s; amplitud de pulso: 0.05 V; tiempo de pulso 0.04 s; potencial inicial: -0.74 V; potencial final: -0.27 V. Todas las medidas voltamperométricas fueron realizadas por voltametría de redisolución anódica usando una estación voltamperométrica (757 VA Computrace de Metrohm). Que consta de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3M.

Muestras de miel de abejas:



2.3.5. Preparación de reactivos

A. Preparación de buffer acetato 0.1 M pH 4.6

Para la determinación voltamperométrica del plomo fue requerido como electrolito de soporte el buffer acetato (Ácido acético/acetato de sodio); para lo cual se preparó 1L del mismo.

Los cálculos en los que fue necesario el uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch son mostrados a continuación:

Cálculos:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\text{Sal}}{\text{Ácido}}$$

$$4.6 = 4.76 + \log \frac{\text{Sal}}{\text{Ácido}}$$

$$\frac{\text{Sal}}{\text{Ácido}} = 0.69$$

$$0.69x + 1x = 0.1\text{M}$$

$$x = 0.059\text{M}$$

Ácido Acético:

$$\frac{0.059 \text{ mol}}{\text{L}} * \frac{60.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * \frac{100 \text{ g}}{100\text{g}} * \frac{1 \text{ mL}}{1.05 \text{ g}} * 1 \text{ L} = 3.37 \text{ mL}$$

Acetato de Sodio:

$$\frac{0.049 \text{ mol}}{\text{L}} * \frac{82.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * 1 \text{ L} = 4.02 \text{ g}$$

Hidróxido de sodio:

$$82.05 \text{ g acetato} \text{ --- } 40 \text{ g NaOH}$$

$$4.02 \text{ g acetato} \text{ --- } 1.96 \text{ g NaOH}$$

Ácido Acético:

$$82.05 \text{ g acetato} \text{ --- } 60.05 \text{ g Ácido acético}$$

$$4.02 \text{ g acetato} \text{ --- } 2.94 \text{ mL Ácido acético}$$

Se preparó 1L de la solución, para esto se pesó la cantidad de 1.96 g de NaOH, se agregó 2.94 mL de Ácido Acético y se determinó el pH con una estación potenciométrica TITRANDO 808 (Metrohm).

B. Preparación de KCl 3M

En la determinación voltamperométrica se requiere el electrolito de referencia el cual es necesario colocar en el electrodo de referencia. Para lo cual se preparó 50 mL de KCl 3M
Cálculos:

Cloruro de potasio: PM 74.55 g mol⁻¹

$$\frac{3 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} * \frac{74.55 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * 50 \text{ mL} = 11.18 \text{ g}$$

Se preparó 50 mL de KCl 3M, para esto se pesó 11.18 g de KCl 3M en la balanza analítica, luego se procedió a diluir en 50 mL de agua ultrapura, luego de preparar la solución se colocó en su envase, para poder ser utilizada como electrolito de relleno en el electrodo de referencia AgCl/KCl 3M durante la medición voltamperométrica.

C. Preparación del estándar de plomo 1000 mg/L

Para esto se utilizó la ecuación de dilución:

$$\begin{aligned} C_1 * V_1 &= C_2 * V_2 \\ 1000 \text{ ppm} * V_1 &= (1 \text{ ppm})(10 \text{ ml}) \\ V_1 &= 0.01 \text{ mL} = 10 \mu\text{L} \end{aligned}$$

De una solución estándar de 1000 mg/L de plomo se cogieron 10 μL y fueron transferidos a una fiola de 10 mL, completándose el volumen de la fiola con agua ultrapura.

2.3.6. Métodos estadísticos

Una vez obtenidos los cálculos se eligen los parámetros estadísticos más apropiados:

A. Estadística de medidas repetidas

A.1. Promedio:

Valor que representa un conjunto de datos. Señala un centro de los valores, que es la suma de todas las medidas divididas por el número de medidas.

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Donde:

$\sum X$: Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

A.2. Desviación Estándar (S):

Se considera como la raíz cuadrada de la varianza.

$$S = \sqrt{\frac{\sum x - X^2}{n - 1}}$$

Donde:

x: Sumatoria del conjunto de datos.

X: Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

A.3. Coeficiente de variación (CV):

Es una medida de variabilidad extensamente utilizada, también conocido como la desviación estándar relativa (DER):

$$CV = DER = 100 * \frac{S}{\bar{X}}$$

Donde:

S: Desviación Estándar

X: Promedio

El CV cuyas unidas se expresan obviamente en tanto por ciento, es un ejemplo de error relativo, es de una estimación del error dividida por una estimación de valor absoluto de la cantidad medida. Los errores relativos se utilizan con frecuencia al comparar las precisiones de los resultados que tienen diferentes unidades o magnitudes.

B. Pruebas de Significación

B.1. Comparación de dos medias experimentales:

Los resultados de un método analítico nuevo se pueden contrastar mediante una comparación con los obtenidos utilizando un segundo método. En este caso tenemos dos medias muestrales X_1 y X_2 . Tomando como hipótesis nula que los dos métodos proporcionen el mismo resultado, es decir $H_0: \mu_1 = \mu_2$, se necesita probar si $(X_1 - X_2)$ difiere significativamente de cero. Para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales es significativa, se calcula el estadístico t ³⁵:

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde s se calcula a partir de:

$$s^2 = \frac{n_1 - 1 s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Y tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

B.2. Intervalos de confianza para muestras pequeñas

A la media y desviación estándar calculadas de esta forma se les denomina estimadores puntuales. Un inconveniente de este tipo de estimadores es que no incluye información sobre la fiabilidad de la estimación realizada y no es igualmente fiable la estimación realizada a partir de una muestra de 10 elementos que a partir de una de 1000. Este inconveniente queda solventado mediante el cálculo del intervalo de confianza.³⁶

Un intervalo de confianza es un par de valores que definen un intervalo dentro del cual se considera que se encuentra el verdadero valor de aquella característica que se está estimando. El nivel de confianza (probabilidad de error) indica el grado de seguridad que tenemos de que el valor estimado se encuentre dentro del intervalo.³⁶

Para muestra aleatoria de tamaño $n < 30$ el intervalo de confianza se calcula:

$$X \pm t_{n-1} \frac{S}{n}$$

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se hará una descripción detallada de los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo para luego ser discutidos.

3.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

El muestreo de campo fue desarrollado en los panales ubicados en 15 distritos del departamento de Arequipa, distritos que presentaban cosecha de miel en el mes de agosto, cada panal estaba ubicado en zonas de amplia vegetación estacional, donde existen cultivos agrícolas, áreas urbanas e industriales generando fuentes antropogénicas.



Figura 10. Mapa de muestras de miel de abejas recolectadas en los distritos del departamento de Arequipa.

Se trabajó con 15 muestras de miel de abejas provenientes de los panales ubicados en los distritos de Yura, Uchumayo, Characato, Polobaya, Socabaya, Pocsi, Majes, Lluta, Atico, Cercado (Rivero), Cercado (Jerusalén), Yanaquihua, Cotahuasi, Socabaya y Jose Luis Bustamante y Rivero, como se muestra en la **Figura 10**, se tomó una muestra de 100 g en frascos herméticos de diferentes panales haciendo un total de 15 muestras, posterior a su recolección fueron trasladadas al laboratorio para su posterior digestión y análisis voltamperométrico.

3.2. Validación del equipo

Para validar el instrumento VA Computrace 757 de Metrohm, se utilizó una celda estándar incorporada en el equipo. La validación se efectuó en dos partes, una validación electrónica y una validación química, para dichas validaciones se sigue procedimientos descritos en el capítulo anterior.

En la validación electrónica se dan 2 resultados, uno para el Test de la linealidad y otro del Test de desempeño del pico, los 2 resultados se dan entre la intensidad (A) versus el Voltaje (V).

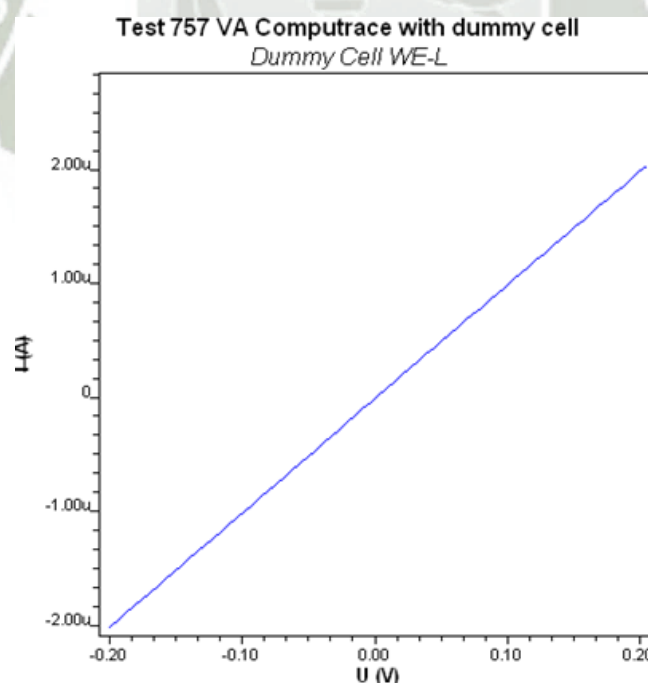


Figura 11. Validación electrónica para linealidad.

En la **Figura 11**, se observa una línea recta, la cual es obtenida de la corriente mínima ($-2 \mu\text{A}$) y la corriente máxima ($2 \mu\text{A}$) frente a la rampa de voltaje mínimo (200 mV) y la rampa de voltaje máximo ($+200 \text{ mV}$), la tolerancia para la corriente mínima es de ($-1.6 \mu\text{A}$ a $-2.4 \mu\text{A}$), según parámetros descritos por Metrohm, con estas características obtenidas se confirma la linealidad para la validación electrónica, es decir que el desempeño de la rampa de voltaje es óptimo para la utilización del equipo.

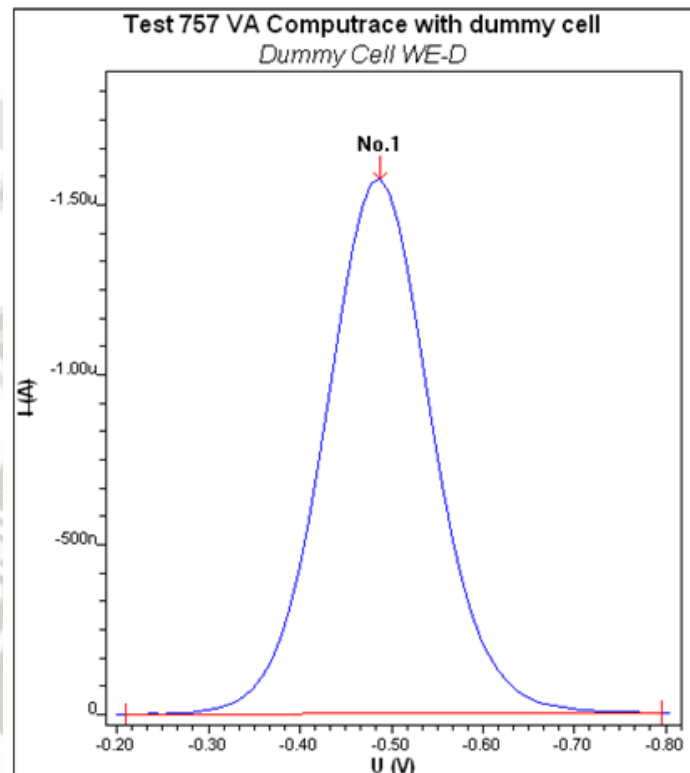


Figura 12. Validación electrónica del pico.

En la **Figura 12**, se muestra un pico simétrico, el cual es obtenido del voltaje máximo (-478 mV) y la corriente máxima ($-1.57 \mu\text{A}$), la tolerancia para el voltaje es de (-450 mV a -550 mV) y para la corriente de ($-2 \mu\text{A}$ a $-4 \mu\text{A}$); cumpliendo los parámetros descritos por metrohm, al producirse un cambio de intensidad por el equipo que evidencia la simetría del pico y la fiabilidad del equipo para la determinación de plomo.³⁴

Una vez hecha la validación electrónica se procedió con la validación química, la cual se efectúa para ver la precisión y exactitud con la que cuenta el instrumento para dar los resultados de las muestras. Una gráfica representativa es mostrada a continuación.

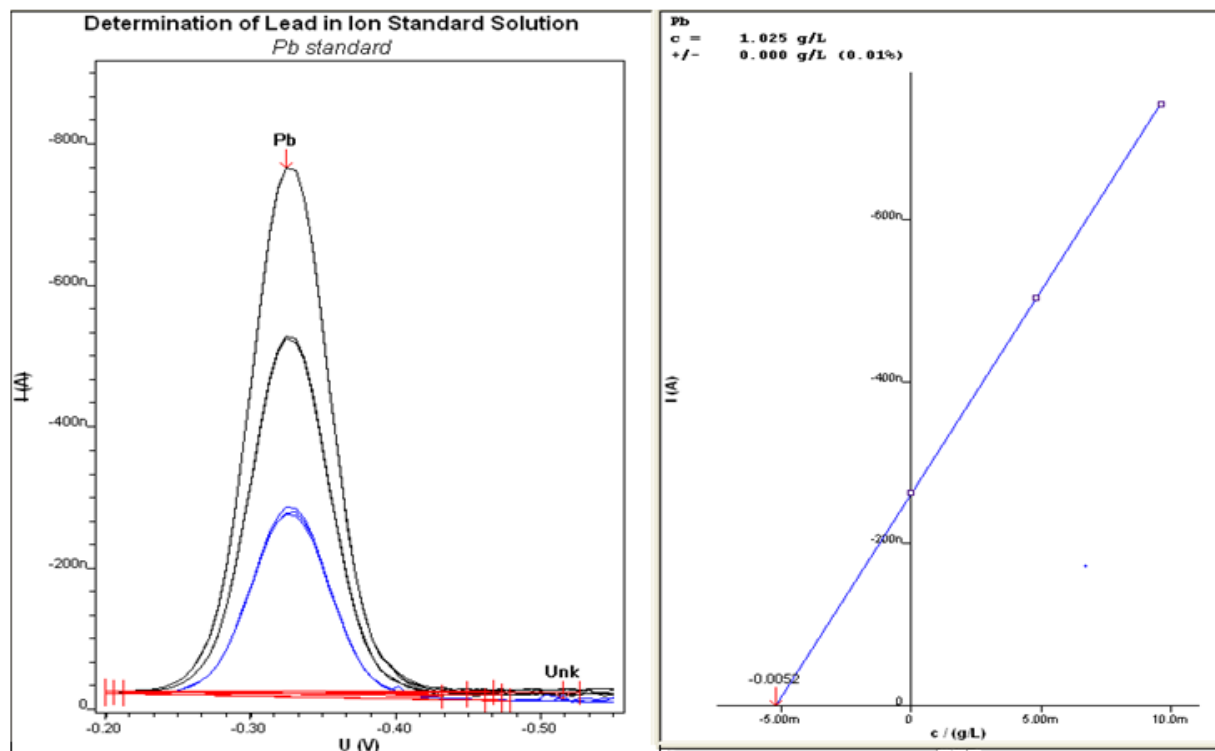


Figura 13. Validación Química

En la **Figura 13**, observamos la validación química la cual se efectuó usando una solución de plomo (1000 g/L) después de las adiciones de estándar de 100 μ L en modo DME, se muestra un aumento en el pico de dicho metal y la concentración final es de 1.025 g/L de plomo, la tolerancia para la concentración final es de $(1 \pm 0.05 \text{ g/L})$.³⁴

Dicha concentración final depende enormemente del cuidado tomado en la preparación de la solución de análisis y en la distribución de las soluciones de adición estándar, al estar la concentración de plomo dentro del rango establecido, se concluye con la validación química dado el cumplimiento de los parámetros descritos por metrohm.

3.3. Validación del método

Concluida la validación electrónica se procedió con la validación del método voltamperométrico para muestras biológicas para obtener mejores resultados se optó por validar algunos parámetros como sigue a continuación:

3.3.1. Linealidad

Para este parámetro se estudiaron los 6 niveles de concentración (mg/L) y se analizaron por triplicado, obteniéndose los siguientes los siguientes resultados representados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Datos para la linealidad del método.

Pb en celda (ppm)	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Intensidad Promedio (nA)	Desviación Estándar
0.010	11.94	11.415	11.16	11.51	0.40
0.020	24.19	23.51	22.84	23.51	0.68
0.029	34.685	35.195	36.37	35.42	0.86
0.038	47.965	46.495	47.83	47.43	0.81
0.048	58.6	56.73	58.01	57.78	0.96
0.057	69.985	68.455	68.82	69.09	0.80

Fuente: Elaboración propia

Con estos datos se construyó la curva para la linealidad representada en la **Figura 14**.

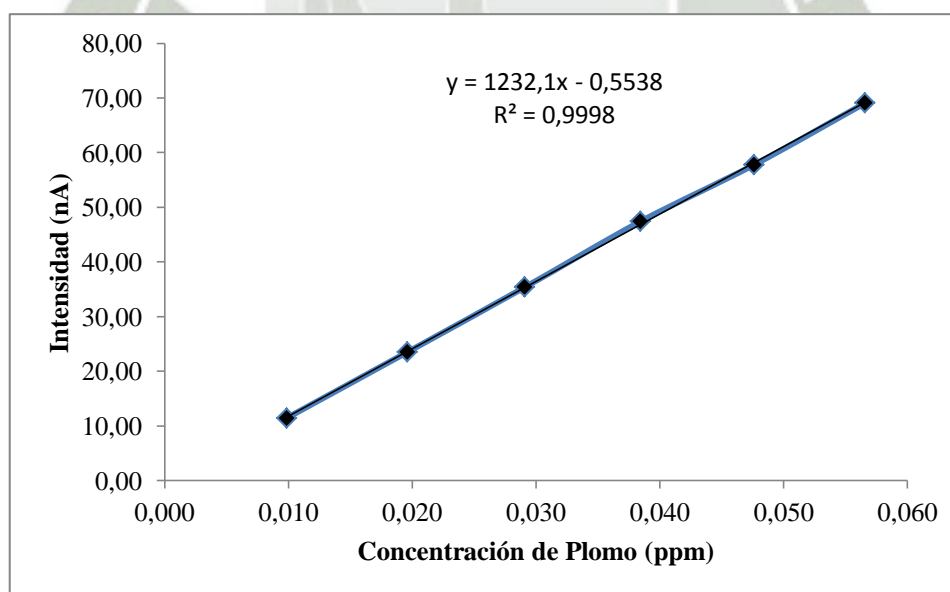


Figura 14. Linealidad del método voltamperométrico.

Independientemente de la apariencia de la recta, es necesario evaluar los estimadores de regresión como el coeficiente de regresión lineal (r) que es igual a 0.9998, valor cercano a la unidad, por lo que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su repuesta.

3.3.2. Precisión

Una vez verificada la linealidad del método se procedió con la precisión del método, la que estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real.

Para esto en un primer ensayo de repetibilidad se realizó el análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio en un mismo día, los datos son mostrados en la **Tabla 5**. Según la **Tabla 3** para un nivel de concentraciones próximo a 1ppm el valor de coeficiente de variación aceptable es 8% según la AOAC, por lo tanto los resultados mostrados cumplen con las especificaciones.

Tabla 5. Datos para la repetibilidad del método

Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Intensidad Promedio (nA)	DS	CV	Int. Confianza	
11.94	11.42	11.16	11.51	0.40	3.46	10.48	12.53
24.19	23.51	22.84	23.51	0.68	2.87	21.78	25.25
34.69	35.20	36.37	35.42	0.86	2.44	33.20	37.64
47.97	46.50	47.83	47.43	0.81	1.71	45.34	49.52
58.60	56.73	58.01	57.78	0.96	1.65	55.32	60.24
69.99	68.46	68.82	69.09	0.80	1.16	67.03	71.14

Fuente: Elaboración propia.

La repetibilidad del método depende generalmente del proceso de preparación de la muestra, es decir, cuanto mayor sea la manipulación de la muestra, es decir, cuanto mayor sea la manipulación de la muestra más probable es que la variabilidad del método aumente. Para la precisión intermedia se evaluaron factores como día de ensayo (II), equipo (III) y analista (IV) representados a continuación.

Para la precisión intermedia generalmente se acepta valores inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método, de tal modo que los datos mostrados en el **Tabla 6** cumplen con las especificaciones dadas.

Tabla 6 Datos para la precisión intermedia

Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Intensidad IV (nA)	Promedio Int. (nA)	DS	CV	Int. Confianza	
7.845	8.330	8.050	7.880	8.026	0.221	2.759	7.457	8.595
10.485	10.770	10.755	10.600	10.653	0.136	1.273	10.304	11.001
13.270	13.285	13.425	13.490	13.368	0.107	0.804	13.091	13.644
16.055	16.065	16.280	16.190	16.148	0.108	0.666	15.871	16.424
18.515	18.695	19.130	18.355	18.674	0.334	1.791	17.814	19.533
21.620	21.365	21.565	21.230	21.445	0.180	0.841	20.981	21.909

Fuente: Elaboración propia

Los límites de confianza representan intervalos en torno al valor estimado que contiene el valor real con una probabilidad del 95%.

3.3.3. Límites de cuantificación y detección LC, LD:

Los límites de cuantificación (LC) y límites de detección (LD) fueron calculados de los datos obtenidos del análisis por triplicado realizado. Una gráfica representativa es mostrada a continuación:

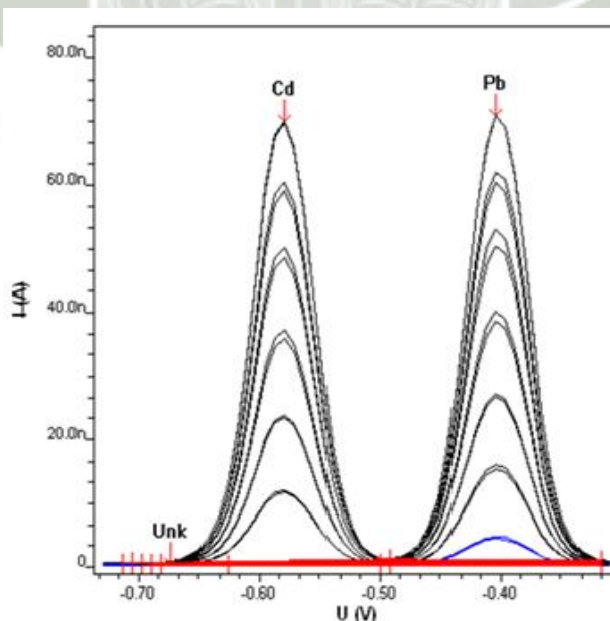


Figura 15. Determinación del Límite de detección y Cuantificación.

Se determinó la pendiente de la curva de calibración para los datos, de donde se pudo extrapolar a concentración cero la ecuación de la recta (**Figura 16**), obteniéndose como señal ruido la correspondiente al término independiente, es decir Y_{bl} .

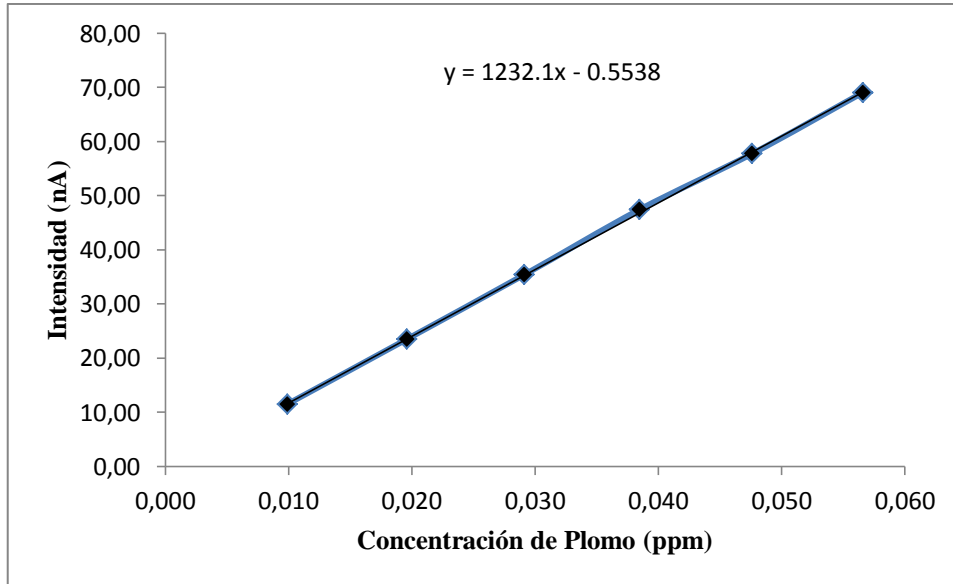


Figura 16. Concentración versus Intensidad (nA)

Se construyó otra recta tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las repuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas, considerándose que la desviación estándar de las respuestas S_{bl} corresponderá al valor de la ordenada de origen de esta recta.

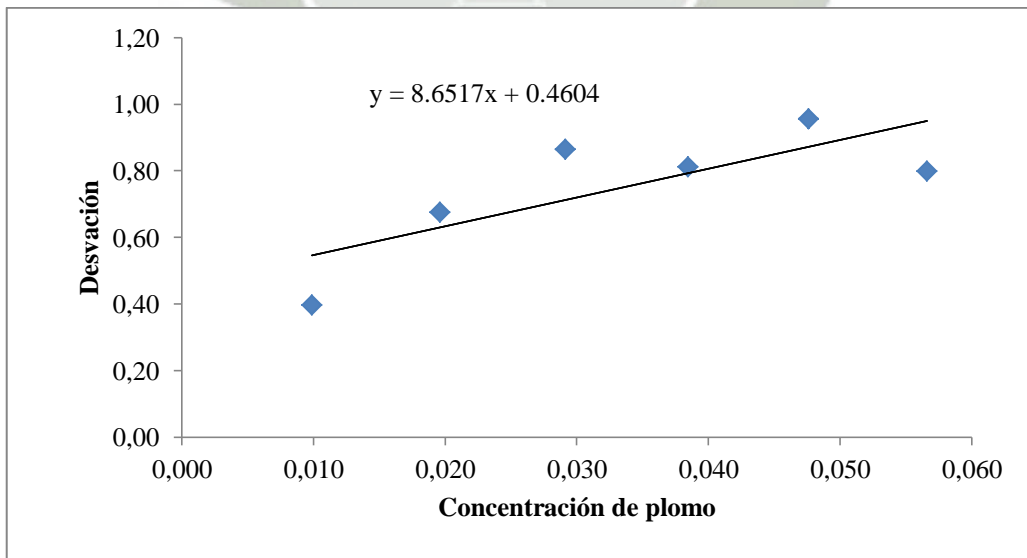


Figura 17. Desviación estándar versus Intensidad (nA)

Se calculó el límite de detección y límite de cuantificación aplicando las siguientes formulas:

Límite de detección (LD):

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} * \frac{1}{\bar{n}}$$

Valor de LD: 0.2742 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Límite de cuantificación (LC):

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} * \frac{1}{\bar{n}}$$

Valor de LC: 1.1508 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

De modo que el método voltamperométrico es capaz de detectar 1.15 ppb de plomo en miel de abejas cumpliendo con buena precisión y exactitud.

3.4. Comparación de métodos de digestión

Concluida la validación del método y como ya se expuso en el capítulo anterior se usaron dos métodos de digestión en las muestras recolectadas, para lo que se realizaron los dos métodos de digestión ácida en envase cerrado asistida por microondas y con el método de digestión por fotólisis UV, utilizando las mismas muestras.

Para esto se establecieron los parámetros voltamperométricos a usar durante la determinación del plomo, los cuales se muestran en la **Tabla 7**.

Al comparar los métodos de digestión con el procedimiento ya descrito en el capítulo II, se obtuvieron los siguientes datos resumidos en la **Tabla 8**, expresados en mg. de plomo por Kg. de miel en las 15 muestras de miel obtenidas de diversos puntos de muestreo (Distritos) de la ciudad de Arequipa.

Tabla 7. Parámetros voltamperométricos utilizados en la celda polarográfica para la determinación de Pb

Parámetros del método de trabajo	
Modo de operación	Voltamperometría de Pulso Diferencial
Tiempo inicial de la purga	300 s
Potencial inicial	- 0.75 V
Potencial final	0.31 V
Potencial de deposición	-0.9 V
Tiempo de deposición	60 s
Tiempo de pulso	0.04 s
Tiempo de equilibrio	10 s
Pulso de amplitud	0.05005
Velocidad de barrido	19.83 mV/s

Fuente. Elaboración propia

Tabla 8. Comparación entre el método de digestión a presión y el método de digestión UV

Lugar / Punto de Muestreo	UV (mg/kg)	Microondas (mg/kg)
1 / Distrito de Yura (Quiscos)	0.91	0.90
2 / Distrito de Majes	0.97	1.03
3 / Distrito de Cercado (Jerusalén)	1.13	1.02
4 / Distrito de Lluta	0.68	0.73
5 / Distrito de Uchumayo (Huaico)	1.07	1.02
6 / Distrito de Atico	0.99	0.91
7 / Distrito de Characato	1.26	1.34
8 / Distrito de Yanaquihua	0.68	0.83
9 / Distrito de Cotahuasi	1.17	1.19
10 / Distrito de Cercado- Rivero	2.74	2.53
11 / Distrito de Socabaya (Campaña)	1.86	1.70
12 / Distrito de Polobaya	1.02	1.01
13 / Distrito de Pocsi	1.63	1.53
14 / Distrito de Jose Luis Bustamante	1.21	1.12
15 / Distrito de Chiguata	0.91	0.72

Fuente: Elaboración propia

Una vez obtenidos los datos y para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales es significativa, se calculó el estadístico t como se puede observar en la **Tabla 9**.

Al ser el valor experimental de t experimental menor al de t de tablas, se acepta que la diferencia entre las medias de ambos grupos no es significativa con un nivel de

confianza al 95% ($p < 0.05$), es decir no existe diferencia significativa entre ambos métodos de digestión.

Tabla 9. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas.

	UV	Microondas
Media	1.22	1.17
Varianza	0.28	0.22
Observaciones	15.00	15.00
Coefficiente de correlación de Pearson	0.98	
Diferencia hipotética de las medias	0.00	
Grados de libertad	14.00	
Estadístico t	1.60	
P($T \leq t$) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P($T \leq t$) dos colas	0.13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

Fuente: Elaboración propia

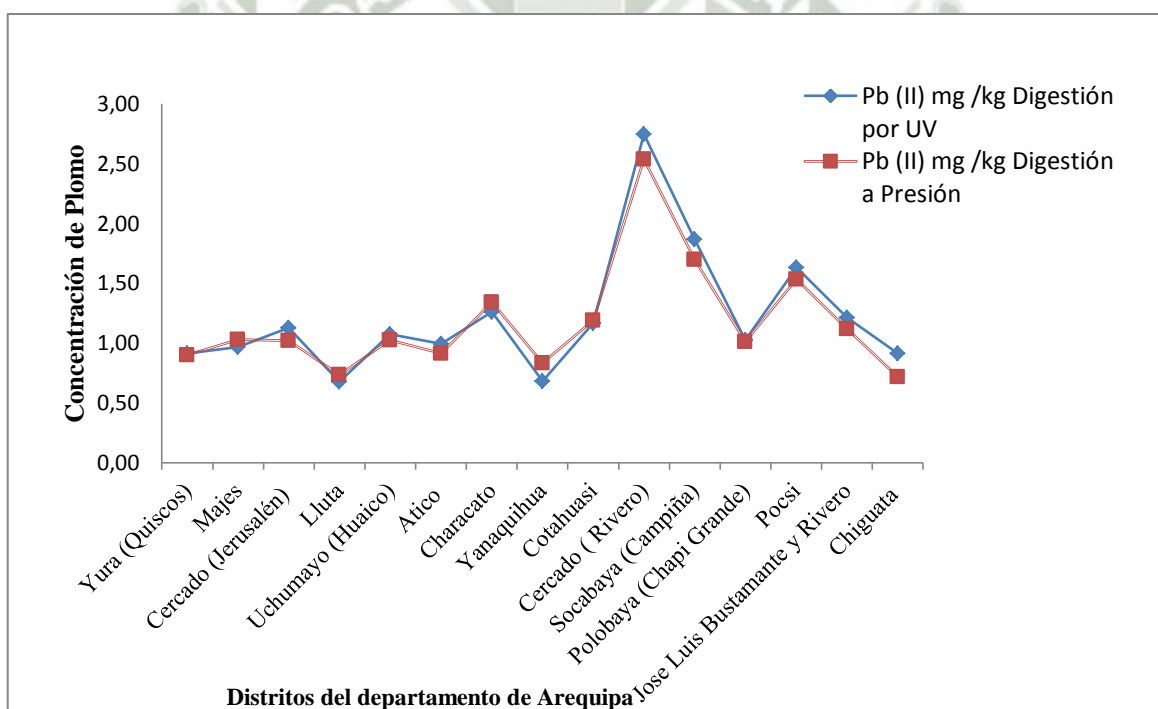


Figura 18. Comparación gráfica entre los métodos de digestión por UV y digestión a Presión

En la **Figura 18**, procedente de los datos obtenidos en el Cuadro N° 8 se observa una comparación gráfica entre las concentraciones de plomo obtenidas por las muestras

digeridas mediante digestión por fotólisis UV y la digestión a presión por microondas se obtuvieron concentraciones parecidas, y al demostrar estadísticamente que no hay diferencia significativa entre ambas digestiones, también se puede observar gráficamente que las muestras de miel de los distritos del departamento de Arequipa al haber sido digeridas por diferentes métodos de digestión para luego ser analizadas por el voltamperímetro obtuvieron concentraciones semejantes en las 15 muestras de miel de abejas del departamento de Arequipa.

La miel está compuesta de carbohidratos estos son digeridos fácilmente con 500 μL de ácido nítrico, también está compuesta de proteínas y aminoácidos que se encuentran en pequeñas cantidades en la miel las cuales presentan una digestión incompleta debido al relativo bajo potencial oxidativo del ácido nítrico, en la digestión de la muestra a presión por microondas en esta digestión se utilizó solamente ácido nítrico, como se observa en la **Figura 19**.

Mientras que en la digestión por fotólisis UV se utilizó 100 μL de ácido nítrico y 100 μL de peróxido de hidrógeno que es el iniciador de la reacción, acelerando la descomposición de las sustancias interferentes, la radiación ionizante a la que está expuesta la muestra de miel de abejas disuelve los componentes de la matriz, proporcionando una muestra sin interferentes y transparente, como se observa en la **Figura 20**.

Durante la digestión a presión hay evaporación claro que reducida a comparación de otros métodos por lo cual puede perderse muestra al abrir el vaso con tapa PTFE, una limitación también es el tiempo requerido para el enfriamiento antes de que el envase pueda ser abierto, el cual era de 45 minutos de espera. Mientras que en la digestión por fotólisis UV la digestión de la muestra es de 90 minutos, el tiempo de enfriamiento es de 30 minutos y no hay pérdida de muestra por evaporación.

En la **Tabla 8**, se puede observar que el promedio de la concentración de plomo 1.22 (+/- 0.53) obtenido en la digestión UV es elevado en comparación del promedio de concentración de plomo 1.17 (+/- 0.47) por lo cual se toma la decisión de evaluar los valores obtenidos en las muestras digeridas por digestión UV.



Figura 19. Digestión a presión por microondas de las muestras de miel de abejas



Figura 20. Digestión por fotólisis UV de muestras de miel de abejas

3.5. Determinación de la concentración de plomo en miel

Para verificar la aplicabilidad del método validado se tomaron muestras de la ciudad de Arequipa y se analizaron.

3.5.1. Preparación de la muestra

Las muestras de los panales fueron recolectadas en distintos días del mes de agosto del año 2012 en el departamento de Arequipa, tras la recolección fueron llevadas

inmediatamente al laboratorio donde fueron procesadas. Al no presentar diferencia significativa entre los métodos tanto de digestión por fotólisis UV como en envase cerrado asistida por microondas se realizó la digestión de las muestras en el sistema de digestión UV.

Se tomó 50 mg de muestra de miel y se depositaron en tubos de cuarzo previamente tarados, posteriormente se le agregó 100 μL de ácido nítrico, 100 μL de peróxido de hidrógeno y 5 ml de agua ultrapura.

3.5.2. Digestión de las muestras

La batería de tubos con las muestras fueron colocadas en el sistema de digestión UV y el equipo fue encendido, el tiempo de digestión se evaluó con los cambios presentados en las muestras durante la digestión, fue necesario realizar la digestión por un periodo de 1 hora y 30 minutos hasta el total aclaramiento de la muestra y falta de interferencia en el voltamperímetro como se muestra en la **Figura 21**.

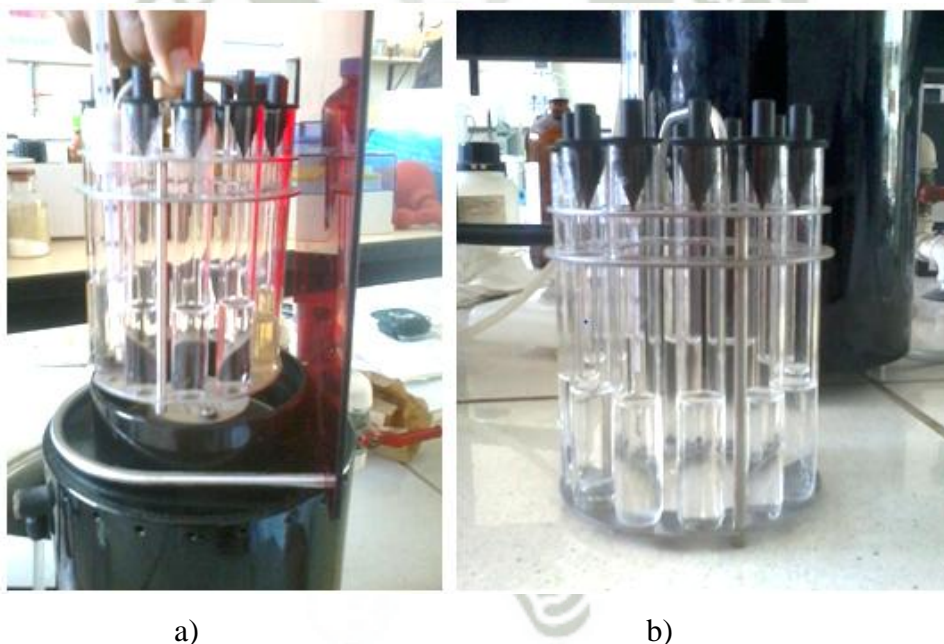


Figura 21. Cambios de las muestras digeridas por UV; a) Sin digerir b) Digeridas

3.5.3. Determinación voltamperométrica de plomo



Figura 22. Analizador voltamperométrico (derecha), ligado al computador para registro de análisis.

Concluida la digestión y pasados los tubos a fioles de 10 mL las muestras fueron transferidas a la celda electroquímica del analizador voltamperométrico (**Figura 22**), para su medición con los parámetros y condiciones de la **Tabla 10**, ingresados en el software, para luego obtener una determinación gráfica como se observa en la **Figura 23**. Antes de la medición fue necesaria la purga con nitrógeno por 300 s, ya que la interferencia producida por el oxígeno es notoria durante la determinación.

Tabla 10. Parámetros y condiciones utilizadas en la celda voltamperométrica para la determinación de plomo.

Parámetros voltamperométricos	Unidad	Pb
Volumen de muestra diluida	ml	1
Electrodo de Referencia	mol L ⁻¹	KCL 3M
Buffer Acetato de sodio 1 mol L⁻¹	ml	10
Electrodo de trabajo		HMDE
Número de adiciones		2
Número de replicas		3

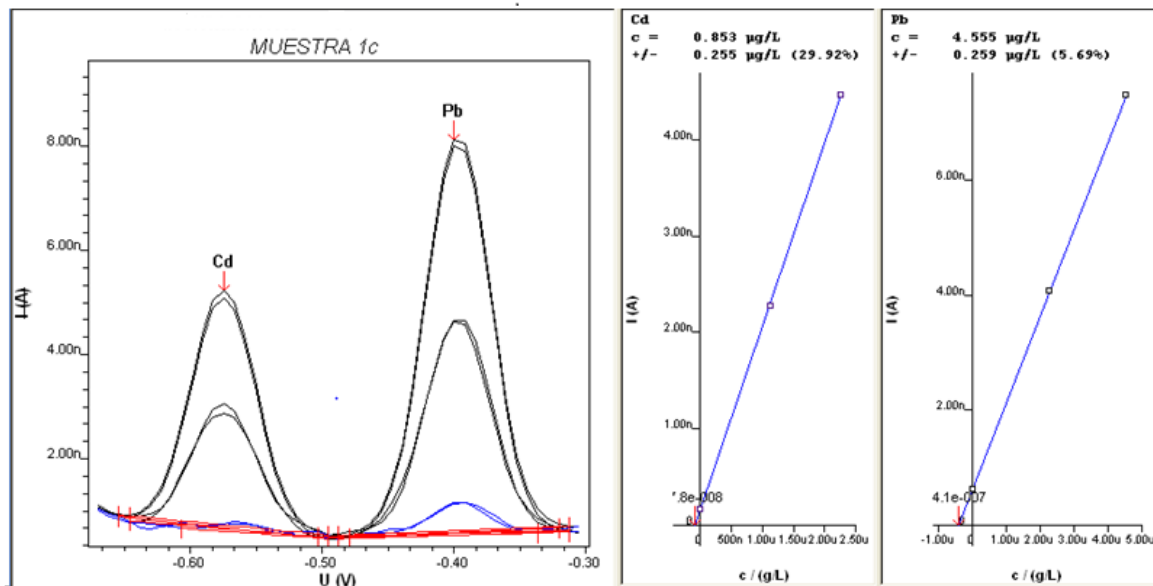


Figura 23. Gráfica obtenida del análisis voltamperométrico que se realizó en la muestra 1 procedente del distrito de Yura.

En voltagrama mostrado en la **Figura 23** la determinación gráfica de plomo y cadmio en la muestra N°1 de miel de abejas procedente del distrito de Yura, previamente digerida por fotólisis UV, observamos los diferentes potenciales para los picos producidos por los iones de cadmio y plomo en el cual el plomo presenta un potencial de pico -0.4 V y una concentración de plomo de 4.555 µg/L con un margen de error de ± 0.259 µg/L, con dos adiciones de estándar de plomo, el mismo estándar de plomo fue preparado el mismo día en el cual se realiza la determinación de plomo mediante el análisis voltamperométrico.

3.6. Concentración de plomo en miel producida en diferentes panales del departamento de Arequipa

Se tomó muestras de miel de abejas recientemente cosechada durante el mes de agosto, en diversos puntos ubicados en los distritos del departamento de Arequipa los cuales se puede observar en la **Figura 10**.

Se conversó con los apicultores arequipeños para la toma de muestras de miel en sus cosechas del mes de agosto, indicándoles el análisis que se iba a realizar en cada muestra, para lo cual ellos estuvieron muy dispuestos.

Se efectuaron pruebas para determinar la concentración de plomo en muestras, los datos obtenidos al analizar las muestras de los panales ubicados en diversos puntos ubicados en el departamento de Arequipa son mostrados en la **Tabla 11** indicando la desviación estándar de la muestra y los intervalos de confianza para cada muestra.

Tabla 11. Concentración de Plomo en muestras pertenecientes al departamento de Arequipa

Lugar / Punto de Muestreo	Pb (mg/kg)	DS	Intervalos de Confianza	
1 / Distrito de Yura (Quiscos)	0.911	0.091	0.717	1.106
2 / Distrito de Majes	0.966	0.099	0.754	1.179
3 / Distrito de Cercado (Jerusalén)	1.127	0.104	0.904	1.351
4 / Distrito de Lluta	0.676	0.069	0.529	0.823
5 / Distrito de Uchumayo (Huaico)	1.073	0.111	0.834	1.312
6 / Distrito de Atico	0.992	0.077	0.828	1.157
7 / Distrito de Characato	1.260	0.090	1.068	1.452
8 / Distrito de Yanaquihua	0.678	0.055	0.561	0.796
9 / Distrito de Cotahuasi	1.166	0.069	1.017	1.315
10 / Distrito de Cercado- Rivero	2.744	0.146	2.431	3.057
11 / Distrito de Socabaya (Campaña)	1.864	0.081	1.690	2.037
12 / Distrito de Polobaya	1.024	0.095	0.821	1.228
13 / Distrito de Poci	1.631	0.131	1.350	1.912
14 / Distrito de Jose Luis Bustamante	1.209	0.097	1.000	1.418
15 / Distrito de Chiguata	0.913	0.087	0.726	1.100
Promedio	1.216	0.093		
DS	0.526	0.024		

Fuente. Elaboración propia

La concentración promedio de plomo en miel de abejas proveniente de diversos puntos de muestreo del departamento de Arequipa fue de 1.22 (+/- 0.53) mg de plomo por kilogramo de miel, estando en todos los casos por encima del límite máximo establecido por el reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos que es de 0.30 mg de plomo por kilogramo de miel de abejas.

En la **Figura 24**, que procede de la **Tabla 11**, las concentraciones de plomo en los diversos puntos de muestreo en el departamento de Arequipa, la gráfica nos muestra que la concentración de plomo más alta, entre todas las muestras se encuentra en el cercado de Arequipa con una concentración de 2.74 (+/- 0.081) mg de plomo por kilogramo de miel de abejas, al ser una zona urbana el distrito Cercado de Arequipa precisamente en la calle Rivero donde se ubicó uno de los panales, la zona tiene bastante movimiento vehicular por lo tanto presenta un elevado porcentaje de contaminación por combustión de gasolina con aditivos de plomo, también observamos que la mínima concentración de plomo se encuentra en el distrito de Lluta con 0.68 (+/- 0.69) mg de plomo por kilogramo de miel de abejas, este resultado se da por ser una zona rural y estar menos expuesto a una concentración de plomo mínima en el medio ambiente.

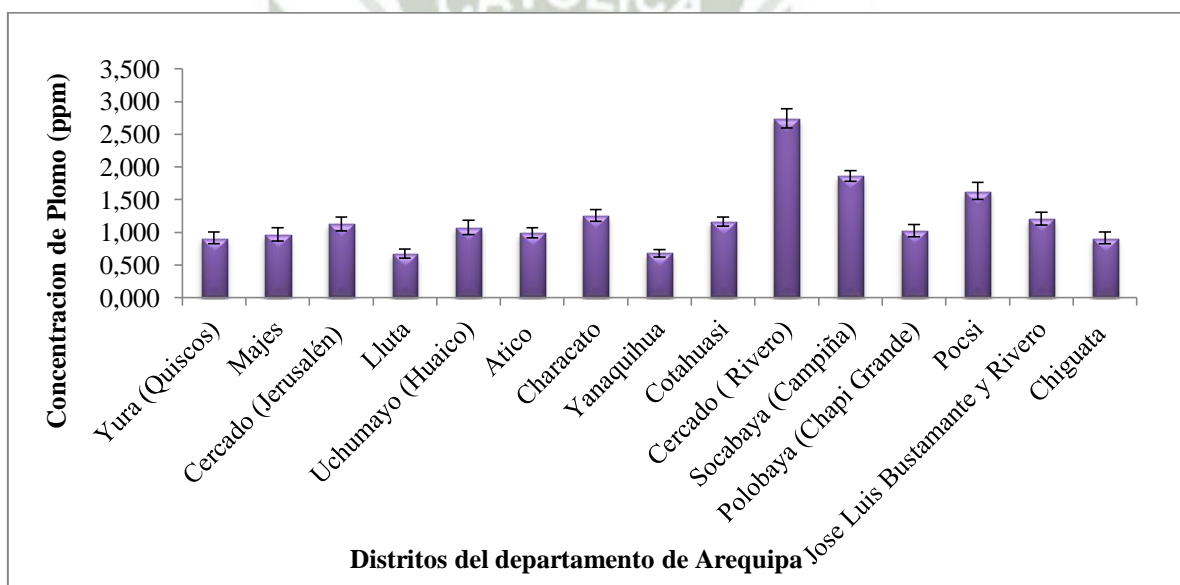


Figura 24. Concentración de plomo en miel de abejas en el departamento de Arequipa

El plomo presenta movilidad baja, permaneciendo en sedimentos marinos, forma sales como ácidos orgánicos, ácido láctico y acético, además de formar compuestos orgánicos estables, como el plomo tetraetilo y el tetrametilo, el plomo tetraetilo considerado como la mayor fuente antropogénica de este elemento en el medio ambiente, las industrias son las fuentes más comunes de plomo en el ambiente, la intoxicación de plomo puede ocurrir por vías aéreas, alimentos o bebidas, en niveles elevados puede producir la muerte. De acuerdo a la Organización mundial de la Salud el límite tolerable

para la ingestión de plomo es 0.05 mg kg^{-1} peso corporal por semana para adultos y 0.025 mg kg^{-1} peso corporal por semana para niños⁴¹, y según el reglamentos técnico de la MERCOSUR que es de 0.3 mg kg^{-1} , si consideramos este valor en un niño con 30 kg de peso corporal, tendríamos un valor aproximado de 0.75 mg kg^{-1} . Así, analizando los valores obtenidos con el máximo permitido por las normas mencionadas, podemos considerar el promedio de 1.22 mg kg^{-1} de plomo, como un valor que puede ser considerado elevado dependiendo del consumo de miel por individuo. Siendo una concentración 1.63 veces mayor que la aceptable. Factores como las industrias y minería, pueden ser considerados como posibles causas de ese impacto ambiental en el departamento de Arequipa, debido a la cercanía de los panales a esas fuentes de contaminación. Hecho que merece ser estudiado con mayor profundidad, demostrando no solo nuestra preocupación por el consumo de miel proveniente de esos ambientes, sino también la importancia de la aplicación de la miel de abejas para una detección eficiente y constante de plomo en el medio ambiente del departamento de Arequipa.

En todas las muestras las concentraciones obtenidas de plomo al sobrepasar los límites máximos permisibles de plomo en miel de abejas de 0.3 mg kg^{-1} , esto nos indica que el departamento de Arequipa tiene un grave problema de contaminación ambiental de plomo en miel de abejas al ser un producto de consumo masivo por la población, esto pone en riesgo la salud de la población arequipeña.

3.7. Aplicación de la miel de abejas como bioindicador ambiental en la ciudad de Arequipa

Al haber obtenido una concentración de plomo de 1.22 mg Kg^{-1} como promedio, esto nos demuestra que la miel de abeja puede ser aplicada como bioindicador de contaminación ambiental en el departamento de Arequipa existiendo antecedentes bibliográficos¹ de la aplicación de miel o las abejas como bioindicadores en los cuales se obtuvieron resultados estadísticamente comparables, pero teniendo en cuenta que los resultados en el insecto son más difíciles de interpretar debido a la complejidad de factores que influyen en la asimilación de contaminantes, se ha concluido que la miel de abejas recién cosechada parece ser la mejor matriz para monitorear, no sólo porque se muestrea

fácilmente y es de bajo costo, sino también debido a la naturaleza amplia de la información que es capaz de suministrar.

Entre los primeros trabajos encontrados que hacen mención al uso potencial de la miel como indicador de contaminación ambiental por metales o como indicador de prospecciones minerales, están los de (Tatsuno *et al.*, 1968)⁴², (Petrov, 1970)⁴³ y (Lasceve *et al.* 1974)⁴⁴.

(Tong *et al.*, 1975).⁴⁵ estudiaron en EEUU 47 elementos en 19 muestras de miel producidas en áreas de elevada contaminación (tráfico rodado y plantas industriales). Las muestras próximas a carreteras tenían elevada concentración en Al, Ba, Cd, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Si. El origen de muchos de estos elementos fue la emisión de los vehículos y una fábrica de cemento próxima al lugar de experimentación. Posteriormente, en la República Federal Alemana se produjo una declaración acerca de aplicación de la miel como bioindicador, que pasó a formar parte del Banco de Especímenes Ambientales Environmental Specimen Banking Project (Kayser *et al.*, 1982)⁴⁶.

(Kulike y Voget, 1983)⁴⁷ estudiaron 2.600 colonias de abejas procedentes del medio urbano de Berlín Este. La concentración media de plomo en la miel fue de 0.18 ppm. (Kerkvliet, 1983)⁴⁸ realizó un estudio encargado por el gobierno holandés, cuyos resultados mostraron que el contenido en Pb y Cd variaba según la zona o región de producción y la fuente floral (néctar o mielato). En mieles holandesas, la media de los resultados obtenidos en 15 muestras de origen floral fue de Pb 0.31mg kg⁻¹, mientras que para las mieles de mielato fue Pb 0.89 mg kg⁻¹. En 13 mieles importadas de ocho países hallaron una media de 0.30 mg kg⁻¹ de Pb. Ninguna de las muestras analizadas se aproximó a valores que pudieran ser peligrosos para la salud humana.

(Jones, 1987)⁴⁹ estudia el valor potencial de la miel como indicador de contaminación ambiental en diferentes puntos de Gran Bretaña, con 50 muestras de miel en las que se analizó el contenido en Ag, Cd, Pb y Cu. También analizó las tierras en que se hallaban las plantas pecoreadas por las abejas en la recolección del néctar. En el Pb sólo una de las muestras presentaba un nivel elevado, y procedía de zonas de tierra contaminada

por este elemento. Las mieles procedentes de las inmediaciones de zonas urbanas e industriales de Birmingham y Liverpool contenían elevadas concentraciones de Ag, Cd y Pb. Pero las muestras que se esperaban influidas por la proximidad a vías de tráfico rodado intenso (susceptibles de elevada deposición atmosférica) no mostraron elevación en el contenido en Pb. Este autor concluye que en general no existe correlación entre el contenido de estos elementos en la tierra y la miel; que no se conoce con exactitud la forma en que la miel refleja la composición en elementos minerales de las plantas visitadas, de la tierra o de la deposición atmosférica; que la miel no es una de las herramientas más sensibles para evaluar la contaminación ambiental por metales pesados, debido a la baja concentración en que se hallan presentes en la miel y a la gran variabilidad ocasionada por factores como la fuente origen, la densidad floral, la época del año, las lluvias, etc.

(Bogdanov *et al.* 1986)⁵⁰ estudian el contenido en metales de mieles florales y de mielato procedentes de zonas suizas muy contaminadas (grandes ciudades, autopistas, áreas de incineración), observaron que mientras la concentración de Pb aumentaba hasta duplicarse, la explicación hallada que el Pb lo hace a través del aire. Observan que las cantidades metales de las mieles de mielato respecto a las de origen floral es de dos a cuatro veces superior y que se debe a la mayor superficie de exposición. Como conclusión, estos autores consideran a la miel como buen indicador del Pb en áreas de varios km² de una región contaminada.

(Serra, 1989)⁵¹ explica que el gran contenido en Pb de algunas mieles de la provincia de Huelva, puede proceder de la contaminación ambiental del aire y del agua, especialmente si son zonas industriales petroquímicas.

(Rowarth, 1990)⁵² estudia el contenido en Pb de 59 mieles procedentes de Nueva Zelanda. Las muestras procedían de zonas próximas a diferentes localidades industriales. Las cantidades de Pb no sobrepasaron en ningún caso los límites admitidos en alimentación.

(Accorti *et al.* 1990)⁵³ estudiaron la utilidad de la miel como indicador de la contaminación por Pb debida al tráfico rodado. En 62 muestras de miel tomadas durante

tres años, aparecieron diferencias según el origen: las mieles de mielato tenían más Pb que las de origen floral. Se atribuyó a que estas mieles tienen una mayor superficie de contacto con la atmósfera y un periodo de recolección más largo. Concluyen que la abeja es un excelente bioindicador (en su papel de colector) y bastante adecuado por el bajo coste que supone.

(Schmutzler, 1991)⁵⁴ mediante un aumento controlado de Pb en la alimentación de las abejas, examina el contenido final en la miel, cera y abejas. Este elemento aumenta al aumentarse en la alimentación, pero no se reparte por igual en abejas, miel y cera, sino que en las abejas se encuentra la mayor concentración.

(Fodor *et al.* 1993)⁵⁵ tomaron mieles en dos áreas diferentes de Hungría, una procedente de las cercanías de Budapest, principal núcleo industrial del país, y otra de una zona agrícola y no contaminada. Estudiaron la concentración de Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Mn, P, Zn, Pb y Cd. En casi todos los casos, las concentraciones de estos elementos en las muestras procedentes del área industrial, fueron superiores. El aumento se consideró significativo en casi todos los elementos medidos, es importante desde el punto de vista ambiental para el caso del Cd, Cu, Pb, Zn. Concluyen que la miel es un excelente indicador de la contaminación.

(Ahmed Hassan, 2010)³⁹ los resultados obtenidos por voltamperometría de 26 muestras de miel de diferentes lugares del sur de Egipto, indicándonos un rango de concentración promedio desde 0.006 hasta 1.640 mg kg⁻¹ de plomo, mientras que el rango promedio obtenido por espectrometría de absorción atómica fue desde 0,007 hasta 1.650 mg kg⁻¹ de Pb, lo cual nos indica que no hay demasiada diferencia entre ambos métodos de determinación.

El plomo encontrado en las 15 muestras de miel extraídas de las cosechas del mes de agosto encontrados en los distritos de Uchumayo, Characato, Polobaya, Socabaya, Poci, Majes, Lluta, Atico, Cercado (calle Rivero), Cercado (calle Jerusalén), Yanaquihua, Cotahuasi, Socabaya y Jose Luis Bustamante y Rivero, estos distritos fueron tomados como puntos de referencia por zona rurales y urbanas, así mismo teniendo en común el

mes de cosecha, cada muestra tiene en promedio 1.22 mg Kg^{-1} (**Tabla 11**) resultado obtenido del análisis voltamperométrico de redisolución anódica de pulso referencial (DPASV). Esto indica que la miel se aplica como un bioindicador ambiental en departamento de Arequipa.

La miel de abejas puede ser aplicada como bioindicador acumulativo ambiental nato al ser producida en gran cantidad por las abejas, al estar expuestos los panales en sectores rurales y urbanos de la ciudad de Arequipa y poder ser ubicada con facilidad durante el muestreo.

Las abejas vuelan kilómetros de radio sobre la zona circundante para libar el néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas, casualmente recogen las partículas de aire con sus cuerpos velludos mientras recolectan el néctar de las flores, mielatos de hojas e insectos y agua de arroyos, que luego transforman y combinan con sustancias propias que luego depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje, por lo tanto toman muestras de todos los sectores del medio ambiente (vegetación, aire, agua y suelo) en forma natural, realizando un gran trabajo de muestreo exhaustivo del entorno, en el departamento de Arequipa.

Las colonias de las abejas están en constante renovación debido a que los apicultores arequipeños generan familias de abejas constantemente para obtener mayor producción de miel y así desplazarse en zonas donde exista mayor vegetación, la cual está expuesta a los factores contaminantes del medio ambiente.

En la **Figura 24**, que procede de la **Tabla 11** las concentraciones de plomo en los diversos puntos de muestreo de la ciudad de Arequipa, procedemos a una explicar porque se tomó muestras de miel de abejas en estos distritos; en las muestras 1,2,6 y 15 procedentes de los distritos de Yura, Majes, Atico y Chiguata se encontraron las respectivas concentraciones de plomo de 0.91 mg kg^{-1} , 0.97 mg kg^{-1} , 0.99 mg kg^{-1} y 0.90 mg kg^{-1} , estos distritos mayormente son rurales, no están totalmente urbanizadas, el movimiento vehicular es bajo, las fuentes de contaminación de plomo pueden proveer del

suelo, aire y agua; En las muestras 3,5,7,9,12,13 y 14 procedentes de los distritos de Cercado, Uchumayo, Characato, Cotahuasi, Polobaya, Pocsi, Jose Luis Bustamante y Rivero se encontraron las respectivas concentraciones de plomo 1.13 mg kg^{-1} , 1.07 mg kg^{-1} , 1.26 mg kg^{-1} , 1.17 mg kg^{-1} , 1.02 mg kg^{-1} , 1.631 mg kg^{-1} y 1.21 mg kg^{-1} , estos distritos son mayormente urbanizados, con pocos sectores rurales, por lo tanto mayor población, y movimiento vehicular, por lo tanto las fuentes de contaminación de plomo en el medio ambiente afectan los panales que se encuentran en estos distritos; en las muestras 4 y 8 procedentes de los distritos de Lluta y Yanaquihua con concentraciones respectivas de 0.68 mg kg^{-1} y 0.68 mg kg^{-1} , estos distritos son totalmente rurales habiendo pocos habitantes pero aun así las muestras de miel de abejas han sido afectados en menor concentración a comparación de las demás muestras; en las muestras 10 y 11 procedentes de los distritos de Cercado y Socabaya con concentraciones respectivas de 2.74 mg kg^{-1} y 1.864 mg kg^{-1} , en la muestra del distrito de Cercado el resultado obtenido se debe a que ambos distrito son zonas urbanas, los panales ubicados en este sector están expuestos a varias fuentes de contaminación.

Actualmente la apicultura viene siendo practicada en ambientes cada vez urbanizados en la ciudad de Arequipa esto lo pudimos denotar al obtener muestras de miel de abejas de los distritos de Cercado en los panales ubicados en la calle Rivero (2.74 mg kg^{-1}) y en la Calle Jerusalén (1.13 mg kg^{-1}), José Luis Bustamante y Rivero en la calle Cerro Salaverry (1.21 mg kg^{-1}) y Socabaya (1.86 mg kg^{-1}) dejando a las abejas expuestas más fácilmente a contaminantes debido a la gran actividad de recolección en busca de alimento, podemos notar que no es adecuado que se encuentren panales en estos sectores de la ciudad, que sobrepasa los límites máximos permisibles de plomo permitido en miel de abejas que puedan afectar a la salud de la población.

En todas las muestras las concentraciones obtenidas de plomo son elevadas esto nos indica que la ciudad de Arequipa tiene un grave problema de contaminación ambiental de plomo, este tipo de contaminación está llegando a la población mediante la miel de abejas que es un producto primario de origen animal ampliamente consumido en nuestros hogares.

En estudios realizados por Dias Araujo⁴⁰ (2012) en miel de abeja en la ciudad Piracicaba (Brasil), utilizando la misma técnica analítica, el plomo encontrado fue elevado, comparados con los encontrados en este estudio, con un promedio de 2.11 mg kg^{-1} de plomo el resultado encontrado en este muestreo se debe a que la ciudad de Piracicaba es una importante polo regional de desarrollo industrial y agrícola, estando situada en una de las regiones más industrializadas y productivas del Estado de São Paulo , el complejo industrial de la región de Piracicaba está formado por más de cinco mil industrias en sectores metalúrgicos, mecánicos, combustibles y textiles, a comparación del departamento de Arequipa que constituye un importante centro industrial y comercial del Perú siendo catalogada como la segunda ciudad más industrializada del país destacándose las actividades de los sectores metalúrgico, mecánico, textil y combustibles (producción de petroquímicos y de alcohol) teniendo un Parque automotor que en el año 2012 se encontraron registrados 264 mil vehículos según la Superintendencia de los Registros Públicos características parecidas a la ciudad de Piracicaba con la diferencia de tener una mayor población y área industrial. Podemos comprobar que la miel de abejas ya viene siendo utilizada para monitorear metales pesados y otros contaminantes del medio ambiente.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

1. Se validó la técnica voltamperométrica para la determinación de plomo demostrando ser lineal, precisa, con límites de detección de $0.27 \mu\text{g/Kg}$ y de cuantificación de $1.15 \mu\text{g/Kg}$, presentando alta sensibilidad y proporcionando una respuesta segura en relación a la cuantificación de plomo.
2. Se comparó los métodos de digestión en envase cerrado asistida por microondas y digestión por fotólisis UV, entre los cuales no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$).
3. Se determinó que la concentración de plomo en miel de abejas obtenidas tiene como promedio $1.22 (+/- 0.53)$ mg de plomo por kilogramo de miel de abeja. Teniendo como muestra de elevada concentración $2.744 (+/- 0.081)$ en el distrito Cercado y como mínima concentración $0.676 (+/- 0.069)$ mg de plomo por kilogramo en el distrito de Lluta en la ciudad de Arequipa.
4. Se evaluó la concentración de plomo en miel de abejas encontrada en cada muestra obtenida de los diversos puntos de muestreo en la ciudad de Arequipa fue de $1.22 (+/- 0.53)$ mg de plomo por kilogramo de miel de abeja. Estas concentraciones se encuentran fuera del límite máximo permisible establecido por el reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos el cual es de 0.3 mg de plomo por kilogramo de miel de abeja.
5. Se valoró que la miel de abejas puede ser aplicada como un bioindicador ambiental acumulativo nato al detectar la contaminación por plomo a una concentración promedio de 1.22 mg kg^{-1} procedentes del tráfico, zonas industriales y rurales en el departamento de Arequipa, cumpliendo con varios de los requisitos exigidos y presentando ventajas como el fácil manejo, obtención, bajo coste y muestreo selectivo limitado a un área de varios km^2 para aplicarse como un bioindicador ambiental.

RECOMENDACIONES

1. Diseñar una normativa para determinar niveles de metales pesados en miel de abeja.
2. Se recomienda desarrollar más investigaciones en las abejas y sus productos como el polen, jalea y propóleos para identificar otras fuentes de contaminación como otros metales pesados, insecticidas y plaguicidas en el departamento de Arequipa.
3. Se recomienda a los apicultores ubicar exclusivamente en zonas rurales sus panales, para poder cosechar miel de abeja libre de contaminantes.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

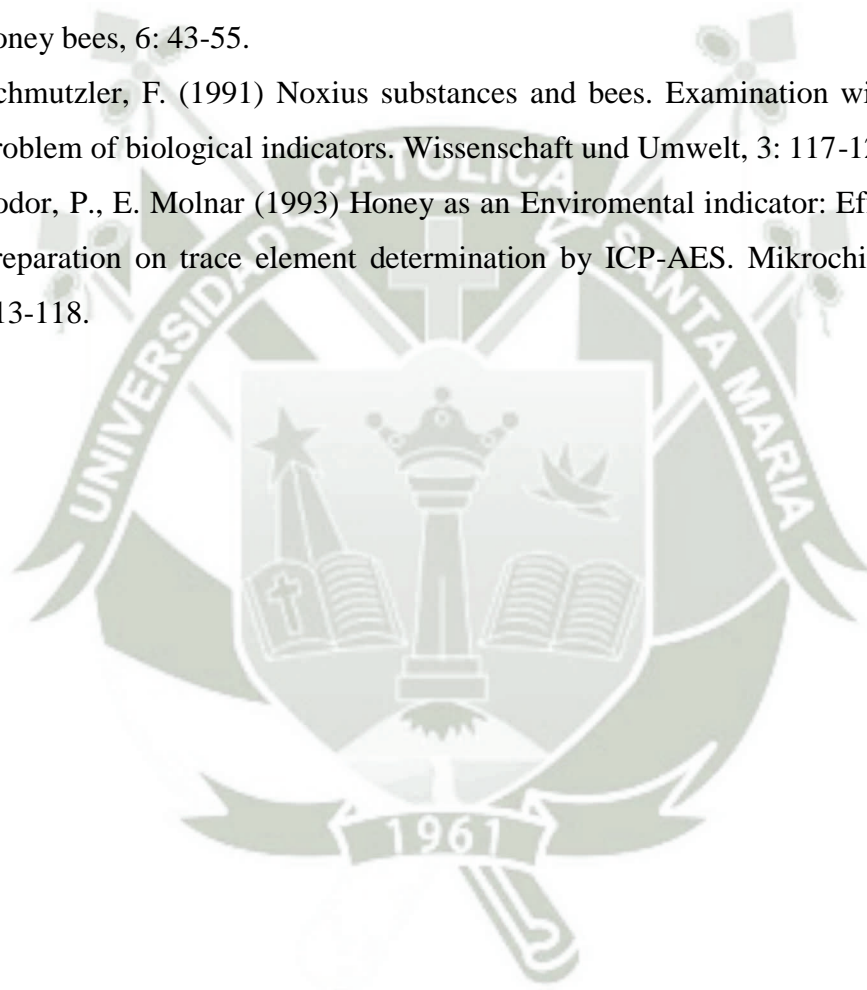
1. M.C. Fernández Maeso, E. Subrá Muñoz de la torre, A. Ortiz Valbuena, “La Miel, indicador ambiental” Centro Regional Apícola de Castilla- La Mancha.19180 Marchamalo(Guadalajara), 1994, Pág. 36-44
2. Watanabea, Z.W.Zhangb, J.B.Quc, W.P.Gaod, Z.K.Jiand, S.S.,Haruo Nakatsukae,N.M.Inoguchie,K.H.Masayuki Ikedaf, “Background lead and cadmium exposure of adult women in Xian City and two farming villages in shaanxi Province, China” The science of the Total environment 247_2000
3. M.G. Mayer, D.N.”Health and safety the downward trend in lead levels” Wilson Journal of Power Sources 73, 1998.
4. Q.Wang, H.H Zhao, J.W.Chen, K.D.Gu, Y.Z.Zhang,Y.K.Zhou,L.X.Ye”Adverse health effects of lead exposure on children and exploration to internal lead indicator” Science of the total Environment 407 (2009)
5. Codex Alimentarius, Codex Norma para la Miel, Paso 1: Portal principal en español del Codex Alimentarius; Paso 2: Normas Oficiales; Paso 3: Normas Oficiales del Codex; Paso 4: Lista; Paso 5: Buscar por título <http://www.codexalimentarius.net/>
6. Acquarone Carolina, “Parámetros fisicoquímicos de mieles, relación entre los mismos y su aplicación potencial para la determinación del origen botánico y/o geográfico de mieles argentinas” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Licenciatura en Tecnología de Alimentos, Universidad de Belgrano, 2004, Pág.3
7. Hooper, T. Guide to Bees and Honey. Gran Bretaña: Blandford Press Ltd.;1976.
8. Procuraduría Federal del Consumidor (Profeco) “Calidad de la miel de abejas” Organismo para la defensa de los derechos del consumidor en México, Revista del Consumidor No. 287, Enero 2001, Pág.1
9. Reglamento técnico de la MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos (Derogación de la RES.GMC N°102/94 y N° 35/96) pág.8
10. Resolución Ministerial N° 591-2008-SA/DM publicada el 27 de Agosto del 2008 en el Diario Oficial “El Peruano” <http://www.digesa.minsa.gob.pe/> Paso 1: Portal de DIGESA; Paso 2: Normas Legales: Alimentos; Paso 3: Norma Sanitaria de Requerimiento Microbiológico

11. García, I; Dorronsoro, C. “Contaminación por metales pesados”, Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada (España), 2001. Lección 15 Disponible en World Wide Web: <http://edafología.ugr.es/conta/tema15/> , consultado el 10/11/12.
12. J. Devillers, J. C. Doré, C. Viel, M. Marengo, F. Poirier-Duchên, N. Galand and M. Subirana. Honey bees: estimating the environmental Impact of chemicals London: M. H. Taylor & Francis, 2002, pp. 248.
13. FAO <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s00.htm#Contents>, consultado el 28/08/13
14. Schütz A, Skerfving S, Mattson S, Christoffersson J, Ahlgren L. “Lead in vertebral bone biopsies from active and retired lead workers” Arch Environ Health 1987 Nov-Dec; Vol. 42 N° (6); 340-6.
15. Silbergeld EK. Lead in bone, “Implications for toxicology during pregnancy and lactation”, Environ Health Perspective 1991; Vol 91, pág. 63
16. Thompson GN, Robertson EF, Fitzgerald S., “Lead mobilization during pregnancy” Med J Aust 1985; pág. 143.
17. Willy Ramos Leopoldo Munive, Milena Alfaro, Martha Calderón, Isidro problemática ambiental en el Perú”. Rev. Perú Epidemiología. Vol. 13 No 2 Agosto 2009.
18. Rubio C., Gutierrez SJ. Martín Izquierdo RE, Lozano G y Hardisson A. “El plomo como contaminante alimentario” Rev. Toxicológica No 21 (2004), 72-80.
19. Rebeca C. Gracia, Wayne R. Snodgrass, “Lead toxicity and chelation therapy”, Am J health-syst pharm Vol. 64 jan 1, 2007.
20. Banco Mundial, Unidad de desarrollo sostenible de la región de América Latina y el Caribe, “República del Perú: Análisis Ambiental del Perú: Retos para un desarrollo sostenible”, Volumen I: Resumen Ejecutivo, Mayo, 2007.
21. Godofredo Pebe, Hugo villa, Luis Escate, Gonzalo Cervantes, “Niveles de plomo sanguíneo en recién nacidos de la Oroya, 2004-2005” Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008; 25(4): 355-60
22. Política Nacional de Salud Ambiental 2011 – 2020: Documento técnico (R.M. N° 258-2011/MINSA) / Ministerio de Salud. Dirección General de Salud Ambiental - Lima: Ministerio de Salud; 2011. 32 p.

23. Banco Mundial, Unidad de desarrollo sostenible de la región de América Latina y el Caribe, “República del Perú: Análisis Ambiental del Perú: Retos para un desarrollo sostenible”, Volumen I: Resumen Ejecutivo, Mayo, 2007.
24. Ramirez, Augusto V. El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. An. Fac. med., ene./mar. 2005, vol.66, no.1, p.57-70. ISSN 1025-5583.
25. Gunter Henze, “Introduccion to polarography and Voltammetry”, MethromLtd.Ch9101 sa Herisau.
26. An introduction in theory, metrohm Ltd.CH-9100,Herisau Switzerland, Voltammetry.
27. Harvey.D.DePauw University.”Modern Analytical Chemistry”, McGraw-Hill Higher Education.2000,Pág 508-520.
28. Somenath Mitra Department of Chemistry and Environmentak Science New Jersey Institute of Technology, “Sample preparation techniques in analytical chemistry” Johm Wiley. Publication, Vol. No 162, Pag: 227-245.
29. M.Grac, A.de Korn,E.Santos da Boa, D.C. Muniz,J. Texeira,J. Pereira, A.Paixa, A.Pires, B. Welz, W.P.Carvalho,E.Batista y M.Korn; “Sample preparation for the determination of metals in food samples using Sptroanalytical Methods”.Applied Spectroscopy Reviews,vol:48, N°3 ; 2008.
30. Yingjian Li, Famararz Wahdat and Rolf Neeb.Digestion-free determination of heavy metals (Pb, Cd, Cu) in honey using anodic stripping differential pulse voltammetry and potentiometric stripping analysis.
31. Florian, D.; Knapp,G;Anal.Chem.2001,73 (7),1515-1520,disponible en http://www.s_prep.com/B83IE29A_Microwave_assisted_UV_Digestion.pdf.consultado el 25/11/2012.
32. 705 UV Digester (220 V,60 Hz),Sample preparation in VA,disponible: <http://products.metrohm.com/polarography/va-sample-preparation/prod-27050016.aspx>. consultado 26/11/2012.
33. Manual Software versión 1.3.x 757 VA Computrace, pág: 213-254.
34. Application Bulletin”Determination of Zn,Cd,Pb and Cu” Transition and heavy metals in water N°.231/2 e Metrohm.
35. Asociación española de farmacéuticos de la industria, “Validación de métodos analíticos”, Gráficas Gispert S.A., Barcelona – Marzo 2001, pág: 45-94

36. J.N. Miller, J.C Miller; “Estadística y quimiometría para química analítica”, 4^{ta} Edición; Pearson Educación S.A. Madrid 2002 pág.: 21-72
37. AOAC Guidelines for single laboratory – 2002, disponible en: http://www.aoac.org/vmeth/Validation_Guidelines.htm, consultado el 22/08/2012
38. “Trace Heavy Metal Levels in Microwave Digested Honey Samples from Middle Anatolia”, Turkey 2005.
39. Hassan, A., M.A.A. Ghandour, A.M.M. Ali and H.A. Mahran, 2010. Evaluation of lead, cadmium and copper concentrations in bee honey and edible molasses. *Am. J. Applied Sci.*, 7: 315-322.
40. Araújo, D. F. D. (2013). Mel de abelhas *Apis mellifera* (L.) como ferramenta para bioindicación de poluição ambiental. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. Recuperado em 2013-11-27, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-12032013-165117/>.
41. World Health organization Leaf in drinking wáter. Copenhagen, 2005. Disponible en:http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/dwq/chemicals/mercuryfinal.pdf. Consultado en: 12 /09/2012.
42. Tatsuno, T., T. Shiroti, M. Iwaida et al. (1968) Determination of harmful metals in foods: VII. Lead and copper contents in honey. *J. Hyg. Chem.*, 14: 327-330.
43. Petrov, V. (1970) Mineral constituents of some Australian honeys as determined by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Res.*, 9: 95-101.
44. Lasceve, G, M. Gonnet (1974) Analyse par radioactivation du contenu minéral d’ un miel. Possibilité de préciser son origine géographique. *Apidologie*, 5: 201-223.
45. Tong, S.C., R.A. Morse, A.C. Bache, J.D. Lisk (1975) Elemental Analysis of Honey as an Indicator of Pollution. Forty-seven elements in honeys produced near highway, industrial and mining areas. *Arch. Environ. Health*, 30: 329-332.
46. Kayser, D., U.R. Boehringer, F. Schmidt-Bleet (1982) Environmental Monitoring Assessment, 1: 241.
47. Kulike, H, M. Voget (1983). Bienenhonig als biologischer Indikator für die Blei- und Cadmiun- Immission aus der Luft. *Allg. dt. Imkerztg* 17(10): 323-324.
48. Kerkvliet, J.D. (1983) Lood en cadmiungehaltes van honig. *Maandschr. Bijent.*, 85: 251-253.

49. Jones, K.J. (1987) Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water, Air, and Soil Pollution*, 33: 179-188.
50. Bogdanov, S., B. Zimmerli, M. Erard (1986) Heavy metals in honey. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 77: 153-158.
51. Serra Bonvehí, J. (1989) Características físico-químicas. Composición de la miel de eucalipto (*Eucaliptus* sp.) producida en España. *Anales de Bromatología*, 41: 41-56.
52. Rowarrt, J.S. (1990) Lead concentration in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, 29: 177-180.
53. Accorti, M., R. Guarcini, G. Modi, L. Persano Oddo (1990) Urban pollution and honey bees, 6: 43-55.
54. Schmutzler, F. (1991) Noxious substances and bees. Examination with lead to the problem of biological indicators. *Wissenschaft und Umwelt*, 3: 117-120.
55. Fodor, P., E. Molnar (1993) Honey as an Enviromental indicator: Effect of sample preparation on trace element determination by ICP-AES. *Mikrochim. Acta*, 112: 113-118.



ANEXOS

1. Datos obtenidos durante la medición voltamperométrica en muestras digeridas por fotólisis UV.

N°	Pb	±	Pb	±	Pb	±	Pb	±	X	±	Pb	±	Factor Pb	Concentración final Pb mg/L	±
1	6.60	0.77	5.63	0.47	5.47	0.45	5.90	0.56	5.90	0.45	4.56	0.45	0.20	0.91	0.09
2	4.24	0.79	5.72	0.67	8.57	0.43	6.17	0.63	6.17	0.52	4.83	0.52	0.20	0.97	0.10
3	6.19	0.76	7.24	0.39	7.50	0.67	6.98	0.60	6.98	0.50	5.64	0.50	0.20	1.13	0.10
4	4.39	0.47	5.56	0.43	4.21	0.46	4.72	0.45	4.72	0.34	3.38	0.34	0.20	0.68	0.07
5	6.16	0.64	6.69	0.76	7.27	0.60	6.71	0.67	6.71	0.56	5.36	0.56	0.20	1.07	0.11
6	6.31	0.42	6.42	0.48	6.18	0.58	6.30	0.49	6.30	0.38	4.96	0.38	0.20	0.99	0.08
7	7.91	0.63	7.86	0.60	7.16	0.44	7.64	0.56	7.64	0.45	6.30	0.45	0.20	1.26	0.09
8	4.71	0.37	4.94	0.31	4.55	0.47	4.73	0.38	4.73	0.27	3.39	0.27	0.20	0.68	0.05
9	7.02	0.36	7.47	0.49	7.02	0.51	7.17	0.46	7.17	0.35	5.83	0.35	0.20	1.17	0.07
10	16.70	0.99	14.54	0.52	13.95	1.00	15.06	0.84	15.06	0.73	13.72	0.73	0.20	2.74	0.15
11	11.00	0.42	10.34	0.41	10.64	0.71	10.66	0.51	10.66	0.40	9.32	0.40	0.20	1.86	0.08
12	6.66	0.80	6.27	0.37	6.46	0.58	6.46	0.58	6.46	0.47	5.12	0.47	0.20	1.02	0.09
13	9.13	0.94	9.80	0.80	9.56	0.61	9.49	0.78	9.49	0.67	8.15	0.67	0.20	1.63	0.13
14	7.08	0.80	7.21	0.31	7.86	0.68	7.39	0.60	7.39	0.49	6.04	0.49	0.20	1.21	0.10
15	5.84	0.39	6.13	0.68	5.75	0.56	5.91	0.55	5.91	0.44	4.56	0.44	0.20	0.91	0.09

2. Datos obtenidos durante la medición voltamperométrica en muestras digeridas a presión por microondas.

N°	Pb	±	Pb	±	Pb	±	X	±	Pb	±	Factor Pb	Concentración final de Pb	±
1	6.75	0.41	6.12	0.24	6.56	0.26	6.47	0.30	4.50	0.06	0.20	0.90	0.01
2	6.89	0.74	6.93	0.56	7.51	0.57	7.11	0.62	5.14	0.38	0.20	1.03	0.08
3	6.52	0.62	6.87	0.73	7.85	0.43	7.08	0.59	5.10	0.35	0.20	1.02	0.07
4	5.90	0.34	5.14	0.50	5.89	0.90	5.64	0.58	3.66	0.33	0.20	0.73	0.07
5	7.01	0.33	7.83	0.72	6.43	0.13	7.09	0.39	5.11	0.14	0.20	1.02	0.03
6	6.34	2.36	6.25	0.59	6.99	0.06	6.53	1.00	4.55	0.76	0.20	0.91	0.15
7	8.99	0.54	8.25	0.36	8.79	0.93	8.68	0.61	6.70	0.37	0.20	1.34	0.07
8	6.34	0.39	6.52	0.42	5.52	0.42	6.13	0.41	4.15	0.17	0.20	0.83	0.03
9	8.12	0.45	8.06	0.66	7.59	0.27	7.93	0.46	5.95	0.21	0.20	1.19	0.04
10	16.74	1.35	13.62	0.79	13.56	0.57	14.64	0.90	12.66	0.66	0.20	2.53	0.13
11	10.85	0.48	10.11	0.34	10.44	0.51	10.47	0.44	8.49	0.20	0.20	1.70	0.04
12	6.62	0.42	7.29	0.59	7.16	0.36	7.03	0.46	5.05	0.21	0.20	1.01	0.04
13	9.79	0.91	9.32	0.48	9.79	0.91	9.63	0.76	7.66	0.52	0.20	1.53	0.10
14	7.43	0.60	7.49	0.66	7.76	0.88	7.56	0.71	5.58	0.47	0.20	1.12	0.09
15	5.36	0.59	5.52	0.42	5.79	0.39	5.56	0.47	3.58	0.22	0.20	0.72	0.04