Apimondia

www.apimondia.org

Beekeeping Technology and Bee Products Commission

"LA MIEL"

Propiedades, Composición Y Análisis Físico- Químico

Susana Beatriz Fattori
Licenciada en Ciencias Químicas
Universidad de Buenos Aires
República Argentina

Dirección Nacional de Derecho de Autor
Expediente Nº 359100 (22 de octubre de 2004)

INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento natural producido por las abejas desde tiempos inmemoriales, aún antes de que el hombre poblara la tierra. Las abejas aparecieron en la tierra hace 60.000.000 de años. En Egipto eran los sacerdotes quienes practicaban la apicultura, utilizaban la miel para aliviar los dolores gástricos, en las tumbas de los faraones se han encontrado vasijas conteniendo miel.

Inicialmente las abejas vivían en cavidades naturales. Hacia fines del siglo XIX, con la invención de la colmena la apicultura sufrió un cambio revolucionario y para muchos apicultores se convirtió en una actividad profesional.

La República Argentina es el tercer productor mundial de miel, la mayor parte de la producción se exporta ya que el consumo interno es muy bajo, escasamente se consumen entre 200 y 300 gramos / habitante / año.

Actualmente existen en el mercado infinidad de alimentos industrializados que, no sólo aportan los requerimientos diarios de nutrientes sino que son atractivos, fáciles de preparar y gozan de una gran aceptación por parte del consumidor.
En el extremo opuesto se ubican los alimentos primarios, con su rica y variada composición química y con la invalorable cualidad de ser naturales.
En el intrincado y fascinante mundo de los alimentos la miel posee un lugar privilegiado. Un alimento natural, que no puede contener ningún tipo de aditivo, con importantes propiedades nutricionales y terapéuticas y características sensoriales atractivas; elaborada por una comunidad con una organización y predisposición al trabajo sorprendentes.
Además de la miel, que ha sido recolectada y apreciada durante miles de años, las abejas producen otros invalorables alimentos con importantes propiedades tales como el polen, la jalea real, el propóleos y la cera.

Este libro está dedicado enteramente al estudio de la miel. Es una recopilación de información de diversas fuentes bibliográficas y el resultado de largas charlas sostenidas con especialistas en el tema, asistencia a congresos y seminarios y de la propia experiencia.
Gracias a los cientos de investigadores que invirtieron valiosas horas en el estudio del entrañable universo de la química fue posible este libro, como resultado de su labor hoy disponemos de innumerable cantidad de datos y técnicas analíticas adaptadas o diseñadas especialmente para el análisis físico-químico de la miel.

En las referencias bibliográficas fueron incluidas todas las fuentes consultadas, si alguna hubiese sido omitida, habrá sido por error, en ningún momento la autora tuvo la intención de tomar como propia la información brindada por los especialistas.

El principal objetivo perseguido en este libro fue reunir datos, técnicas de análisis y diferentes conceptos que pudieran guiar a aquellos que se inician en el control de calidad de la miel. Este libro está dirigido a jóvenes investigadores, docentes, bromatólogos y estudiantes. Tal vez aquellos profesionales que se dedican a la investigación puedan encontrar en sus páginas tema para el desarrollo de nuevos métodos de análisis y finalmente también resulte de utilidad para aquellas personas que procesan este alimento y quienes, en muchos casos por

desconocimiento de la compleja naturaleza y labilidad del producto, lo someten a tratamientos que alteran sus características físico-químicas.

En primer lugar se presenta la definición de la miel, todo químico debe conocer perfectamente cual es la naturaleza del producto que va a analizar, no sólo para manipular correctamente la muestra sino para seleccionar los análisis pertinentes de acuerdo con lo que desea buscar.
Se consideró oportuno transcribir los valores aceptados por la legislación vigente, regional e internacional, para los diferentes parámetros físicos y químicos.

El segundo capítulo ofrece un panorama de las características físicas del producto y sus caracteres sensoriales poniendo un énfasis especial en la determinación del color, análisis que reviste gran importancia desde el punto de vista comercial.

A continuación se dedica un capítulo a la composición química de este alimento, se describen los componentes que deben necesariamente analizarse y porque razón.

En los tres capítulos subsiguientes, a los ojos de su autora el corazón del libro, se describen los métodos de análisis disponibles para determinar su composición físico-química, detectar la presencia de adulterantes y de los principales residuos de medicamentos y contaminantes que pueden encontrarse. Este último tema es tan extenso y complejo que ameritaría un libro dedicado solamente a ellos ya que en la mayoría de los casos es área de especialistas.

El capítulo final posee los lineamientos generales y la metodología de análisis para el estudio nutricional de la miel.

Cabe aclarar que la selección de los métodos de análisis aplicables a la miel no fue sencilla, existe gran diversidad de métodos y dado el gran avance en el campo instrumental habrá nuevos cuando este libro esté publicado. Se incluyó la metodología clásica, que proporciona resultados muy confiables y es fácil de llevar a la práctica y métodos más sofisticados y actuales.

CAPÍTULO I

MIEL

√ **Definición**

√ **Extracción**

√ **Legislación**

DEFINICIÓN

La miel es el producto obtenido por abejas domésticas a partir del néctar y exudados sacaríneos de las plantas, libado, modificado y almacenado en colmenas.
El néctar es recogido de las flores por las abejas que lo almacenan en su saco para miel mientras se encuentran en el campo. En la colmena depositan la miel, ya transformada, en celdas abiertas, hexagonales, construidas con cera que segregan por medio de glándulas especiales. Son celdas bien ventiladas donde se produce pérdida de agua e hidrólisis de la sacarosa, etapa que se conoce como maduración de la miel.
Cuando el acondicionamiento ha terminado, las abejas sellan las celdas con una capa de cera (operculado)

Internacionalmente se acepta que la miel es la sustancia dulce natural producida por abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena.

La miel, tal cual se la extrae del panal, es una dispersión acuosa de material con partículas cuyo tamaño varía en un amplio rango, desde iones inorgánicos, azúcares y otros materiales orgánicos en verdadera solución hasta macromoléculas de proteínas y polisacáridos en dispersión coloidal; esporas de hongos y levaduras, granos de polen y una gran cantidad de partículas (White, 1969)

Es un alimento muy estable debido a su baja actividad acuosa, bajo pH y presencia de sustancias antimicrobianas.

En términos generales se puede considerar que la materia prima para la elaboración de la miel está constituida fundamentalmente por hidratos de carbono tales como: sacarosa, fructosa, glucosa. La composición del néctar, a partir del cual las abejas fabrican la miel es muy variada y depende fundamentalmente de su origen. Desde el punto de vista de su composición glucídica es posible afirmar que existen néctares constituidos mayoritariamente por sacarosa, con bajas concentraciones de fructosa y glucosa (20% y 5% respectivamente), mientras que otros como por ejemplo el de colza, poseen vestigios de sacarosa y cantidades aproximadamente iguales de glucosa y fructosa (50% y 45% respectivamente) Entre ambos se ubican aquellos néctares que poseen cantidades aproximadamente iguales de los tres azúcares.
El néctar posee otros componentes menores tales como: almidón, gomas, tanino, sustancias minerales y ácidos oxálico, málico y tartárico. El contenido de nitrógeno y de vitaminas es bajo y su pH es ligeramente alcalino.

Las sustancias minerales son asimiladas parcialmente por la abeja durante la elaboración de la miel, el almidón se convierte en dextrinas y el tanino, responsable del sabor astringente, se oxida al menos en parte (Winton, 1939)

En épocas de escasez de néctar, la abeja busca alimento en otras fuentes de azúcar y frecuentemente recoge mielada elaborando la llamada miel de mielada o su mezcla con miel de flores.

La mielada es producida por ciertos hemípteros pertenecientes al orden *Rhynchota*, capaces de perforar los tejidos vegetales y aspirar savia.
El insecto succiona una gran cantidad de savia que no puede digerir totalmente de modo que una parte lo deposita sobre el vegetal y es allí donde la abeja toma su material para la elaboración de la miel de mielada.

La composición de la mielada difiere de la composición de la savia porque el insecto produce modificaciones físico-químicas, principalmente por la acción de enzimas. La mielada puede llegar a contener hasta 50% de sacarosa y otros disacáridos, el 50% restante está conformado por glucosa y fructosa en relación 1:2.

Algunos de los insectos productores de mielada son: cochinilla, mosca blanca, cigarra y pulgón (Horn, 1996)

Existen mieles florales y de mielada que son tóxicas porque provienen de néctar de flores que contienen principios activos tóxicos o de mielada de árboles con sustancias tóxicas en su savia. Las sustancias tóxicas que se encuentran son alcaloides, el consumo de estas mieles es riesgoso porque ejercen su acción fundamentalmente sobre el sistema nervioso central.

La composición, color y aroma de la miel dependen de las flores cuyo néctar libaron las abejas. Influyen, entre otros factores, la naturaleza del suelo, el manejo apícola y la temperatura de almacenamiento.

La temperatura de almacenamiento es importante no solamente desde el punto de vista de la preservación de los caracteres organolépticos sino también de su conservabilidad, principalmente en lo referente a la fermentación. La temperatura de almacenamiento de la miel recién cosechada debe ser inferior a 10 °C (50 °F) y la de la miel procesada y envasada entre 18-24 °C (64-75 °F)

La miel según su origen se clasifica en:

- *Miel de flores: aquella obtenida principalmente de los néctares de las flores.*
- *Miel de mielada: aquella obtenida primordialmente a partir de las secreciones de las partes vivas de las plantas o de insectos succionadores presentes en ellas.*

A pesar de que la legislación internacional utiliza el término miel para definir exclusivamente al producto elaborado por las abejas, el uso de ese vocablo no es exclusivo para este alimento obtenido de la colmena. Ejemplos de ello son la miel de azufaifa y la miel de caña.

La miel desde el punto de vista nutricional es un alimento energético, la alta concentración de azúcares de fácil asimilación juntamente con los minerales y vitaminas que posee la convierten en un invalorable alimento natural. Sobre la base de su composición media es posible calcular que 100 gramos de miel proveen alrededor de 320 Kcal.

Posee mayor poder endulzante que la sacarosa y a diferencia de esta no es un alimento refinado, es un edulcorante nutritivo natural que incluso podría utilizarse en menor cantidad que el azúcar para lograr el mismo efecto.

La alta presión osmótica es importante para el organismo porque aumenta la absorción de los azúcares. Este hecho conjuntamente con la predominancia de azúcares de fácil asimilación la convierten en una importante fuente de energía para atletas y personas sometidas a esfuerzos físicos.

Los azúcares complejos de la miel se absorben en el organismo por "transporte activo", hecho que condiciona la velocidad de absorción ya que esta depende de la disponibilidad de moléculas encargadas de llevar a cabo ese transporte. Como consecuencia, aquellos enfermos que sufren perturbaciones en el metabolismo de los glúcidos y que deben consumir una dieta baja en azúcares tendrán menor riesgo de un aumento brusco de glucosa en la sangre que con la sacarosa.

Cuando se la combina con alimentos ricos en proteínas o en grasas ayuda a su digestión. Acelera el metabolismo del alcohol. Contribuye a la motilidad intestinal y a la absorción de calcio.

Es beneficiosa en algunos cuadros respiratorios agudos ya que posee efecto antitusígeno y balsámico, este último debido a la presencia de diferentes flavonoides.

Posee propiedades bactericidas, el *Streptococcus mutants,* responsable de la producción de caries, se muere por acción del agua oxigenada producida por la glucosa-oxidasa que contiene y el oxígeno cuando se coloca miel en la boca y se degusta.

También se ha comprobado su acción antimicrobiana frente al *Helicobacter pylori* a quien se responsabiliza de producir úlcera gástrica.

PROCESO DE EXTRACCIÓN

El primer paso en el proceso de extracción de la miel consiste en la remoción de los opérculos con los cuales las abejas cierran las celdas del panal una vez que la miel está madura, *desoperculado*.

A continuación la miel es separada de las celdas mediante alguno de los siguientes procesos:

a) *Escurrido de los panales.*
b) *Trituración y prensado de los panales*, acelera el proceso de separación.
c) *Centrifugación de los panales*.

Luego se somete a un proceso de *filtrado* con el objeto de eliminar los fragmentos de cera, abejas y otras impurezas.

La miel puede dejarse en reposo, *decantado*, para eliminar las burbujas de aire y separar las partículas de cera y otros cuerpos extraños ligeros que se depositan en la superficie; los pesados quedan en el fondo del recipiente que la contiene.

La mayor parte de la miel que se comercializa actualmente procede de la centrifugación de los panales.

El método de prensado de los panales está en desuso porque el producto obtenido de este modo presenta un acentuado sabor a polen y a cera, sobre todo si proviene de panales viejos. Es un procedimiento caro porque se destruye el panal (Piana, 1989)

La miel obtenida por escurrido de los panales es poco común porque su procesamiento requiere mucho tiempo lo que favorece el intercambio de humedad con el ambiente.

En la República Argentina la miel está legislada en los artículos 782 y 783 del Código Alimentario Argentino. A lo largo del tiempo estos artículos fueron modificados y actualmente su texto fue reemplazado por la Resolución MERCOSUR sobre la miel. Es interesante hacer

notar como fueron evolucionando, con el paso del tiempo, las diferentes definiciones para los distintos tipos de miel. Inicialmente, en el artículo 783 se enumeraban las denominaciones permitidas para diferenciar las distintas presentaciones comerciales del alimento (C.A.A., 1998)

- ***Miel de panal****: miel que se encuentra aún en los panales no desoperculados, construidos por las abejas.*
- ***Miel virgen o Miel de gota****: producto que fluye espontáneamente de los panales o alzas melarias que nunca han contenido cría, cosechada por medios mecánicos (extractor o centrífuga)*
- ***Miel cruda****: producto natural tal cual se extrae del panal, sin ser calentado.*
- ***Miel centrifugada****: miel obtenida por centrifugación.*
- ***Miel prensada****: miel obtenida por compresión en frío de los panales desoperculados.*
- ***Miel mucilaginosa o gomosa****: miel obtenida por compresión en caliente de los panales desoperculados.*
- ***Miel sobrecalentada****: es la miel calentada a más de 70 °C hasta inactivar sus enzimas.*
- ***Miel batida****: miel obtenida golpeando los panales juntamente con la miel en ellos contenida.*

En el año 1979 se modificaron los artículos 782 y 783 mediante la Resolución 3363, 30/10/79. Este cambio estableció una nueva clasificación para la miel la cual quedó incluida en el artículo 782:

- ***Miel en panal****: miel depositada por las abejas en panales de reciente construcción y sin larvas y vendida en panales enteros no desoperculados o en secciones de panales.*
- ***Miel prensada****: se obtiene mediante la compresión de los panales sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado.*
- ***Miel líquida****: se obtiene mediante la centrifugación o acción de la gravedad, de los panales desoperculados y sin larvas.*
- ***Miel sólida****: miel líquida que ha cristalizado en forma espontánea.*
- ***Miel pasteurizada****: miel cruda que ha sido sometida a calentamiento a temperaturas entre 55 y 65 °C y cuyo índice de Gothe sea mayor de 8.*
- ***Miel sobrecalentada****: es miel calentada por encima de 65 °C y cuyo índice de Gothe sea inferior a 8, en tanto responda a las demás características de la miel.*

Mediante la Resolución 2256, 16/12/85 se modificaron nuevamente los citados artículos y se estableció la siguiente clasificación:

- ***Miel en panal****: miel depositada por las abejas en panales de reciente construcción, sin larvas y comercializada en panales enteros operculados o en secciones de los mismos.*
- ***Miel centrifugada****: miel que se obtiene por centrifugación de los panales desoperculados y sin larvas.*
- ***Miel prensada****: miel que se obtiene mediante la compresión de los panales sin larvas.*
- ***Miel sobrecalentada****: es miel calentada que responde a las exigencias del Código exceptuando el índice de Gothe y/o el contenido de hidroximetilfurfural que podrán ser menor de 8 y mayor de 40 miliequivalentes/kg, respectivamente.*
- ***Miel para uso industrial****: es miel que responde a las exigencias del Código exceptuando el índice de Gothe y/o el contenido de hidroximetilfurfural que podrán ser menor de 8 y mayor de 40 miliequivalentes/kg, respectivamente.*

La clasificación actualmente vigente está establecida por la Resolución MERCOSUR 15/94, en ella se diferencian las mieles de acuerdo con el procedimiento de obtención, la forma de presentación y su destino. Según el procedimiento de obtención se diferencian en:

- ***Miel escurrida****: miel obtenida por escurrimiento de los panales desoperculados y sin larvas.*
- ***Miel prensada****: miel obtenida por prensado de los panales sin larvas.*
- ***Miel centrifugada****: miel obtenida por centrifugación de los panales desoperculados y sin larvas.*
- ***Miel filtrada****: miel sometida a un proceso de filtración sin alterar su valor nutritivo.*

Según su presentación puede clasificarse de la siguiente forma:

- ***Miel****: miel en estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas.*
- ***Miel en panales o miel en secciones****: miel almacenada por las abejas en celdas operculadas de panales nuevos, construidos por ellas mismas que no contengan larvas y comercializada en panal entero o secciones de tales panales.*
- ***Miel con trozos de panal****: miel que contiene uno o más trozos de panales con miel, exentos de larvas.*
- ***Miel cristalizada o granulada****: miel que ha experimentado un proceso natural de solidificación como consecuencia de la cristalización de la glucosa.*
- ***Miel cremosa****: es la miel que tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura y que la haga fácil de untar.*

Según su destino se clasifica de la siguiente manera:

- ***Miel para consumo directo****: miel que responde a las características físico-químicas establecidas por la Resolución.*
- ***Miel para utilización en la industria (miel para uso industrial)****: miel que responde a las características físico-químicas establecidas por la Resolución, excepto el índice de diastasa y el contenido de hidroximetilfurfural que podrán ser menor de 8 (en la escala de Gothe) y mayor de 40 miliequivalentes/kg hasta un máximo de 80 miliequivalentes/kg, respectivamente.*

La *miel cremosa*, tal cual se definió anteriormente es aquella miel sometida a un proceso físico que le confiere una estructura cristalina fina y la hace fácil de untar. El proceso de cristalización es provocado y controlado.

La pasteurización es otra herramienta que permite controlar la cristalización porque evita la formación de núcleos de cristalización, además de destruir las levaduras que siempre están presentes en el producto. Si luego del tratamiento térmico se respetan las buenas prácticas de elaboración y no se produce una contaminación posterior la miel no fermentará. La temperatura de pasteurización recomendada (White, 1980) es de 62,8 °C (aproximadamente 145 °F) durante 30 minutos. El calentamiento debe realizarse lo más rápidamente posible y una vez alcanzado el tiempo de proceso debe enfriarse inmediatamente. Disminuir la temperatura de un batch de miel no es tarea fácil, el tiempo requerido para que alcance la temperatura ambiente por sí sola sería demasiado largo y como consecuencia el daño en la actividad diastásica y de

la invertasa irreparable. Deben utilizarse equipos especialmente diseñados para la pasteurización de miel.

El proceso de filtración también retarda la cristalización porque retiene cristales grandes de glucosa, partículas de polen, burbujas de aire y otras partículas que pueden actuar como núcleos de cristalización. Este fenómeno puede prevenirse calentando el producto a 71,1°C (160 °F) durante 30 minutos (White, 1980)

El tratamiento de la miel debe realizarse con prudencia para no alterar sus caracteres físico-químicos, es indispensable respetar las buenas prácticas de manufactura durante todo su procesamiento. La miel así obtenida podrá denominarse *"miel ecológica"* o *"miel orgánica"*, términos en auge en nuestros días y que en el caso de la miel podrían ser redundantes.
Se trata de un alimento elaborado naturalmente, el hombre solo interviene en el proceso de extracción y envasado y si tiene en cuenta ciertas precauciones estaría obteniendo un alimento ecológico u orgánico.
Que una miel sea considerada "orgánica" depende del manejo apícola, de la sanidad de la colmena y de las condiciones del medio ambiente que rodea a la abeja, al igual que las condiciones bajo las cuales se procesa el producto. La vegetación melífera no puede recibir tratamiento con agroquímicos, las colmenas deben estar alejadas más de 1,5 km. de las zonas urbanas, fabriles o de cultivos convencionales. Debe realizarse prevención de enfermedades y utilizar solamente los productos aprobados para desinfección y varroasis.
El apicultor tiene en sus manos el cuidado de la colmena, quienes se encargan de elaborar el alimento son las abejas, es indispensable que respete el tiempo mínimo necesario para que la miel esté madura antes de cosecharla. Una vez extraída la miel debe conservarse naturalmente, estar límpida, poseer aroma y flavor característicos y ser de consistencia atractiva.

Los recipientes en los cuales se envase el producto deben ser apropiados para estar en contacto con alimentos y estar correctamente rotulados, no debe engañarse al consumidor sobre su contenido.

Tal vez el punto más importante a lo largo de toda la cadena de producción sea su genuinidad, no existe justificativo para eludir la responsabilidad si en el producto se detectan sustancias extrañas a su composición.

LEGISLACIÓN

Las exigencias de composición y calidad que debe cumplir la miel están contempladas por diferentes legislaciones. En la República Argentina las características físico-químicas del producto deben estar de acuerdo con los requisitos establecidos en el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel. Internacionalmente se dispone de la Norma del Codex Alimentarius para la Miel y a nivel regional de la Directiva de la Unión Europea para la Miel.

Es interesante detenerse para analizar como fueron cambiando las exigencias para este alimento. A continuación se enumeran las diferentes modificaciones que se suscitaron a lo largo de los años gracias a los avances tecnológicos y a un mayor conocimiento del producto.

Algunos de los parámetros físico-químicos fueron eliminados y otros incluidos, hasta llegar a la legislación actual en la cual los límites establecidos para los diferentes parámetros físico-químicos poco difieren entre las distintas legislaciones.

En la República Argentina, con anterioridad a la inclusión de la Resolución MERCOSUR sobre la miel en la legislación, este producto estaba contemplado en los artículos 782, 783 y 784 del Código Alimentario Argentino (C.A.A., 1998) En el artículo 784 se establecían las exigencias de composición y calidad del producto:

- No debe contener más de 18,0% de agua.
- El contenido de cenizas, determinado entre 500 y 550 °C, no debe ser mayor de 0,4%.
- El contenido de sacarosa no puede superar el 8,0%.
- Las dextrinas totales no pueden superar el 3,0%.
- La acidez, expresada en ácido fórmico, no puede superar el 0,25%.
- Los sólidos insolubles en agua no serán mayores de 0,1% excepto la miel prensada que podrá contener 0,5%.
- Valor diastásico en la escala de Gothe no puede ser menor de 8 y el contenido de hidroximetilfurfural no mayor de 40 mg/kg determinados inmediatamente después del procesamiento.
- La reacción de Lund debe dar un mínimo de 0,6 ml de precipitado.
- No debe contener: residuos de insectos, huevos de insectos, ni sustancias extrañas a su composición normal como edulcorantes de cualquier naturaleza, almidón, gelatina, antisépticos, colorantes, aromatizantes, etc.

Estos parámetros físico-químicos fueron modificados por la Resolución 3363, 30/10/79 e incluidos en el artículo 783.

- El contenido de agua, determinado entre 100 y 105 °C máximo 18,0%.
- El contenido de cenizas, determinado entre 500 y 550 °C máximo 0,4%.
- El contenido de sacarosa máximo 8,0%.
- Las dextrinas totales (acrodextrina) máximo 3,0%.
- La acidez, expresada en ácido fórmico, máximo 0,25%.
- Los sólidos insolubles en agua máximo 0,1% excepto la miel prensada. Materia insoluble para miel prensada 0,5%.
- Valor diastásico en la escala de Gothe, excepto la miel sobrecalentada, 8,0.
- El contenido de hidroximetilfurfural máximo 40 mg/kg.
- Reacción de Lund: mínimo 0,6 ml de precipitado.
- No debe contener: residuos de insectos ni sus huevos, sustancias extrañas a su composición normal (edulcorantes, almidón, gelatina, colorantes, conservantes, aromatizantes u otros agregados)

La Resolución 2256, 16/12/85 dejó conformado el artículo 783 de la siguiente manera:

- El contenido de agua, determinado por refractometría, máximo 18,0%.
- El contenido de cenizas, determinado entre 550 y 600 °C, máximo 0,6% para miel de flores y 1,0% para miel de mielada y sus mezclas con miel de flores.
- El contenido de azúcares reductores, calculados en azúcar invertido, mínimo 65% para miel de flores y 60% para miel de mielada y sus mezclas con miel de flores.

- El contenido de sacarosa aparente máximo 8,0% para miel de flores y 10% para miel de mielada y sus mezclas con miel de flores.
- Los sólidos insolubles en agua máximo 0,1% excepto la miel prensada. Miel prensada 0,5%.
- La acidez máximo 40 miliequivalentes/kg
- Índice de diastasa, en la escala de Gothe, mínimo 8,0. En mieles con contenido natural bajo de enzimas, como mieles de cítricos, como mínimo el 3 de la escala de Gothe, siempre que el contenido de hidroximetilfurfural no sea mayor de 15 mg/kg.
- El contenido de hidroximetilfurfural máximo 40 mg/kg.
- Las dextrinas totales en miel de flores máximo 3,0%.
- No debe contener mohos, insectos, restos de insectos, larvas, huevos, así como sustancias extrañas a su composición.
- La acidez de la miel no debe ser modificada artificialmente.
- No debe contener ningún aditivo.

En 1995 el contenido de los artículos 782 y 783 fue cambiado por el texto de la Resolución GMC 15/94 mediante la Resolución 003, 11/01/95 del Ministerio de Salud y Acción Social y los parámetros que se establecieron están vigentes en la actualidad. La Resolución GMC 89/99 que modifica a la anterior aún no forma parte de la legislación de este país.

Las diferentes normativas que establecen los parámetros mínimos de composición y calidad que debe cumplir el producto genuino fueron revisadas y actualizadas (Bogdanov, 2001)

Entre las legislaciones existen diferencias, algunas relevantes y otras que pueden adjudicarse simplemente a disparidades regionales:

- El cumplimiento de todos los parámetros establecidos en el Reglamento Técnico MERCOSUR es obligatorio mientras que en la Norma del Codex algunos son de aplicación optativa. En la citada Norma los factores de calidad considerados esenciales son: el contenido de agua, de azúcares, de sólidos insolubles en agua y la conductividad eléctrica.

- La Norma del Codex y la Directiva de la Unión Europea agrupan las mieles de acuerdo con su origen floral y sobre la base de esa clasificación se establecen los distintos parámetros físico-químicos.

- En lo referente a la actividad diastásica y al contenido de hidroximetilfurfural, tanto la Norma del Codex como la Directiva de la Unión Europea establecen límites para el producto luego de procesado y / o mezclado mientras que el Reglamento Técnico MERCOSUR legisla sobre el producto tal cual se obtiene de la colmena.

- El Reglamento Técnico MERCOSUR y la Norma Codex contemplan puntos tales como presencia de contaminantes, de adulterantes e higiene del producto. Sólo el Reglamento Técnico MERCOSUR prohíbe expresamente el agregado de aditivos.

- El Reglamento Técnico MERCOSUR no legisla sobre la miel industrial ni la miel utilizada como ingrediente en otros alimentos.

- Los métodos de análisis para los diferentes parámetros son diferentes. Por ejemplo la Norma Codex adoptó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación del contenido de los principales azúcares de la miel.

- La Norma Codex incluye métodos que permiten corroborar la ausencia de adulterantes tales como: separación de azúcares por HPLC (A.O.A.C. 977.20, 1990) para determinar el perfil de azúcares y el método del estándar interno por SCIRA (A.O.A.C. 991.41, 1995)

- Para la determinación de la actividad diastásica se puede optar por el método de Schade, como hasta el momento, o por el método Phadebas. En el caso de la determinación del contenido de hidroximetilfurfural es posible aplicar la cromatografía líquida de alta resolución o el método de White.

El Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel (Resolución GMC Nº 15/94) fue actualizado en marzo de 1999 y dio lugar a la Resolución GMC Nº 89/99. Las modificaciones realizadas se detallan a continuación:

- Los límites máximos para el contenido de sacarosa aparente fueron aumentados de 5 a 6 g% en miel floral y de 10 a 15g% en miel de mielada y sus mezclas.
- El valor máximo permitido para la acidez libre fue extendido de 40 a 50 miliequivalentes/kg.
- El contenido de hidroximetilfurfural de 40 mg/kg fue aumentado a 60 mg/kg.
- Se estableció que la miel necesariamente debe contener polen.
- Fueron eliminadas las exigencias microbiológicas.

Las modificaciones propuestas para el Standard de Codex para Miel existente, que se incluyeron en la revisión realizada en febrero de 2000 son las siguientes:

- La norma contemplará la miel para uso industrial o para ser utilizada como ingrediente en otros alimentos y aquella elaborada por otras especies de abejas productoras de miel distintas de la *Apis mellifera*.
- Los parámetros de composición y calidad fueron clasificados en factores esenciales y adicionales. La acidez libre, la actividad diastásica y el contenido de hidroximetilfurfural pasaron a formar parte de los factores adicionales de composición y calidad.
- Se redujo a un valor igual a 20g% el contenido de agua para la miel de trébol, establecido inicialmente en 23g%.
- Se estableció como método de referencia para la determinación de los azúcares la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, como consecuencia se especificaron límites para el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa que reemplazaron a los ya existentes para el contenido aparente de azúcar reductor y de sacarosa. Se eliminó la excepción de la miel *Blackboy*.
- Con respecto al contenido de sacarosa se contemplaron nuevas especies y otras fueron eliminadas.
- Fue reemplazado el contenido de cenizas por la conductividad eléctrica.
- El límite máximo permitido para la acidez libre fue extendido de 40 a 50 miliequivalentes/kg.
- Se redujo el límite de hidroximetilfurfural de 80 a 40 mg/kg para la miel después de procesada y/o envasada. Se estableció un límite de 80 mg/kg para el caso de mieles provenientes de países o regiones con clima tropical.

La Norma para la miel revisada fue adoptada en la 24ava Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius en el año 2001 (Codex Stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev. 2 (2001))

En mayo de 2000 se elaboró una propuesta para la Directiva 74/409 de la Unión Europea referente a la miel y los cambios propuestos se detallan a continuación:

- Se incluyen criterios de composición para la miel de uso industrial o para ser utilizada como ingrediente en otros alimentos.
- El límite permitido para el contenido de agua en las mieles en general se reduce de 21 a 20%. Se incluye la miel para uso industrial con un máximo de 25%.
- Se establecen límites menores para el contenido de fructosa y glucosa que reemplazan a los existentes para el contenido aparente de azúcar reductor.
- Se establecen límites para el contenido de sacarosa que reemplazan a los de sacarosa aparente existentes y se contemplan otras especies florales.
- Se propone reemplazar el contenido de cenizas por la conductividad eléctrica.
- El límite máximo permitido para la acidez libre se extiende de 40 a 50 miliequivalentes/kg.
- Se establece un límite de 80 mg/kg para el contenido de hidroximetilfurfural en mieles provenientes de regiones con clima tropical.
- Se contempla la miel filtrada.

La Directiva para la miel revisada fue adoptada en diciembre de 2001 (Directiva 2001/110/CE)

A continuación se transcriben los parámetros físico-químicos que debe cumplir la miel, contenidos en las legislaciones citadas anteriormente, antes y después de las revisiones correspondientes.

En la tabla Nº 1 se presentan las características físico-químicas de identidad y calidad del producto contempladas en el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel.
La tabla Nº 2 contiene los factores de composición y calidad de la miel establecidos en la Norma del Codex Alimentarius para la Miel.
En la tabla Nº 3 se incluyen los criterios físico-químicos que debe cumplir la miel de acuerdo con la normativa de la Unión Europea para este alimento y los cambios que se proponen para su actualización.

Tabla Nº 1: Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel.

Características Físico-químicas	*Res. GMC 15/94*	*Res. GMC 89/99*
Azúcares Reductores Miel de flores Miel de mielada y mezcla con miel de flores	 mín. 65% mín. 60%	 mín. 65 g/100g mín. 60 g/100g
Agua	máx. 20%	máx. 20 g/100g
Sacarosa Aparente Miel de flores Miel de mielada y mezcla con miel de flores	 máx. 5% máx. 10%	 máx. 6 g/100g máx. 15 g/100g
Sólidos Insolubles en Agua En general En miel prensada	 máx. 0,1% máx. 0,5%	 máx. 0,1g/100g máx. 0,5g/100g
Minerales (Cenizas) Miel de flores Miel de mielada y mezcla con miel de flores	 máx. 0,6% máx. 1%	 máx. 0,6g/100g máx. 1,2g/100g
Acidez Libre	máx. 40	máx. 50
Actividad Diastásica En general En mieles con bajo contenido enzimático y contenido de HMF menor de 15 mg/kg.	 mín. 8 mín. 3	 mín. 8 mín. 3
Contenido de HMF	máx. 40	máx. 60
Polen	Contenido normal	Debe presentar granos de polen.
Criterios microbiológicos Coliformes totales/g Salmonella spp. – Shigella spp. Hongos y Levaduras UFC/g.	 n=5 c =0 m=0 n=10 c=0 m=0 n=5 c =2 m=10 M=100	 No contempla

Los azúcares reductores están expresados en azúcar invertido, la acidez libre en miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel, el hidroximetilfurfural en miligramos por kilogramo de miel y la actividad diastásica en la escala de Gothe.
Los parámetros restantes están expresados en porcentaje, gramos por 100 gramos de miel.

El significado de los parámetros utilizados para establecer los criterios microbiológicos es el que a continuación se detalla:
n = número de unidades de muestra analizada.
c = número máximo de unidades de muestra cuyos resultados pueden estar comprendidos entre m (calidad aceptable) y M (calidad aceptable provisoriamente).
m = nivel máximo del microorganismo en el alimento, para un nivel aceptable.
M = nivel máximo del microorganismo en el alimento, para un nivel aceptable provisoriamente.

Tabla Nº 2: Norma del CODEX para la Miel

Factores de Composición y Calidad	*Norma Codex Stan - 12*	*Norma Codex Stan Rev.2001*
Agua Miel de flores Miel de brezo *(Calluna)*	 ≤ 21% ≤ 23%(1)	 ≤ 21% ≤ 23%
Contenido de Fructosa y Glucosa (suma de ambas) Miel de flores Miel de mielada y sus mezclas con miel de flores	 ≥ 65% ≥ 60% (2)	 ≥ 60% ≥ 45%
Contenido de Sacarosa Miel de flores	≤ 5% (3) ≤10% ≤15%	≤ 5% (4) ≤10% ≤15%
Contenido de Sólidos Insolubles en Agua Miel de flores Miel prensada	 ≤0,1% ≤0,5%	 ≤0,1% ≤0,5%
Sustancias Minerales (Cenizas) Miel de flores Miel de mielada o sus mezclas con miel de flores	 ≤0,6% ≤1,0%	 No contempla
Conductividad Eléctrica Miel de flores Miel de mielada, de castaña y mezclas de ellas (5)	 No contempla	 ≤ 0,8 ≥0,8
Acidez Libre	máx. 40	≤ 50
Actividad Diastásica Determinada después de procesada y/o mezclada Mieles con contenido enzimático natural bajo	 3 como mínimo	 no menos de 8 no menos de 3
Contenido de HMF Después de procesada y/o mezclada Mieles de países o regiones con temperaturas tropicales y mezclas de esas mieles	 ≤80 mg/kg	 ≤40 mg/kg. ≤80 mg/kg.

(1) Incluye a la miel de trébol *(Trifolium)*.

(2) Exceptúa a la miel Blackboy *(Xanthorrhoea preissii)* permitiendo no menos del 53%. Los azúcares están expresados en azúcar invertido.

(3) La miel no debe contener más de 5% de sacarosa aparente, con las siguientes excepciones: miel de mielada y sus mezclas con miel de flores, Robinia, Espliego, Citrus, Alfalfa, Meliloto, Red Gum *(Eucalyptus camaldulensis),* Acacia, Leatherwood *(Eucryphia lucinda)* y Menzies banksia *(Banksia menziesii)* con no más de 10% de sacarosa y Red Bell *(Calothamnus sanguineus)*, White stringy bark *(Eucalyptus scabra)*, Grand Banksia *(Banksia grandis)* y Blackboy *(Xanthorrhoea preissii)* con no más de 15% de sacarosa.

(4) La miel no debe contener más de 5% de sacarosa con las siguientes excepciones: Alfalfa *(Medicago Sativa),* Citrus spp., Falsa Acacia *(Robinia pseudoacacia), Madreselva Francesa (Hedysarum),* Menzies banksia *(Banksia menziesii),* Red Gum *(Eucalyptus camaldulensis),*

Leatherwood *(Eucryphia lucinda)* y Eucryphia milligani con no más de 10% de sacarosa y Lavanda *(Lavandula spp.)* y Borraja *(Borago officinalis)* con no más de 15% de sacarosa.

(5) Excepciones: Árbol de Frutilla *(Arbutus unedo)*, Campana *(Erica)*, Eucalyptus, Tilo *(Tilia spp.)*, Brezo "Ling" *(Calluna vulgaris)*, Manuka o Jelly bush *(Leptospermum)*, Árbol de Té *(Melaleuca spp.)*

La acidez libre está expresada en miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel, la conductividad eléctrica en mS/cm y la actividad diastásica en unidades Schade.

Tabla Nº 3: Directiva de la UNIÓN EUROPEA para la Miel

Criterios Físico-químicos	***Directiva 74/409/ECC***	***Directiva 2001/110/CE***
Contenido de Fructosa y Glucosa Miel de flores Miel de mielada y su mezcla con miel de flores	 ≥ 65% ≥ 60%	 ≥ 60% ≥ 45%
Contenido de Agua En general	 ≤ 21% (1) ≤ 23%	 ≤ 20% (2) ≤ 23% ≤ 25%
Contenido de Sacarosa	≤ 5% (3) ≤10%	≤ 5% (4) ≤10% ≤15%
Contenido de Sólidos Insolubles en Agua Miel Miel prensada	 ≤0,1% ≤0,5%	 ≤0,1% ≤0,5%
Sustancias Minerales Miel Miel de mielada o su mezcla con miel de flores	 ≤0,6% ≤1,0%	 No contempla
Conductividad Eléctrica Miel Miel de mielada, de castaña y mezclas (5)	 No contempla	 ≤ 0,8 ≥0,8
Acidez Libre En general Miel para uso industrial	 ≤ 40	 ≤ 50 ≤ 80
Actividad diastásica y contenido de HMF (6) a) Actividad diastásica En general b) Hidroximetilfurfural En general Mieles provenientes de regiones con clima tropical y sus mezclas	 ≥ 8 **(7)** ≤ 40	 ≥ 8 ≤ 40 ≤ 80

(1) Las mieles de Brezo *(Calluna)* y de *trébol (Trifolium)* pueden contener hasta 23% de agua.

(2) Las mieles de Brezo *(Calluna)* y mieles para uso industrial pueden contener hasta 23% de agua y la miel de Brezo *(Calluna)* para uso industrial hasta 25% de agua.

(3) Las mieles en general no deben contener más de 5% de sacarosa con las siguientes excepciones: miel de mielada y mezclas con miel de flores, mieles de acacia, de lavanda y de *Banksia menziesii.*

(4) Las mieles en general no deben contener más de 5% de sacarosa con las siguientes excepciones: Falsa Acacia *(Robinia pseudoacacia),* Alfalfa *(Medicago Sativa),* Menzies Banksia *(Banksia menziesii),* Madreselva Francesa *(Hedysarum),* Red Gum *(Eucalyptus camaldulensis),* Leatherwood *(Eucryphia lucida), Eucryphia milligani* y Citrus *spp* con no más de 10% de sacarosa y Lavanda *(Lavandula spp.)* y Borraja *(Borago officinalis)* con no más de 15% de sacarosa.

(5) Excepciones: Árbol de Frutilla *(Arbutus unedo)*, Campana *(Erica)*, Eucalyptus, Tilo *(Tilia spp.)*, Brezo "Ling" *(Calluna vulgaris)*, Manuka o Jelly bush *(Leptospermum)*, Árbol de Té *(Melaleuca spp.)*

(6) Los valores de actividad diastásica e hidroximetilfurfural se refieren al producto después del procesamiento y mezclado.

(7) Mieles con bajo contenido enzimático (citrus) y contenido de hidroximetilfurfural no superior a 15 mg/kg deberán contener no menos de 3 unidades Schade.

Los límites establecidos para el contenido de glucosa y fructosa son suma de ambos monosacáridos.

La acidez libre está expresada en miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel, la conductividad eléctrica en nS/cm, la actividad diastásica en unidades Schade, el contenido de HMF en miligramos por kilogramo de miel.

Los establecimientos en los cuales se procesa y envasa la miel deben cumplir ciertos requisitos. En la República Argentina la habilitación y funcionamiento de los establecimientos donde se extrae, estaciona, acopia, procesa, fracciona y envasa este alimento están sujetos a las prescripciones de la Resoluciones 220/95 y 353/02 del ex Servicio Nacional de Sanidad Animal. Estas disposiciones no exceptúan del cumplimiento de la Resolución GMC 80/96 sobre las condiciones higiénico-sanitarias y de buenas prácticas de elaboración para establecimientos elaboradores / industrializadores de alimentos. La Resolución 233/98 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria modifica el Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal, en lo referente a las normas sobre buenas prácticas de fabricación y procesos operativos estándar a que deberán ajustarse los establecimientos que elaboren, depositen y comercialicen alimentos.

El Código Alimentario Argentino en su capítulo II sobre condiciones generales de las fábricas y comercios de alimentos también legisla sobre los establecimientos de miel y derivados.

La producción de miel orgánica en la República Argentina está reglamentada a través de la Ley 25.127 y las Resoluciones 423/92, 424/92, 354/93, 270/00 y 451/01 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, las Resoluciones IASCAV (ex Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal) 82/92, 116/64, 331/94 y 188/95 y las Resoluciones 1286/93 y 68/94 del ex Servicio Nacional de Sanidad Animal.

La Unión Europea establece en la Directiva 2092/91 las pautas para la producción agrícola ecológica.

Los envases destinados a la comercialización de miel a granel (tambores) en la República Argentina están reglamentados por la Resolución 121/98 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.
Los envases empleados para envasar la miel fraccionada deberán cumplir con las Resoluciones GMC que a continuación se detallan: 3/92 sobre criterios generales para los envases y equipos en contacto con alimentos, 55/92 sobre envases y equipamientos de vidrio y cerámica destinados a entrar en contacto con los alimentos, 56/92 sobre disposiciones generales para los envases y equipos plásticos en contacto con alimentos, lista positiva de polímeros y resinas para envases en contacto con alimentos (87/93 y 5/95)

BIBLIOGRAFÍA

Bogdanov, S. y otros. Calidad de la Miel de Abejas y Estándares de Control: Revisión Realizada Por La Comisión Internacional De La Miel (2001) Consulta del 15 de diciembre de 2003, *http://www.beekeeping.com/articulos/calidad_miel.htm*

C.A.A. Código Alimentario Argentino. Texto Actualizado de la Ley Nº 18.284 y del Decreto Nº 2.126/71 (1998) *Marzocchi Ediciones, Buenos Aires. Capítulo X. Alimentos Azucarados. pp. 338-342*

C.A.A. Código Alimentario Argentino. Capítulo II. Condiciones Generales de las Fábricas y Comercios de Alimentos. Ley Nº 18.284 y su Decreto Reglamentario Nº 2.126/71 (1998) Consulta del 1 de febrero, 2004, *http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Recommended European Regional Standard for Honey (1969) *CAC/RS 12.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. ALINORM 01/25. Report of the Seventh Session of the Codex Committee on Sugars (2000) *CL 2000/5-S.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Revised Codex Standard for Honey. *Codex Stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev. 2 (2001)*

Council Directive of 22 July 1974 on the harmonization of the laws of the Member States relating to honey, 74/409/EEC, *Official Journal of the European Communities, No L 221/14 1974.*

Council Directive of 2 December 2001 relating to honey, 2001/110/CE, *Official Journal of the European Communities, No L 10/47 2002.*

Horn, H. Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura (1996) *pp. 404-429*.

Directiva 2092/91/CEE del Consejo, de 24 de junio de 1991 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.

Ley 25.127, su Decreto Reglamentario 97/2001 y Decreto modificatorio 206/2001. Producción Ecológica, Biológica u Orgánica. Sancionada el 8 de septiembre de 1999.

Piana, G., Ricciardelle D'Albore, G., Isola, A. La Miel (1989) *Mundi Prensa. Madrid: pp. 29-47.*

Proposal for a Directive of the European Council Relating to Honey (1996) *EU document 96/0114.*

Proposal for a Council Directive Relating to Honey (2000) *Working document DENLEG/2000/10.*

Resolución GMC Nº 03/92 (Resolución MSyAS 03, 08/02/95) Criterios Generales de Envases y Equipamientos Alimentarios en Contacto con Alimentos.

Resolución GMC Nº 55/92 (Resolución MSyAS 03, 08/02/95) Envases y Equipamientos de Vidrio y Cerámica Destinados a entrar en Contacto con Alimentos.

Resolución GMC Nº 56/92 (Resolución MSyAS 03, 08/02/95) Disposiciones Generales de Envases y Equipamientos Plásticos en Contacto con Alimentos.

Resolución GMC Nº 87/93 (Resoluciones MSyAS 03, 08/02/95 y 298, 11/05/99) Lista Positiva de Polímeros y Resinas para Envases y Equipamientos Plásticos en Contacto con Alimentos.

Resolución GMC Nº 05/95 (Resoluciones MSyAS 357, 01/08/97 y 298, 11/05/99) Lista Positiva de Polímeros y Resinas para Envases y Equipamientos Plásticos en Contacto con Alimentos.

Resolución GMC Nº 15/94 (Resolución MSyAS 01, 11/01/95) Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel.

Resolución GMC Nº 102/94 (Resolución MSyAS 184, 30/05/95) Contaminantes Inorgánicos. Límites máximos de Tolerancia para MERCOSUR.

Resolución GMC Nº 80/96 (Resolución MSyAS 587, 01/09/97) Reglamento Técnico MERCOSUR sobre las Condiciones Higiénico Sanitarias y de Buenas Prácticas de Elaboración para Establecimientos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos.

Resolución GMC Nº 89/99. Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel.

Resolución IASCAV Nº 82, 03/06/92. Normativa Anexa Relativa al Registro de Empresas Certificadoras de Productos Orgánicos Destinados a la Exportación y Mercado Interno.

Resolución IASCAV Nº 116, 04/03/94. Actualícese el Anexo B de la Resolución 423 del 3 de junio de 1992 de la SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA y PESCA

incluyendo los “productos a base de feromonas” para el control de plagas en agricultura Orgánica.

Resolución IASCAV Nº 331, 04/08/94. Agréguese al punto 3 del Anexo de la Resolución 82 del 3 de junio de 1992 del INSTITUTO ARGENTINO DE SANIDAD Y CALIDAD VEGETAL que establece los requisitos generales para la tramitación de la inscripción en el Registro Nacional de Empresas Certificadoras de Productos Orgánicos.

Resolución IASCAV Nº 188, 20/10/95. Amplíese el punto 6.1 del Anexo de la Resolución 331 del 4 de agosto de 1994 del INSTITUTO ARGENTINO DE SANIDAD Y CALIDAD VEGETAL.

Resolución SAGyP Nº 423, 03/06/92. Producción, Tipificación, Elaboración, Empaque, Distribución, Identificación y Certificación de la Calidad de Productos Agrícolas “Orgánicos”, “Ecológicos” o “Biológicos”.

Resolución SAGyP Nº 424, 03/06/92. Aranceles para el Registro Nacional de Empresas Certificadoras de Productos Orgánicos.

Resolución SAGyP Nº 354, 04/06/93. Modifíquese la Resolución 423, 03/06/92.

Resolución SAGPyA Nº 121, 23/10/98. Establécese un Nuevo Marco Normativo para los Envases Destinados a la Comercialización de Miel a Granel.

Resolución SAGPyA Nº 270, 09/06/00. Prohíbese en la Producción Orgánica la utilización de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) y de Productos Derivados de Éstos.

Resolución SAGPyA Nº 451, 17/08/01. Agréguese como último párrafo del inciso f) del artículo 5º de la Resolución 1286 del 19 de noviembre de 1993 del ex SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL en cuanto a la Condición de los Animales Tratados con Medicamentos Veterinarios Alopáticos, de Síntesis Química o Antibióticos.

Resolución SENASA Nº 1286, 19/11/93. Producción, Elaboración, Empaque, Tipificación, Distribución, Identificación y Certificación de Calidad y Sanidad de Productos Ganaderos “Ecológicos”.

Resolución SENASA Nº 68, 10/01/94. Registro Nacional de Entidades Certificadoras de Productos Ecológicos de Origen Animal.

Resolución SENASA Nº 220, 18/04/95. Habilitación, Inscripción y Funcionamiento de todo Establecimiento donde se Trate, Manipule, Industrialice, Procese, Extraiga, Fracciones, Estaciones, Acopie, Envase o Deposite Miel u Otros Productos Apícolas.

Resolución SENASA Nº 233, 12/03/98. Modifíquese el Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal, en lo referente a las Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y los Procedimientos Operativos Estandarizados a que deberán ajustarse los Establecimientos que Elaboren, Depositen o Comercialicen Alimentos.

Resolución SENASA Nº 353, 23/04/02. Inscripción, Registro y Habilitación de Salas de Extracción para Miel.

White, W. J., Jr. Moisture in Honey: Review of Chemical and Physical Methods (1969) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.52, N°4, pp. 729-737.*

White, J. W., Jr. and Doner, Landis W. Honey Composition and Properties. (Revised October 1980) Beekeeping in the United States. Agriculture Handbook Number 335. Consulta del 31 de enero, 2004, *http://www.beesource.com/pov/usda/beekpUSA82.htm*.

Winton, A. L, Ph.D. and Winton, K. B.,Ph.D. The Structure and Composition of Foods (1939) *John Wiley & sons, Inc. New York. Vol IV, pp. 45-66.*

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MIEL

√ **Conductividad Eléctrica**

√ **Acidez y pH**

√ **Índice de Refracción**

√ **Densidad**

√ **Viscosidad**

√ **Higroscopicidad**

√ **Cristalización**

√ **Presión Osmótica**

√ **Actividad Óptica**

√ **Color**

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MIEL

El estudio de las propiedades físicas de la miel es importante por diferentes razones. En muchos casos permite orientar sobre el origen de la miel como por ejemplo el pH, la tendencia a cristalizar o el color. La actividad óptica y la viscosidad proporcionan datos que pueden contribuir en la detección de algunos tipos de adulteraciones.
La mayoría presentan una alta dependencia con el contenido de agua como en el caso del índice de refracción. Sobre la base de mediciones de esta propiedad se elaboró la tabla que permite calcular indirectamente el contenido de agua de este alimento.

Desde otro punto de vista, el comportamiento físico de la miel debe tenerse particularmente en cuenta en el diseño de los equipos que se utilizarán para el procesamiento del producto.

La evaluación de las propiedades sensoriales de la miel ha sido usada por largo tiempo para diferenciar mieles de distintos orígenes botánicos (Mateo, 1992)

En general las mieles poseen un flavor particular, las más claras están asociadas con flavors delicados y las más oscuras con flavors fuertes y apariencias menos atractivas.

El análisis de los caracteres sensoriales es un paso importante en el control de calidad del producto, el color de la miel es un atributo de calidad y se determina desde hace mucho tiempo.

Algunos rangos de color y flavor son típicos de una dada variedad floral. Por ejemplo, la miel en la cual predomina *Eucalyptus* cristaliza en forma compacta con cristales finos, posee sabor dulce ácido y color ámbar claro a oscuro (Baldi, 1996)

- **CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA**

La miel posee iones inorgánicos, aminoácidos y ácidos orgánicos en solución, por esta razón es capaz de conducir la corriente eléctrica cuando se aplica un campo eléctrico.
La conductividad eléctrica es un dato útil para diferenciar mieles de distintos orígenes, la miel de mielada y la de castaño generalmente presentan una conductividad eléctrica mayor de 1 mS/cm mientras que en las mieles florales los valores oscilan entre 0,1 y 0,7 mS/cm. La conductividad eléctrica de algunas mieles es extremadamente variable y no es posible especificar límites para ellas (Bogdanov, 1997)
Para mieles florales se han reportado datos comprendidos entre 181 y 1127 μS/cm y para miel de mielada valores comprendidos entre 1220 y 1624 μS/cm (Horn, 1996)

El método de análisis para determinar la conductividad eléctrica se explica en detalle en el capítulo IV.

En la última revisión del Estándar de Codex para la Miel se adoptó esta propiedad como un factor esencial de composición y calidad, se asignaron límites para algunas mieles y se exceptuaron otras para las cuales no fue posible establecer valores dada la gran variabilidad que presentan frente a este parámetro.

- **ACIDEZ y pH**

La acidez y el pH de la miel son datos que también permiten clasificar a la miel de acuerdo con su origen geográfico y botánico.

La acidez es un parámetro fuertemente dependiente del origen floral. Existen mieles que naturalmente poseen una acidez baja (menos de 20 miliequivalentes/kilogramo), como la miel de falsa acacia, rododendro y cítricos y otras con más de 30 miliequivalentes/kilogramo como la miel de *Arbutus, Erica* y *Thymus.*

Las mieles de castaño y de mielada presentan valores de acidez muy altos (Persano Oddo, 1988)

La acidez también se modifica con el lugar geográfico de producción, en general las mieles argentinas presentan valores bajos de acidez, mientras que en mieles uruguayas se han encontrado valores cercanos a los 50 miliequivalentes/kilogramo.

La miel es ácida, el pH de la miel de flores está comprendido entre 3,5 y 4,5 a diferencia de la miel de mielada cuyo valor puede estar comprendido entre 4,5 y 5,5. Estos valores no deben tomarse estrictamente, en la bibliografía se han encontrado datos de pH menores, hasta 2,7 para mieles florales y 4,0 para mieles de mielada.

Si se adultera la miel con jarabes de maíz pueden registrarse valores menores de pH.

Los métodos de análisis para determinar la acidez y el pH se explican en detalle en el capítulo IV.

- ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción aumenta al incrementarse el contenido de sólidos. En esta propiedad se basa el método indirecto de análisis del contenido de agua, su determinación puede también utilizarse como método orientativo para conocer el origen de la miel.

El índice de refracción medido a 20 °C (68 °F) de la miel de mielada oscila entre 1,4932 (17,3% H_2O) y 1,5008 (14,4% H_2O) mientras que las mieles florales presentan valores que van desde 1,4861 (20,2% H_2O) hasta 1,5007 (14,4% H_2O) (White, 1969)

El índice de refracción se mide con un refractómetro de Abbé termostatizado a la temperatura a la cual se desea llevar a cabo la medición. Las consideraciones prácticas de este análisis se estudian en el capítulo IV.

- **DENSIDAD**

La determinación de la densidad de la miel es un dato que puede medirse pesando un volumen de muestra perfectamente conocido contenido en un picnómetro o utilizando un hidrómetro calibrado.

Debe tenerse en cuenta que el valor de la densidad depende del contenido de agua de la muestra y de la temperatura a la cual se lleva a cabo la medición.

En la bibliografía se citan valores promedio de la medición de esta propiedad, a 20 ºC (68 °F), de diferentes muestras de miel. Por ejemplo por pesada directa y picnometría se obtuvieron

valores promedio tales como 11,867lb/gal (1,4220 g/cm^3) y 11,838lb/gal (1,4185 g/cm^3) por refractometría (White, 1969)

- **VISCOSIDAD**

La consistencia de la miel puede ser fluida, viscosa, parcial o totalmente cristalizada (sólida)

Lo que más influye en esta propiedad es el porcentaje de agua y secundariamente la relación fructosa / glucosa, a mayor cantidad de fructosa las mieles son menos viscosas. A mayor cantidad de azúcares superiores mayor es la consistencia.

La viscosidad, único atributo de textura de los alimentos líquidos, es altamente dependiente de la temperatura. Es un índice de fluidez, disminuye al aumentar la temperatura. La viscosidad también varía de acuerdo con el contenido de agua, a mayor porcentaje de agua menor es la viscosidad. Otro factor que influye en los valores que adopta esta propiedad es el origen floral. Si se mezcla la miel con jarabes de glucosa puede variar el valor normal de este parámetro.

Los datos contenidos en la tabla Nº 4 ejemplifican la dependencia de la viscosidad con la temperatura, el contenido de agua y el origen botánico.

Tabla Nº 4: Relación entre la Viscosidad, Temperatura, Agua y Origen Botánico (Horn, 1996)

TIPO DE MIEL	Agua (%)	Temp. (ºC)	Viscosidad (poise)
Trébol Dulce (*Melilotus)*	16,1	20,6	189,6
	16,1	71,1	2,6
	16,5	25	87,5
Trébol Blanco *(Trifolium repens)*	15,5	25	138
	18,2	25	48,1
	21,5	25	13,6
Salvia (*Erigonum)*	18,6	20,2	184,8
	18,6	40,9	19,2
	16,5	25	94,0

Algunas mieles se comportan como alimentos líquidos con flujos newtonianos presentando valores de hasta 110 poise, medidos a 20 °C (68 °F)
Existen otras mieles con alto contenido de dextranos, como por ejemplo la de eucaliptus, que se comporta como un alimento líquido con flujo no newtoniano y cuya viscosidad aumenta notablemente al ser agitada, hasta tal punto que puede llegar a presentar el fenómeno de filatancia. Esta miel también presenta el efecto Weissenberg, propio de los alimentos viscoelásticos, cuando son agitados se genera una fuerza hacia arriba que hace que el producto trepe.
Otras mieles presentan flujos pseudoplásticos y tixotrópicos, al ser agitadas su viscosidad disminuye para luego alcanzar su valor inicial. Este fenómeno se debe a ciertas proteínas cuya

presencia depende del origen floral de la misma, la miel de brezo *(Calluna)* presenta este fenómeno.

Es muy importante tener en cuenta lo anteriormente expuesto en el momento de elegir las condiciones y los equipos con los cuales se va a llevar a cabo el procesamiento y envasado del producto para evitar futuros problemas.

Existen diferentes métodos para determinar la viscosidad de los alimentos, los más apropiados para la miel son:

- Viscosímetro de Höpler: consiste en medir el tiempo que tarda una esfera metálica de 1,5 mm de diámetro en atravesar una distancia determinada cuando se la introduce en un tubo graduado que contiene el alimento. En el caso particular de la miel debe utilizarse un detector de metales para realizar la medición.

- Viscosímetro de Brookfield: se mide la disminución de la velocidad de giro de un buzo cuando éste es sumergido en el alimento.

- Viscosímetro de cono y placa: se utiliza muy pequeña cantidad de muestra y se basa en el mismo principio que el anterior. Los resultados obtenidos por este método son muy confiables.

- HIGROSCOPICIDAD

La miel, al ser una solución tan concentrada en azúcares posee la capacidad de absorber agua del ambiente. Por este motivo es importante que sea almacenada correctamente ya que, de acuerdo con su contenido inicial de agua, podrá absorber o perder agua dependiendo de la humedad relativa del ambiente en el cual se almacene.

Esta propiedad la convierte en un ingrediente muy utilizado en la industria alimentaria especialmente en productos de confitería y pastelería.

- CRISTALIZACIÓN

Muchas mieles cristalizan con el tiempo debido a que la glucosa supera la concentración de saturación y cristaliza espontáneamente, este proceso se inicia a partir de pequeños cristales. Si la miel se calienta y filtra es posible reducir la cantidad de esos cristales y retardar la cristalización.

El proceso de filtración retarda la cristalización porque elimina cristales grandes de glucosa, polen, burbujas de aire y otras partículas que actúan como núcleos de cristalización.

Como consecuencia de la cristalización las mieles fermentan más fácilmente porque el azúcar en solución está más diluido. Aquellas bien maduradas poseen una actividad acuosa menor de 0,7.

Una de las variables de mayor importancia en el proceso de cristalización es la composición y concentración de los azúcares. En general, las mieles con alto contenido de glucosa cristalizan más rápidamente, la fructosa ejerce un efecto inhibitorio sobre la cristalización.

En principio, si la relación glucosa / agua (a_w) es menor o igual a 1,7 la miel no cristaliza, en cambio si es mayor de 2,1 cristaliza completamente (Doner, 1977) Esto no es estricto pues existen algunas excepciones. La temperatura de almacenamiento y la viscosidad pueden modificar la tendencia a cristalizar dada por esa relación entre el contenido de glucosa y la actividad acuosa (Tabouret, 1979) La relación fructosa / glucosa es otro parámetro importante que puede utilizarse para predecir la tendencia a cristalizar; valores altos se asocian a mieles líquidas o de lenta cristalización.

En general si se desea saber si una miel va a cristalizar con el tiempo puede calcularse cualquiera de las relaciones anteriores, se recomienda la primera ya que no requiere la determinación de la fructosa (USDA, 1962)

El origen botánico de la miel también influye sobre este fenómeno, por ejemplo, la miel de acacias tarda mucho en cristalizar (Baldi, 1996)

Otros factores que afectan la tendencia a cristalizar son: la temperatura de conservación y la viscosidad. Las bajas temperaturas, al igual que las altas viscosidades, retardan la cristalización.

Durante el almacenamiento algunas mieles cristalizadas presentan una licuefacción gradual debido a que el contenido de glucosa se encuentra cercano al límite más bajo de cristalización; con el estacionamiento la concentración de glucosa se reduce a un valor por debajo de su punto de saturación y como consecuencia los cristales se disuelven lentamente. Se observan dos fases, una fase sólida que se deposita en el fondo y una fase líquida, en la parte superior que favorece el desarrollo de levaduras.

La cristalización puede ser provocada también por proteínas u otros coloides que actúan como núcleos de cristalización. Si estos se eliminan por filtración es posible retardar el proceso.

Es importante tener en cuenta este fenómeno porque dificulta la extracción del producto. Para eliminarlos se diluye la miel a 40° Brix y se agrega bentonita que produce floculación, a continuación se filtra y evapora el exceso de agua al vacío y a baja temperatura, hasta alcanzar su concentración original.

Debido a la presencia de proteínas la miel también posee baja tensión superficial lo que genera formación de espuma que conduce a la diseminación de pequeñas burbujas de aire.

- **PRESIÓN OSMÓTICA**

La composición química y principalmente los hidratos de carbono convierten a la miel en un alimento que posee alta presión osmótica.

Esta propiedad conjuntamente con el pH ácido es responsable, en parte, del poder antimicrobiano de la miel. La elevada osmolaridad del producto junto con ciertos ácidos orgánicos que posee y la presencia de inhibina la tornan un medio desfavorable para el desarrollo microbiano y como consecuencia en un alimento de alta conservabilidad.

- **ACTIVIDAD ÓPTICA**

La presencia de hidratos de carbono le confiere a la miel la propiedad de desviar el plano de polarización de la luz polarizada. Dentro de los glúcidos, la fructosa es la que está en mayor proporción lo que convierte a la miel en una solución de azúcares levorrotatoria.
Existen mieles que poseen naturalmente un contenido mayor de glucosa (*Taraxacum* y *Helianthus*) y como consecuencia desvían el plano de polarización de la luz polarizada hacia la derecha al igual que las mieles adulteradas con porcentajes altos de jarabe de glucosa.

La medición de la actividad óptica y posterior determinación del valor de la rotación específica permite orientar sobre el origen de la miel, las mieles monoflorales presentan valores característicos de esta propiedad. También es útil para detectar mieles adulteradas con jarabes de glucosa.

En la siguiente tabla se transcriben los valores obtenidos luego de adulterar miel pura con distintos jarabes de maíz. De los resultados obtenidos se puede observar que la miel va disminuyendo su capacidad de desviar el plano de polarización de la luz polarizada hacia la izquierda a medida que aumenta la concentración de jarabe de maíz rico en glucosa (Glucosa 4338 y Levudex 400) El otro jarabe ensayado, levorrotatorio, transforma a la miel en un producto más levógiro ya que es rico en fructosa (Fattori, 2002)

Tabla N° 5: Rotación Óptica Específica de Miel y Mezclas con Jarabes de Maíz.

MUESTRA	Rotación Óptica Específica
Miel pura	- 11,7
Glucosa 4338	+ 149,5
Levudex 400	+ 76,7
Levudex 55	- 20,8
5% de Lev 400	- 9,0
7% de Lev 400	- 7,5
10% de Lev 400	- 4,5
5% de LEV 55	- 11,9
7% de LEV 55	- 13,1
10% de LEV 55	- 20,8

El método de análisis para determinar la actividad óptica se explica en detalle en el capítulo IV.

- COLOR

La miel puede ser casi incolora hasta rojo ámbar (miel de flores) y pardo claro, verdoso hasta negro (miel de mielada)

Contribuyen, en parte, al color la presencia de pigmentos de flores. La presencia de color en la miel puede justificarse también sobre la base de la reacción de Maillard que ocurre por condensación de azúcares con grupos amino libres, aminoácidos y proteínas.

Este parámetro es importante en el diagnóstico del origen floral, sobre la base del color es posible realizar una clasificación preliminar de la miel. Las mieles de falsa acacia, cítricos, rododendro y madreselva francesa son claras, mientras que la miel de mielada y de castaño son muy oscuras. Algunas mieles presentan un color particular como por ejemplo la miel de *Erica* que es naranja y la de *Helianthus* amarilla brillante (Persano Oddo, 1988)

En general las mieles más claras presentan mayor contenido de monosacáridos, sacarosa y provitamina A, poseen una mayor tendencia a cristalizar, muestran mayor concentración de H^+ y una mayor relación lactona/acidez libre.

Ciertas características analíticas varían con el color, el contenido de azúcares superiores, sustancias nitrogenadas y minerales es mayor en mieles oscuras, las actividades de invertasa y diastasa son mayores, la acidez libre y la acidez total aumentan a medida que aumenta el color (USDA, 1962)

El color de las mieles depende de su origen botánico (que condiciona su riqueza en minerales) Los minerales presentes en la miel provienen casi exclusivamente del néctar, reaccionan con la materia orgánica formando compuestos pardos, a mayor cantidad de materia mineral mayor es la cantidad de compuestos pardos y mayor es el color. Si se utilizan panales de cera viejos o que hayan contenido cría la miel obtenida es más oscura (Gómez Pajuelo, 1995)

La miel se oscurece con el almacenamiento y las temperaturas crecientes. El grado del proceso está influenciado por el origen botánico (Mateo, 1992)

Si el producto se almacena o envasa en recipientes metálicos no aptos para estar en contacto con alimentos se oscurece debido a que, componentes propios tales como azúcares, aminoácidos y polifenoles reaccionan con el hierro generando compuestos coloreados.

La oxidación de los polifenoles que puede contener contribuye al color, al igual que compuestos generados por la Reacción de Maillard cuando es sometida al calentamiento.

Las longitudes de onda dominantes, correspondientes a los niveles de coloración de la miel, se registran en una franja estrecha del espectro visible (entre 570 y 590 nm)

La miel presenta fluorescencia cuando es expuesta a la luz ultravioleta, esta característica no se pierde por calentamiento.

El color sirve de norma para las mieles, su importancia es de orden puramente comercial.

Existen siete apelativos diferentes para indicar el color:

- ✓ Blanco agua.
- ✓ Extra blanco.
- ✓ Blanco.
- ✓ Ámbar extra claro.
- ✓ Ámbar claro.
- ✓ Ámbar.
- ✓ Ámbar oscuro.

Métodos de medición

Los métodos para la medición del color en los alimentos han ido evolucionando con el tiempo. Si bien existen determinaciones más sofisticadas como por ejemplo el método de los triestímulos, hoy en día continúan utilizándose los comparadores visuales como el colorímetro de Pfund.

El tintómetro de Lovibond se ideó en 1880 para medir el color en cervezas, el color del alimento se compara con vidrios coloreados (rojo, azul y amarillo) yuxtapuestos.

El aparato consta de 20 cristales rojos (sales de cromo), 20 cristales azules (sales de cobalto) y 20 amarillos (sales de oro) y 12 vidrios neutros para igualar la luminosidad. Está calibrado por el fabricante, la longitud de las cubetas varía desde 25 a 125 mm.

No deben usarse más de 4 ó 5 cristales porque el error es muy grande. Las cubetas menores se utilizan para los alimentos más coloreados.

Se informa el resultado de acuerdo con la cantidad de cristales, de cada color, utilizados para igualar el color del alimento.

En el caso particular de la miel los colores de los cristales deben corresponder a los patrones establecidos por USDA (*United States Department of Agriculture*) Actualmente se cuenta con el comparador visual Lovibond 2000.

La A.O.A.C. (*Official Association of Agricultural Chemists*) incluye en su metodología analítica dos métodos para determinar el color en la miel, en el primero se utilizan botellas cuadradas para contener las muestras y un comparador que consiste en dos cajas metálicas con cinco compartimentos, cada uno de los cuales posee dos ventanas con los

correspondientes vidrios estándares. Detrás de ellos se colocan frascos con agua (blancos) o con suspensiones de tierra de diatomeas.

Se mueve el frasco que contiene la muestra de compartimiento en compartimiento, intercambiando blancos o suspensiones según sea necesario, hasta poder igualar el color con el de alguno de los patrones o encuadrarla entre dos de ellos (A.O.A.C. 960.44, 1995)

El otro método es aquel que utiliza el comparador visual Lovibond 2000, se explica con mayor detalle más adelante.

- **Comparador visual de Pfund**

Se compara visualmente la miel en un colorímetro de Pfund.

El producto se fluidifica, calentando si fuera necesario hasta 60 °C (140 °F) y se deja en reposo para eliminar las burbujas.

La muestra se coloca en un recipiente cuneiforme, el cual se monta arriba de un vidrio cuneiforme estándar color ámbar, ambos sobre el mismo sistema de metal removible (rodillos), los vértices de las cuñas están en sentido opuesto.

En la ventana de observación se compara el color de la miel con el del vidrio, desplazando la cubeta mediante el panel corredizo de un lado al otro hasta igualar los campos de la muestra y del estándar. Se registra el dato leyendo en una escala calibrada.

La fuente de luz puede ser una lámpara de 200 watts, un difusor o luz natural.

La intensidad del color se expresa como la distancia a lo largo de la cuña ámbar en un rango de 1 a 140 mm de acuerdo con la siguiente tabla.

Tabla N° 6: Relación entre la Escala Internacional y el Color Pfund.

ESCALA INTERNACIONAL	LECTURA
Blanco agua	≤ 8 mm
Extra blanco	> 8 mm y ≤ 16,5 mm
Blanco	> 16,5 mm y ≤ 34 mm
Extra ámbar claro	> 34 mm y ≤ 50 mm
Ámbar claro	> 50 mm y ≤ 85 mm
Ámbar	> 85 mm y ≤ 114 mm
Ámbar Oscuro	> 114 mm

Las mediciones pueden referirse a la lectura de un instrumento estándar mediante un cuadro que acompaña a cada comparador (corrección del valor hallado)

El comparador visual de Pfund es fácil de manejar y permite obtener rápidamente un buen valor de cromaticidad, proporciona una escala continua unidimensional de cromaticidad que es útil para aquellos que desean mezclar miel logrando un determinado color.

Es el método más ampliamente utilizado para medir el color de la miel. No es enteramente satisfactorio por las siguientes razones:

- El recipiente usado primariamente (estándar) no fue descripto y se desconoce si todos los instrumentos fabricados a lo largo del tiempo son iguales.
- La miel puede presentar turbidez debido a materia coloidal o polen, este aspecto es ignorado en la clasificación del color, el que se hace solamente sobre la base de la cromaticidad (Brice, 1956)
- Es difícil, en caso de analizar numerosas muestras, encontrar un valor satisfactorio de cromaticidad y en tales casos la precisión y concordancia entre observadores disminuye.
- Demanda mucho tiempo lavar y secar el recipiente cuneiforme.

- **Tintómetro de Lovibond**

Se compara visualmente la miel con patrones de vidrio coloreado, empleando un comparador de color Lovibond 2000 construido con un disco provisto de 6 vidrios circulares de color estándar seleccionados, ensayados y normalizados por USDA, de modo que

correspondan a los patrones de color para miel. Este método fue adoptado en 1986 como método oficial por la A.O.A.C. para la determinación del color en la miel (A.O.A.C. 985.25, 1995)

Deben prepararse suspensiones de turbidez de diferentes concentraciones: 100 mg/l, 200 mg/l y 400 mg/l de tierra de diatomeas. Estas suspensiones se utilizan sólo como ayuda en la clasificación del color y no como estándares para "claridad" que es uno de los factores evaluados en la determinación del grado U.S. de la miel (White, 1960)

Al igual que en el método anterior la muestra se fluidifica, calentando si fuera necesario a una temperatura no mayor de 60 °C (140 °F) y se deja en reposo hasta eliminar las burbujas.

Se vierte la muestra en la cubeta del aparato, si la miel presenta turbiedad se coloca otra cubeta conteniendo la suspensión turbia que corresponda, detrás del patrón. Se rota el disco hasta que el color de la muestra sea igual al color de uno de los vidrios o intermedio entre dos vidrios, empleando una fuente de luz fluorescente blanca o luz de día.

El vidrio representa el color más oscuro permitido en la clasificación de color.

El color se transforma en unidades Pfund (mm) según figura en la escala del instrumento (Brice, 1956)

Por ejemplo:

Si la muestra es de igual tinte que el estándar blanco agua o no tan roja *(es más amarilla)* el color se clasifica "Blanco Agua"; si es perceptiblemente más roja que el estándar blanco agua pero no tan roja como el estándar extra blanco el color se clasifica "Extra Blanco"; y así sucesivamente. Si es más roja que el estándar ámbar, el color se clasifica como "Ámbar Oscuro".

Debe enfatizarse que el tinte (matiz) (calidad ámbar o rojo) es el atributo de color que se considera en esta clasificación (White, 1960)

La relación entre la escala internacional, el color Pfund y Lovibond (color del vidrio) se indica a continuación:

Tabla N° 7: Relación entre la Escala Internacional, el Color Pfund y el Color Lovibond.

ESCALA INTERNACIONAL	COLOR PFUND (mm)	LOVIBOND (color del vidrio)
Blanco agua	8	8
Extra blanco	8,1 – 16,5	16,5
Blanco	16,6 – 34,0	34
Extra ámbar claro	34,1 – 50,0	50
Ámbar claro	50,1 – 85,0	85
Ámbar	85,1 – 114,0	114
Ámbar Oscuro	> 114	-

Mediante este método solo es posible encuadrar la miel dentro de la escala de clasificación de color, no es factible conocer el valor exacto de esta propiedad. Si se desea conocer el valor en milímetros debe recurrirse a la medición con el colorímetro de Pfund.

- **Método Espectrofotométrico**

Para la aplicación de este método (Rodríguez López, 1985) se procede de la siguiente forma: después de calentar la muestra a 40 °C (104 °F) y filtrarla o centrifugarla (4.000 rpm., 10 minutos) para eliminar posibles impurezas se lee la transmitancia (T) en un espectrofotómetro a 445, 495, 550 y 625 nm. Se calcula el valor de "X" utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{“X”} = \frac{X}{X + Y + Z}$$

$$X = 0{,}44\ T_{625} + 0{,}35\ T_{550} + 0{,}2\ T_{445}$$

$$Y = 0{,}20\ T_{625} + 0{,}635\ T_{550} + 0{,}17\ T_{495}$$

$$Z = 0{,}24\ T_{495} + 0{,}94\ T_{445}$$

Las mieles se encuadran en alguno de los tres grupos de clasificación del color de acuerdo con la tabla siguiente.

Tabla N° 8: Grupos de Clasificación de Color.

Grupo	Origen Floral	"X"
I	Romero	0,40
	Azahar	0,40
	Albaida	0,40
	Cantueso	0,44
II	Girasol	0,48
	Espliego	0,50
	Eucaliptus	0,50
III	Bosque	0,56

Este método está en concordancia con el método de los triestímulos.

- **Método de los Triestímulos**

Los triestímulos son cuantificadores de color porque indican cuanto rojo, verde y azul tiene el color en estudio. Se mide y analiza la luz que llega del alimento, no mide color. Este método fue desarrollado por la Comisión Internacional de Iluminación (C.I.E) Consiste en obtener las coordenadas cromáticas del color mediante curvas espectrofotométricas y cálculos (Mateo, 1992)

Es más objetivo y preciso que los otros métodos para clasificar a un alimento según su color, pero es mucho más caro y laborioso que los anteriores.

No se utiliza en el caso particular de la miel ya que la determinación del color se realiza por cuestiones meramente comerciales y basta con medirlo utilizando comparadores visuales.

- **Otros métodos**

Utilizan variables tales como pH, conductividad eléctrica y espectro cromatográfico de azúcares, junto con el tradicional estudio palinólogico (Mateo, 1992)

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 960.44. Color Classification of Honey. Instrumental Method I. *Washington, DC. Sec. 44.4.02. Chap. 44, pp. 20.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 985.25. Color Classification of Honey. Instrumental Method II. *Washington, DC. Sec. 44.4.03. Chap. 44, pp. 20.*

Baldi B., Dall'Ogllio A. y Lescano S. Estudio de la variación del índice glucosa/humedad como indicador de cristalización y su relación con el origen botánico en las mieles (1996) *V Congreso Iberolatinoamericano de Apicultura, pp. 226-230.*

Bogdanov, S., Martin, P. and Lüllmann, C. Harmonized Methods of the European Honey Commission (1997) *Apidologie Extra issue, pp. 1-59.*

Brice, B. A., Turner, A., Jr. and White, J. W., Jr. Glass Color Standards for Extracted Honey (1956) *Journal of Association Official Agricultural Chemists Vol.39, N°4, pp. 919-936.*

Doner, L. W. The Sugars of Honey - A Review (1977) *Journal of the Science of Food and Agriculture 28, pp. 443.*

Fattori, S. B., Gandía S. R. de y Laferriere M. E. Investigación de Dextrinas Ajenas a la Miel. Consulta del 6 de julio, 2002. *http://www.apiservices.com/articulos/dextrinas.htm.*

Gómez Pajuelo, A. (1995) *Vida Apícola Nº 71, Mayo-Junio, pp. 47-51.*

Horn, H. Intensive Practical Course of Honey Analysis (1996) *Landesanslalt für Bienenkunde. Universität Hohenheim. Stuttgart. Germany.*

Mateo Castro, R., Jiménez Escamilla, M y Bosch Reig, F. Evaluation of the Color of Some Spanish Unifloral Honey Types as a Characterization Parameter (1992) *Journal of Association Official Agricultural Chemists Vol.75, N°3, pp. 537-542.*

Persano Oddo, L., Piazza, M.G. and Accorti, M. Diagnosis of unifloral Honeys. 1. Present Knowledge and Problems (1988) *Apiculture, 4, pp. 1-11*.

Rodríguez López, C. Determinación Espectrofotométrica del Color de las Mieles. Un Método Objetivo para su Clasificación en Distintas Calidades Basado en la Medida del Color (1985) *Vida Apícola Nº 16, pp. 24-31.*

Tabouret, T. et al. Rôle de l'activité de l'eau dans la Cristalization di Miel (1979) *Apidologie 10, N°4, pp.341-358.*

USDA. Composition of American Honeys (1962) *U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC, Technical Bulletin 1261.*

White, J. W., Jr. Analysis of Honey (1960) *Journal of Association Official Agricultural Chemists Vol.43, N°3, pp. 638-642.*

White, W. J., Jr. Moisture in Honey: Review of Chemical and Physical Methods (1969) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.52, N°4, pp. 729-737.*

CAPÍTULO III

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

√ **Humedad**

√ **Hidratos de Carbono**

√ **Ácidos**

√ **Materia Mineral**

√ **Materia Nitrogenada**

√ **Hidroximetilfurfural**

√ **Inhibina**

√ **Lípidos**

√ **Vitaminas**

√ **Hormonas**

√ **Polen**

√ **Miel de Mielada**

√ **Flavonoides**

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La miel está constituida principalmente por hidratos de carbono y agua. Entre los constituyentes menores se encuentran minerales, materia nitrogenada y ácidos orgánicos. Posee cantidades muy bajas de lípidos, vitaminas, inhibina, hormonas, polen y pigmentos vegetales tales como xantofilas, carotenos y más de 5000 tipos de flavonoides conjuntamente con otros compuestos fenólicos como ácido benzoico y ácido cinámico.

La composición cualitativa y cuantitativa de los flavonoides está relacionada con el origen botánico de la miel, podría llegar a clasificarse el producto sobre la base del estudio de estos componentes.

Presenta sustancias que no son propias de su composición sino que se generan como consecuencia de los procesos a los cuales es sometida, un ejemplo de ellas es el hidroximetilfurfural.

La concentración de octano se incrementa a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento (Santform, 1999)

En general las mieles poseen un flavor característico debido a la presencia de innumerables sustancias, desde los azúcares propios hasta compuestos volátiles en pequeñísimas cantidades; la cantidad y calidad de estos compuestos depende fundamentalmente del tipo de miel.

Un ejemplo lo constituyen los componentes aromáticos tales como los ésteres de ácidos aromáticos que confieren a las mieles un sabor característico dependiendo de su origen. La miel de *Citrus spp* posee antranilato de metilo, responsable de su flavor particular.

Constituyen el flavor característico conjuntamente con los ésteres aromáticos diversos ésteres de ácidos alifáticos, aldehídos, cetonas y alcoholes.

El origen de estos compuestos es variable, algunos provienen del néctar, otros son incorporados por la abeja y el resto se genera por reacciones químicas y enzimáticas que ocurren durante la maduración de la miel.

En mieles de distintos orígenes se aislaron desde 50 a más de 100 compuestos orgánicos volátiles entre los que se pueden citar: mono y sesquiterpenos y flavors tales como benzaldehído, furfural, isovaleraldehído y fenilacetaldehído. Cada uno de ellos le confiere un aroma particular.

La presencia de 3-metilbutiraldehído y 2-metilbutiraldehído es un índice de la calidad microbiológica de la miel.

El factor que más influye en la composición cualitativa y cuantitativa de estos compuestos son las plantas cuyo néctar liban las abejas, las diferencias entre las distintas colonias de abejas, el manejo apícola y el momento de la cosecha también contribuyen al flavor característico de cada miel (Santform, 1999)

Las mieles con sabores ácidos poseen predominantemente especies tales como *Ammi majus y Seutia buxifolia*, las mieles multiflorales presentan un sabor dulce a ácido ganérico (Baldi, 1996)

El ácido glucónico y la prolina, que naturalmente posee la miel, contribuyen a su sabor.

- **HUMEDAD**

La miel es un alimento de baja actividad acuosa. El contenido de agua depende del tenor de agua del néctar, del manejo apícola, de las condiciones ambientales y de la cosecha y del tratamiento posterior a la extracción. En la miel de panal el contenido de agua es el remanente, luego de la maduración, de la humedad contenida originariamente en el néctar.
En general el tenor normal de agua de la miel bien madurada no supera los 18g%.

Tabla N° 9: Humedad en Mieles Florales y Mielada.

Tipo de Miel	Humedad
Floral [g%]	13,4 - 22,9
Mielada [g%]	12,2 - 18,2

La melaza posee mayor contenido de agua, los valores reportados oscilan entre 26,0 y 29,8g%.

Un exceso de agua torna a las mieles más fácilmente fermentescibles por las levaduras, de carácter osmofílico, que contiene o que pudieran contaminarla. Si el alimento contiene más de 17g% de humedad es susceptible de fermentación, cuando supera los 19g% la probabilidad de que fermente es muy alta (White, 1980)
Como es higroscópica, puede absorber agua del ambiente, como consecuencia se diluye la capa superficial lo que favorece el desarrollo de las levaduras. Para el óptimo almacenamiento del producto la humedad relativa ambiente debe ser menor de 50% (Snowdon, 1996)

- **HIDRATOS DE CARBONO**

Sólo la glucosa y la fructosa representan el 75 % de los sólidos de la miel. Las proporciones de cada una varían pero la relación fructosa/glucosa normalmente está comprendida entre 1:1 y 1,5:1.

Una de las razones de esta relación son las reacciones de transglucosidación (mecanismo enzimático por el cual se transporta la glucosa libre a otro azúcar por ejemplo a la sacarosa o la maltosa) que ocurren durante el proceso de maduración.

Es importante tener en cuenta que existen mieles que naturalmente presentan contenidos mayores de glucosa, como consecuencia la relación fructosa/glucosa está invertida. Ejemplos de estas mieles son: *Taraxacum* y *Helianthus.*
La miel de mielada posee contenidos de glucosa y fructosa bajos.

Otros hidratos de carbono presentes en cantidades mucho menores son:

- 10 disacáridos: sacarosa, maltosa, isomaltosa, maltulosa, turanosa, α y β-trehalosa (principal carbohidrato de la sangre de algunos insectos), laminaribiosa, gentiobiosa y nigerosa. También se encontró kojibiosa que, al igual que la trealosa prácticamente reacciona como disacárido no reductor (USDA, 1962):
- 10 trisacáridos (erlosa y principalmente melezitosa, formadas por un mecanismo de transglucosidación entre la glucosa y la sacarosa), l-kestosa, 3-α-isomaltosilglucosa, maltotriosa, isomaltotriosa, panosa, isopanosa, 1-kestosa, teanderosa y centosa.
- Isomaltotetraosa.
- Isomaltopentaosa (White, 1980)
- Dextrinas.
- Pentosanos.

A título orientativo se incluyen en la siguiente tabla valores obtenidos de la bibliografía para los principales hidratos de carbono de la miel.

Tabla N° 10: Hidratos de Carbono en Mieles Florales y Mielada.

	Miel Floral [g%]	**Mielada [g%]**
Fructosa	24 - 40	3 - 38
Glucosa	22 - 41	19 - 32
Sacarosa	0,2 - 7,5	0,4 - 6
Maltosa	2,5 - 7,5	5 - 13
Dextrinas	0,1 - 4	0,5 - 12
Azúcares Superiores	0,1 - 9	1 - 12,5

En el producto erróneamente llamado *"miel de caña"* se han encontrado valores de hasta 5,3 g% de sacarosa y en melaza de 23,0 a 47,0 g% de este hidrato de carbono.

- **ÁCIDOS**

El ácido glucónico es el ácido predominante en la miel.
Otros ácidos presentes en la miel son: fórmico, acético, málico, cítrico, oxálico, tartárico, pirúvico y succínico. Otros ácidos menos tradicionales son: piroglutámico, α-cetoglutárico, glicólico, maleico, 2 ó 3-fosfoglicénico y α ó β-glicerofosfato (White, 1980)

Se han hallado valores comprendidos entre 17 y 284 mg/kg de ácido fórmico y de 11 a 119 mg/kg de ácido oxálico (Bogdanov, 2002) Se ha demostrado que el contenido de estos ácidos varía de acuerdo con el origen de la miel, los valores promedio observados en mieles de mielada fueron de 22,7 mg/kg y 46,8 mg/kg respectivamente mientras que en mieles florales, de distinto origen botánico, los valores de ácido fórmico oscilaron entre 206,2 y 28,5 mg/kg y de ácido oxálico entre 60,7 y 11,1 mg/kg (Wehling, 2003)

Algunos investigadores encontraron ácidos volátiles además del fórmico, tales como butírico, valérico, caproico y cáprico. Y ácidos málico, láctico y fosfórico (Winton, 1939)

La miel también posee ácidos fenólicos entre los que se encuentran el cafeico, cinámico y ferúlico, estos ácidos son los que le confieren sus propiedades antioxidantes (A.R., 2001)

El principal contribuyente a la acidez de la miel es el ácido glucónico, formado por oxidación enzimática de la glucosa que se encuentra en equilibrio dinámico con la δ-gluconolactona sobre la base de la pérdida o ganancia de una molécula de agua. La cantidad relativa del ácido glucónico y de la δ-gluconolactona depende del pH de la miel, este está regulado por cationes inorgánicos que tienen acción buffer.

$$\text{D – GLUCOSA} + \text{OXÍGENO} + H_2O \longrightarrow \text{ÁCIDO GLUCÓNICO} + H_2O_2$$

$$\text{ÁCIDO GLUCÓNICO} \rightleftarrows \delta\text{ - GLUCONOLACTONA} + H_2O$$

También contribuyen a la acidez los ácidos que se encuentran en pequeña cantidad.

La acidez total de la miel es la suma de la acidez libre y de la acidez de reserva, los responsables de la primera son el ácido glucónico y los otros ácidos libres mientras que la segunda es debida a la δ-gluconolactona (White, 1962)

La acidez total, expresada en miliequivalentes/kilogramo, en mieles florales oscila normalmente entre 1,0 y 6,5 mientras que, en miel de mielada puede alcanzar valores de hasta 11,0. Debe tenerse en cuenta que existen mieles con un contenido natural de ácido mayor, como puede observarse en la tabla.

Tabla N° 11: Acidez Libre, Lactona, Acidez Total y pH en Mieles Florales y Mielada.

	Miel Floral	**Mielada**
Acidez Libre	6 - 48	30 - 76
Lactona	0 - 19	0,3 - 14
Acidez Total	6 - 67	30,3 - 90
pH	3,5 - 4,7	4,5 - 5,5

La miel de mielada posee menor contenido de ácidos y como consecuencia presenta un pH mayor, esto es debido en parte al mayor contenido de minerales que posee (White, 1980)

En mieles fermentadas o en vías de fermentación la acidez es alta debido a la producción de alcohol y posterior transformación en ácido acético, principalmente por la acción de las levaduras capaces de proliferar en ella.

Si la miel ha sido calentada su acidez puede ser alta, esto se debe a la presencia de ácido levulínico y ácido fórmico, productos de descomposición del hidroximetilfurfural formado por deshidratación de las hexosas durante el calentamiento.

D – GLUCOSA $\longrightarrow$ 5 – HMF $\longrightarrow$ ÁC. LEVULÍNICO + ÁC. FÓRMICO

- **MATERIA MINERAL**

En las cenizas de la miel se encontró: K_2O, Na_2O, CaO, MgO y P_2O_5, la miel de mielada posee mayor cantidad de potasio mientras que, en la miel de flores predominan los otros constituyentes minerales. A pesar de esto el potasio es el mineral predominante en la miel.

También posee Cl, S, B, Si y Al; metales pesados tales como Cd, Pb y Zn en mayor proporción en las mieles de mielada y compuestos de P entre los cuales predominan los fosfatos alcalinos.

Contiene oligoelementos entre los que se pueden citar: Fe, Mn y Cu (Winton, 1939)

El contenido de K, Na, Mg, Mn, Fe, Cu, Cl y sulfuro es mayor en mieles oscuras, el porcentaje de Ca, P y Si no varía en forma significativa (USDA, 1962)

Los valores de cenizas normalmente oscilan entre 0,02 y 1,03 g% en mieles florales y entre 0,2 y 1,2 g% en mieles de mielada. El contenido de minerales de la incorrectamente llamada *"miel de caña"* es semejante al de la miel de mielada, en el caso de la melaza los valores están comprendidos entre 3,5 y 7,6 g%.

A título orientativo se incluyen en la siguiente tabla valores obtenidos de la bibliografía para los principales minerales de la miel.

Tabla N° 12: Minerales en Mieles Florales.

Minerales	Miel Floral [mg%]
Potasio	170 - 13
Sodio	0 - 8
Calcio	4 - 10
Magnesio	1 - 4
Manganeso	0,02 - 0,4
Cobre	0,003 - 0,1
Zinc	0,03 - 0,4
Hierro	0,05 - 2
Azufre	6 - 10
Fósforo	2 - 7
Silicio	2 - 4
Cloruro	5 - 11

En mieles argentinas se encontraron valores de hasta 5 mg% de Na, 26 mg% de K, 5 mg% de Ca, 2 mg% de Mg, 300 μg% de Fe, 80 μg% de Mn y 132 μg% de Cu.

En mieles de mielada se reportaron los siguientes valores: 76 mg/kg de Na, 1.676 mg/kg de K, 51 mg/kg de Ca, 35 mg/kg de Mg, 9,4 mg/kg de Fe, 4,09 mg/kg de Mn, 113 mg/kg de Cl, 100 mg/kg de S, 47 mg/kg de P, 36 mg/kg de Si y 0,56 mg/kg de Cu (White, 1980)

- **MATERIA NITROGENADA**

Comprende proteínas, aminoácidos y enzimas.

El contenido de proteínas totales es bajo. En mieles florales se han reportado datos de hasta 0,85 g% y en mieles de mielada valores comprendidos entre 0,30 y 1,40 g%, la miel de mielada posee mayor cantidad de proteínas que la miel de flores.
Las proteínas provienen de las plantas y de la abeja siendo estas últimas comunes a todas las mieles. El porcentaje de proteínas puede orientar sobre el origen de la miel, por ejemplo la miel de brezo *(Calluna)* posee un contenido alto de proteínas al igual que algunas proteínas características de las plantas.
En mieles argentinas provenientes de la provincia de Mendoza fueron reportados valores comprendidos entre 0,37 y 0,62 g%.

En mieles de distintos orígenes se encontraron de 8 a 11 proteínas de las cuales 4 fueron comunes a todas ellas, con referencia a este tema la información disponible es muy escasa.

Se han identificado de 11 a 21 aminoácidos, entre ellos se pueden citar: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina,

lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano y valina. Provienen del néctar, de los exudados de las plantas y del polen, la abeja incorpora aminoácidos propios (White, 1980)
La prolina en miel genuina supera valores de 180 mg/kg., dependiendo del tipo de miel. Su determinación se realiza como un índice de genuinidad.
Teniendo en cuenta que la concentración de prolina en miel de mielada es mayor que en mieles florales y que el perfil de aminoácidos es diferente esta determinación puede orientar sobre el origen del producto. La miel de néctar posee de 0,03 a 0,09 g% de aminoácidos mientras que la miel de mielada puede llegar a contener hasta 2,00 g%.
El contenido de aminoácidos es altamente dependiente del origen de la miel y varía marcadamente con los cambios climáticos y las condiciones ambientales, la miel de mielada posee mayor concentración de aminoácidos que la miel de flores. Los datos que se presentan a continuación son sólo orientativos, fueron extractados de la bibliografía con el objeto de ofrecer una idea aproximada de la magnitud del tenor de aminoácidos en mieles de distinto origen floral y botánico.

Tabla N° 13: Aminoácidos en Mieles Florales.

	Miel Floral [mg%]	**Mielada [mg%]**
Ácido Aspártico	18 - 0,5	1 - 2
Ácido Glutámico	20 - 0,5	--------
Alanina	10 - 0,3	2 - 3
Arginina	5 – 0	--------
Fenilalanina	--------	--------
Cistina	6 – 0	--------
Glicina	6 - 0,2	1 - 2
Histidina	10 - 0,5	1 - 0,5
Isoleucina	5 - 0,5	1 - 0,5
Leucina	5 - 0,1	--------
Lisina	40 - 0,5	--------
Metionina	3 - 0,02	--------
Prolina	300 – 15	90
Serina	25 - 0,5	--------
Tirosina	7 - 0,1	1 - 2
Treonina	4,5 - 0,2	--------
Triptofano	0,1 – 0	--------
Valina	10 - 0,2	--------

La presencia de enzimas representa una de las características distintivas de este alimento, mediante ellas es posible diferenciarlo perfectamente del resto de los edulcorantes. Estos compuestos provienen de la abeja, del polen, del néctar y de microorganismos que pueden contaminarla. Entre las enzimas se encuentran las transglicosidasas que catalizan la transferencia de grupos fructofuranosilos al agua y a diversos alcoholes y azúcares formando glicósidos nuevos.

La principal enzima es la invertasa (sucrasa, sacarasa) agregada al néctar por la abeja, también procedente de las plantas. Hidroliza la sacarosa del néctar, rompe las uniones glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 2$, produciendo azúcar invertido lo que constituye un paso muy importante en la maduración del néctar para dar miel. Su actividad es particularmente sensible al efecto del calor y del almacenamiento. Existen dos tipos de invertasa que difieren en su modo de acción (Horn, 1996):

- Fructoinvertasa, transfiere moléculas de fructosa desde la sacarosa a diferentes azúcares mediante un mecanismo de transfructosidación.

- Glucoinvertasa (α-glucosidasa) producida por la abeja y por insectos succionadores de plantas, es responsable de la producción de diferentes oligosacáridos tales como melezitosa (glucosa-glucosa-fructosa) y erlosa (glucosa-fructosa-glucosa). La presencia de esta enzima explicaría la acumulación de oligosacáridos durante el almacenamiento, incluso de mieles calentadas 30 minutos a 55 ºC (131 ºF) donde la enzima no se inactiva totalmente.
  Es sensible a la luz visible (White, 1980)

Se han encontrado diferentes valores de invertasa en mieles de distintos orígenes: 200,30 U/kg en miel de pino, 23,85 U/kg en miel de naranjo, 93,0 U/kg en miel de girasol y 104,10 U/kg en miel de algodón (Karabournioti, 2001)

Otras enzimas que están presentes en la miel, algunas de ellas en cantidades considerables son:

- Diastasa (α-amilasa) producida fundamentalmente por la abeja, también aportan cantidades pequeñas de esta enzima el polen y el néctar.
  Cataliza la hidrólisis del almidón, rompe las uniones $\alpha 1 \rightarrow 4$ de glucosa de las cadenas de almidón dando dextrinas, maltosa e isomaltosa. Se destruye por calentamiento, pero es más resistente a la acción del calor que la α-glucosidasa.
  La sensibilidad de la diastasa al calentamiento varía de una miel a otra debido a las diferencias normales de pH entre ellas; existen mieles que naturalmente poseen un bajo contenido en diastasas, como la miel de citrus.
  El valor de actividad diastásica es muy variable entre las mieles, por esta razón es difícil fijar un valor que permita considerar a la miel *"calentada"*. Dado que la pérdida de actividad diastásica puede variar mucho entre mieles de distintos orígenes tratadas en forma similar con respecto a las condiciones de calentamiento y/o almacenamiento, establecer un mínimo valor de actividad diastásica no permitiría diferenciar mieles que no fueron sometidas a excesivo calentamiento frente a mieles sobrecalentadas. También es importante tener presente que las mieles provenientes de países o regiones de clima tropical generalmente poseen valores bajos de diastasa.
  Los valores de diastasa encontrados en mieles florales oscilan entre 2,1 y 61,2 mientras que en mieles de mielada varían entre 6,7 y 48,4 (White, 1980).
  Aunque las actividades enzimáticas de la diastasa y de la invertasa en el producto fresco poseen una gran variación, su determinación es útil en control de calidad, principalmente como índice de frescura del alimento. El contenido de enzima depende de la concentración de sacarosa y del flujo diario de néctar.

- Glucosa-oxidasa es responsable de la producción de agua oxigenada y δ - gluconolactona, el agua oxigenada es causante del efecto antibacteriano de la miel. La actividad de esta enzima es destruida por acción de la luz, para conservar su actividad el alimento debe protegerse de ella. Es sensible al efecto del calor, se inactiva a temperatura superior a 55 °C (131 °F), esta propiedad se utiliza conjuntamente, con la determinación de la actividad de la α-glucosidasa, para controlar el tratamiento de pasteurización.

- Catalasa, descompone el agua oxigenada generada por la acción de la glucosa-oxidasa y como consecuencia origina una pérdida del efecto bacteriano de la miel. Se encuentra sólo ocasionalmente en la miel, las mieles viejas presentan actividades más altas de esta enzima. Este hecho podría explicarse basándose en la suposición de que la enzima sea producida por ciertos microorganismos presentes en la miel.

- Fosfatasa ácida, proviene del polen y de la abeja, mediante su acción sobre los compuestos de fósforo (libera fósforo inorgánico de los compuestos orgánicos de fósforo) la abeja obtiene el fósforo indispensable para su metabolismo.

En general las enzimas presentes en la miel se inactivan parcial o totalmente por la acción del calor. Es importante determinar su actividad dado que la actividad de algunas de ellas se encontrará disminuida si la miel fue calentada.

Con el transcurso del tiempo la actividad enzimática disminuye de manera que, una baja actividad también estaría indicando el grado de frescura del producto.

Es importante tener en cuenta que existen mieles que, por su origen, poseen baja actividad enzimática (actividad diastásica) como por ejemplo la miel de cítricos y la miel de falsa acacia. Otras poseen contenidos de diastasa muy elevados como la miel de *Thymus* (Persano Oddo, 1988)

La miel de tréboles también presenta baja actividad diastásica (Serra Bjonvehi, 1988)

La investigación de la actividad de algunas enzimas de la miel se realiza como procedimiento orientativo, junto con otras determinaciones, para poder concluir si el alimento fue expuesto a excesivo calentamiento, almacenado durante largos períodos a temperatura no adecuada, mal procesado o adulterado con productos artificiales.

La determinación de la actividad diastásica se realiza desde hace muchos años para controlar la calidad de la miel, aún en nuestros días es común incluir este ensayo dentro de los análisis de rutina. La legislación internacional contempla la actividad de esta enzima como parámetro de calidad.

La determinación de la actividad de esta enzima fue siempre un tema de gran importancia. La labilidad frente al calor se utiliza en muchos países para comprobar si una miel fue sobrecalentada. A partir del momento en el cual "la pasteurización" de la miel se convirtió en una práctica frecuente fueron desarrollados métodos para evaluar la actividad de otras enzimas más sensibles al calor como por ejemplo la α-glucosidasa y la glucosa-oxidasa.

De lo anteriormente expuesto se desprende que la miel posee una gran variedad de enzimas, la mayoría sensible a la acción del calor y de la luz, siendo la actividad enzimática un importante indicador del grado de frescura y genuinidad del producto. Por este motivo es indispensable que el alimento sea protegido de la acción excesiva del calor y la exposición a la luz.

- HIDROXIMETILFURFURAL

La miel recién extraída contiene una pequeña proporción de 5-hidroxi-metilfurfuraldehido o hidroximetilfurfural (HMF).

En un trabajo de investigación realizado sobre 481 mieles líquidas que provenían directamente de los apicultores se encontró un promedio de 6,2 mg/kg de HMF y en 41 mieles contenidas en panales un promedio de 2,7 mg/kg (White, Nov/1992) Si el producto se obtiene con buenas condiciones de manipuleo puede contener de 3 a 4 mg/kg (Gomez Pajuelo, 1995)
En mieles de mielada, almacenadas en las mismas condiciones, se han encontrado valores mayores que en mieles florales (Vorlova, 2002)

Si la miel es sometida a altas temperaturas, la glucosa y la fructosa se deshidratan y reagrupan generando HMF. Este compuesto es responsable de reacciones de pardeo (browning) por reacción con aminoácidos y azúcares y posterior polimerización y reagrupamiento, ambos en presencia o ausencia de oxígeno (Jeuring, 1980)
La principal formadora de este compuesto es la fructosa debido a que es menos resistente que la glucosa a la acción conjunta de los ácidos y del calor, teóricamente mieles con mayor contenido de fructosa dan origen a mieles con valores más altos de HMF (Tello Durán, 1996)
Con el almacenamiento prolongado también aumenta el tenor de HMF, la acumulación depende de la acidez, del contenido de agua y del contenido de HMF que posea la miel de partida.

Se encuentran valores altos de hidroximetilfurfural luego de almacenamientos muy prolongados o en condiciones que no son las apropiadas para mantener intactas las características físico-químicas del producto, especialmente alta temperatura ambiente. Valores excesivos de ese compuesto también pueden adjudicarse a un calentamiento severo salvo en microondas, en este caso el aumento no es muy significativo. En otros alimentos tales como cereales y derivados se han reportado valores considerablemente mayores de hidroximetilfurfural luego de un calentamiento en microondas (Fernández Márquez, 1995)

Si el alimento está adulterado con jarabe de glucosa o de azúcar invertido obtenidos por hidrólisis ácida o con melaza, el contenido de hidroximetilfurfural puede alcanzar valores muy altos. Las mieles procedentes de regiones con clima tropical generalmente contienen valores elevados de este compuesto.

Las razones que justifican un valor alto de este parámetro pueden ser una o varias de las expuestas anteriormente, es muy difícil arribar a una conclusión satisfactoria sin recurrir a otros ensayos confirmatorios.

De lo anteriormente expuesto se desprende que el HMF es un importante parámetro de calidad de la miel, los límites establecidos por la legislación vigente tienen por objeto fundamental proteger la genuinidad del producto evitando que se comercialice un "alimento alterado". Es importante destacar que otros alimentos poseen cantidades mayores de HMF, generado por el proceso de elaboración, como por ejemplo los flanes con caramelo en los cuales se han encontrado valores de hasta 75 mg/kg y las mermeladas de frutas en las cuales los valores estuvieron comprendidos entre 260 y 560 mg/kg dependiendo de la clase de fruta utilizada. Las bebidas cola poseen alrededor de 160 mg/335 ml.

El contenido de HMF no se limita por un problema de toxicidad que implique un riesgo para la salud pública, para el hombre la ingesta diaria admitida (IDA) es de 2,4 mg/kg de peso corporal. Si se toma como referencia una miel que contenga el máximo permitido de HMF, 80 mg/kg, una persona de 60 kg de peso podría consumir diariamente 144 mg de HMF lo que equivaldría a 1,8 kg de miel (White, Dec/1992)

A continuación se detalla información extractada de diversos trabajos de investigación que puede ser de suma utilidad para tener una idea aproximada de las consecuencias que sufrirá la miel si se la somete a un tratamiento térmico no controlado durante el procesamiento, almacenamiento y/o envasado o por la exposición a altas temperaturas durante el transporte y almacenamiento.

En aquellos casos en los cuales se desee conocer exactamente como aumentará el contenido de HMF o como disminuirá la actividad enzimática en condiciones perfectamente definidas se recomienda realizar un estudio similar con la miel que va a ser procesada y respetando las mismas condiciones de tiempo y temperatura a las que estará sometida durante su procesamiento.

Estudios Comparativos entre Actividad Diastásica y Contenido de Hidroximetilfurfural

J. Schade y colaboradores realizaron un interesante estudio sobre la utilidad de parámetros tales como el contenido de hidroximetilfurfural y la actividad diastásica para detectar alteraciones del producto por la acción del calor (Schade, 1958)

Los autores investigaron la variación natural del contenido de hidroximetilfurfural y de la actividad diastásica durante el almacenamiento y el efecto del calor sobre mieles de distintos orígenes.

Es interesante remarcar que los datos presentados indican que el grado de formación de HMF y la magnitud de la pérdida de la actividad diastásica pueden variar marcadamente entre distintas mieles tratadas en forma similar en lo referente al calentamiento y a las condiciones de almacenamiento.

Las conclusiones del estudio son las que a continuación se detallan:

a) El contenido de HMF aumenta considerablemente luego de un almacenamiento a 20 °C (68 °F) durante 15 meses, tanto como para que el ensayo de Fiehé dé positivo en muestras que presentan resultado negativo antes del almacenamiento. La disminución de la actividad diastásica es poco significativa.

b) La inactivación de la diastasa sigue una cinética de primer orden. El grado de inactivación de la enzima depende del pH de la miel y de la temperatura de almacenamiento. Al aumentar la temperatura de almacenamiento el grado de inactivación de la diastasa es mayor cuanto menor es el pH.
   El ensayo consistió en almacenar mieles de distintos orígenes, con diferentes valores de pH, a 65 y 71 °C (149 y 159,8 °F)
   Calentando una miel de alfalfa (pH 3,5 y 14,5% de agua) a 49 °C (120,2 °F) durante 16 horas la actividad diastásica disminuye ligeramente, mientras que si se la calienta a 82 °C (179,6 °F) a las 2 horas pierde el 50% de la actividad enzimática, a las 3 horas el 75% y a las 4 horas prácticamente no se detecta actividad.

c) La actividad diastásica alcanza valores muy bajos antes que el contenido de HMF alcance valores suficientes como para dar positivo el ensayo de Fiehé.
Se calentó una miel de alfalfa (pH 3,7 - 16,0% de agua - 13 unidades/g de AD y 1 μg/g de HMF) a 68 °C (154,4 °F) durante 48 horas. Se observó que el grado de formación de HMF aumenta a medida que aumenta el contenido inicial de HMF de la miel.

d) El contenido de agua es uno de los factores que influye en el grado de formación del HMF.
Después de calentar mieles de alfalfa blanca, con diferentes contenidos de agua (12,5 a 17,2 %) a 55 °C (131 °F) durante 1, 2 y 6 días se observó que, como consecuencia de un calentamiento durante 6 días, el contenido de HMF aumenta notablemente con el aumento del contenido de agua. Se observaron diferencias mucho menos marcadas en las muestras que no fueron tan severamente calentadas, o sea mantenidas a 55 °C (131 °F) durante 1 o 2 días.

e) El contenido de HMF aumenta en forma objetable entre mieles calentadas a distintas temperaturas a pesar de que los valores de pH, contenido inicial de HMF y contenido de agua sean similares.
Se estudiaron tres mieles de alfalfa con valores de pH alrededor de 3,6, contenido de agua de 16,6% y cantidad inicial de HMF no apreciable, incubándolas a 35 °C, 45 °C y a 55 °C (95 °F, 113 °F y 131 °F)
Se destaca la importancia de esta conclusión ya que las temperaturas a las cuales se trabajó están dentro del rango de temperaturas climáticas comúnmente alcanzadas en regiones de clima cálido de modo que sería posible encontrar cantidades detectables de HMF en mieles que han sufrido cortas exposiciones al sol.

En otro estudio, llevado a cabo por White en el laboratorio del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos se investigó el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de HMF y las actividades de la diastasa e invertasa de este alimento (White, Nov, Dec/ 1992)
Para estudiar el efecto del calor sobre el primer parámetro fueron almacenadas tres mieles a siete temperaturas comprendidas entre 20 °C (68 °F) y 60 °C (140 °F) durante 18 meses, al cabo de los cuales se cuantificó el contenido de HMF.

Los resultados mostraron que, dentro del intervalo de temperaturas estudiado, existía una relación lineal entre el logaritmo del tiempo requerido para alcanzar un determinado nivel de HMF y la temperatura.

- Se requieren 5 días para alcanzar un nivel de 15 mg/kg. de HMF almacenando el producto a aproximadamente 47 °C (116,6 °F) y 10 días para llegar a 40 mg/kg.
- Si la miel se almacena a 25 °C (77 °F) sólo después de aproximadamente 7 meses el contenido de HMF alcanza los 15 mg/kg y luego de 13 meses los 40 mg/kg.
- Se requieren combinaciones de temperatura/tiempo de almacenamiento iguales a 25 °C (77 °F) /18 meses o 39 °C (102,2 °F) /2 meses para que el contenido de HMF llegue a los 80 mg/kg.

El autor enfatiza que los datos suministrados deben tomarse en forma estimativa dado que todos los atributos estudiados están íntimamente ligados al origen de la miel y no es posible generalizar.

Se hace referencia a ciertos resultados que demuestran que trabajando con la tecnología y las condiciones apropiadas el aumento del HMF no superaría, en promedio, los 8,5 mg/kg.

Con respecto a la actividad enzimática el autor opina que un largo almacenamiento a temperatura moderada genera la misma pérdida de actividad enzimática que una exposición prolongada a altas temperaturas. Considera que este hecho es de gran importancia ya que, para juzgar con una simple determinación de la actividad diastásica si una miel fue sobrecalentada se requiere el conocimiento de la actividad enzimática inicial de esa miel pero, sabiendo que el contenido inicial varía dentro de un amplio rango no es correcto tomar los valores generales para calcular el daño producido por el calor.

Se estudió el tiempo necesario para que la actividad enzimática disminuyera a la mitad de la inicial almacenando las mieles en un rango de temperaturas entre 20 °C (68 °F) y 80 °C (176 °F). De los resultados obtenidos se demuestra que un almacenamiento a 30 °C (86 °F) durante 6 meses y medio es equivalente a calentar a 70 °C (158 °F) durante 5,3 horas, bajo estas condiciones la actividad de la enzima disminuye a la mitad de su valor inicial.

En la siguiente tabla se transcriben los resultados obtenidos en un estudio realizado sobre 72 mieles argentinas de las cuales 15 estaban alteradas y 19 adulteradas (Fattori, 1996)

Tabla Nº 14: Actividad Diastásica en Mieles Alteradas y Adulteradas.

MIEL	Mieles Alteradas		MIEL	Mieles Adulteradas	
	HMF (mg/kg)	AD (Unid./g)		HMF (mg/kg)	AD (Unid./g)
1	31,6	6,9	**1**	9,8	3,6
2	40,0	6,4	**2**	40,2	6,0
3	40,0	5,1	**3**	57,1	3,9
4	37,4	6,5	**4**	58,1	4,0
5	72,0	6,8	**5**	10,0	4,1
6	28,9	3,6	**6**	9,5	3,2
7	93,5	1,2	**7**	40,2	6,5
8	31,1	5,2	**8**	40,5	6,2
9	65,7	0,5	**9**	40,5	4,1
10	68,6	7,8	**10**	42,6	5,2
11	7,5	2,3	**11**	40,2	4,1
12	136,8	2,2	**12**	4,6	4,0
13	146,8	5,3	**13**	1,6	4,4
14	64,5	6,5	**14**	5,3	5,5
15	73,6	6,9	**15**	4,0	8,7
-	-	-	**16**	23,0	6,8
-	-	-	**17**	5,1	4,0
-	-	-	**18**	47,5	3,2
-	-	-	**19**	2,5	4,0

Las mieles fueron clasificadas en *"alteradas"* y *"adulteradas".* Las primeras en base a los contenidos de HMF que en todos los casos, a excepción de uno, coincidieron con valores bajos de actividad diastásica. Las segundas se analizaron por TLC y en ellas se detectó presencia de maltodextrinas, se puede observar que en este caso aproximadamente el 53% de las mieles presentaron altos contenidos de HMF a pesar de que todas poseían baja actividad enzimática. Probablemente algunas no habían sido sometidas a un calentamiento tan excesivo como para aumentar el HMF pero sí destruir enzimas.

- INHIBINA

La miel posee actividad antibacteriana, esta propiedad puede atribuirse a diferentes factores. Este alimento presenta alta presión osmótica, baja actividad acuosa, pH bajo y un entorno ácido, condiciones que generan un ambiente desfavorable para el desarrollo microbiano. Debido al alto contenido de azúcares reductores su potencial redox es bajo, su viscosidad característica limita la entrada de oxígeno necesario para el crecimiento de los microorganismos aerobios, la alta relación carbono/nitrógeno conjuntamente con el bajo contenido de proteínas no son favorables para la proliferación de los microorganismos. Una serie de sustancias químicas contribuyen a este efecto: lisozima, ácidos fenólicos, terpenos, alcohol benzílico y sustancias volátiles y principalmente el sistema glucosa oxidasa que genera agua oxigenada (Snowdon, 1996)

Las propiedades bactericidas de la miel se conocían desde principios del siglo XX, la naturaleza química del compuesto responsable de esa propiedad se ignoraba e inicialmente se denominó "inhibina". Con el tiempo se demostró que el efecto inhibitorio se debía a la presencia de H_2O_2 (White, 1963), producto de la acción de la glucosa oxidasa sobre el ácido glucónico de la miel.

La capacidad de inhibir el crecimiento microbiano depende del origen floral tanto, en lo referente a la calidad como a la cantidad del efecto. Por ejemplo mieles de distinto origen inhiben el crecimiento de diferentes microorganismos y otras poseen diferente efecto antimicrobiano sobre el mismo microorganismo. La miel de mielada posee mayor actividad antimicrobiana que la miel de flores.

El peróxido de hidrógeno se destruye por acción del calor, es más lábil que la diastasa. Por esta razón mieles con bajas actividades de diastasa y valores altos de inhibina no deberían juzgarse como inaceptables debido a un sobrecalentamiento, al igual que aquellas con cantidades altas de hidroximetilfurfural e inhibina (Schade, 1958)

Algunos autores no recomiendan utilizar este parámetro como factor de calidad porque, como se expuso anteriormente, su sensibilidad varía ampliamente frente a la acción del calor y de la luz y su distribución depende de la fuente floral.

Se ha propuesto la evaluación de la actividad de invertasa juntamente con el contenido de inhibina para determinar la calidad de la miel luego de su procesamiento (White, 1980)

Schade, Marsh y Eckert encontraron valores de inhibina comprendidos entre 1,0 y 4,0 en mieles con cantidades aceptables de HMF y actividades diastásicas menores de 8. Una muestra con 33,0 mg/kg de HMF y trazas de actividad enzimática presentó un valor de inhibina igual a 0 (Schade, 1958)

- **LÍPIDOS**

Los lípidos presentes en la miel provienen principalmente de las plantas y de restos de cera, su contenido es muy bajo (aproximadamente 0,04%) En mieles argentinas provenientes de distintas provincias se encontraron valores comprendidos entre 0,098 y 0,195 % de lípidos (Pereyra González, 1993)

El residuo graso de esas mieles contiene glicéridos, esteroles y posiblemente fosfolípidos.

Entre los ácidos grasos analizados por cromatografía gaseosa fueron detectados:

- Ácidos con menos de 12 carbonos.
- Ácido laúrico (12:0)
- Ácido mirístico (14:0)
- Ácido pentadecanoico (15:0)
- Ácido pentadecenoico (15:1)
- Ácido palmítico (16:0)
- Ácido palmitoleico (16:1)
- Ácido esteárico (18:0)
- Ácido oleico (18:1)
- Ácido linoleico (18:2)
- Ácido linolénico (18:3)
- Ácido n-decanodioico
- Ácido decanodioico monoetilénico en C_{10}.
- Ácidos con más de 18 carbonos.

Los ácidos grasos predominantes fueron: palmítico, oleico y linoleico.

La determinación del perfil de ácidos grasos puede realizarse como un índice de genuinidad del producto, en especial la detección de los ácidos n-decanodioico y decanodioico monoetilénico en C_{10}. Este último también se encontró en jalea real (INFyB, 1978)

- VITAMINAS

La miel contiene cantidad apreciable de Ácido Ascórbico (vitamina C) y pequeñas proporciones de vitaminas del grupo B: Tiamina (B_1), Riboflavina (B_2), Ácido Nicotínico, Piridoxina (B_6), Cianocobalamina (B_{12}) y Ácido Pantoténico (Horn, 1996)

Existe cierto grado de destrucción de la vitamina C durante la maduración y el almacenamiento debido a la presencia de H_2O_2 generada por la acción de la glucosa-oxidasa.

Las vitaminas que se encuentran en la miel provienen del polen y del néctar, de allí que su contenido varíe con el origen floral.

En la siguiente tabla se transcriben valores obtenidos para las vitaminas de la miel. Dadas las bajas concentraciones en que se encuentran estos nutrientes no son de importancia desde el punto de vista nutricional.

Tabla Nº 15: Composición Cualitativa y Cuantitativa de Vitaminas en la Miel. (Horn. 1996)

VITAMINA	CANTIDAD (mg/kg)
B_1 (Tiamina)	0,04 - 0,2
B_2 (Riboflavina)	0,1 - 0,6
Ácido Nicotínico	1,1 - 9,8
Ácido Pantoténico	0,2 - 1,1
B_6 (Piridoxina)	0,08 - 3,2
C (Ácido Ascórbico)	16,0 - 34,0
B_{12}(Cianocobalamina)	0,03 - 0,04

- HORMONAS

Hormonas tales como acetocolina y colina son producidas y secretadas por las abejas, quienes las incorporan a la miel (Horn, 1996)

Ciertos efectos fisiológicos de la miel se deben a la presencia de estas sustancias. Se han encontrado valores comprendidos entre 0,06 y 5,0 mg/kg de acetilcolina y 0,3 a 30,0 mg/kg de colina.

También se encontró una fitohormona, los isómeros cis y trans del ácido absícico. Teniendo en cuenta que en las plantas sólo se encuentra el isómero cis podría estudiarse la relación entre ambas formas y evaluar como trataron las abejas el material que recolectaron.

- POLEN

Componente esencial de la miel. El polen que contiene la miel proviene de las flores cuyo néctar libaron las abejas. Los granos de polen constituyen la fuente de nitrógeno de la abeja, es introducido incidentalmente en la colmena.

El estudio de los granos de polen contenidos en la miel permite conocer su origen floral y geográfico mientras que, su ausencia puede ayudar a corroborar una adulteración.

El contenido de polen es menor de 0,01 %, no es importante desde el punto de vista nutricional.

El polen, como subproducto de la colmena, tiene una composición superior al polen de las flores porque las abejas lo enriquecen con secreciones propias y néctar. Está compuesto por proteínas, lípidos, minerales, vitaminas y hormonas; es una fuente importante de hidratos de carbono, vitaminas y minerales, posee efectos benéficos para la salud.

- **MIEL DE MIELADA**

En general existen diferencias significativas entre las características físico-químicas de las mieles florales y la miel de mielada. Por ejemplo la miel de mielada:

- Es más oscura.
- Generalmente no cristaliza.
- Presenta cantidades bajas de dextrosa y levulosa y altas de azúcares superiores y material indeterminado.
- Los valores de pH son mayores, la acidez libre y total es especialmente alta y la relación lactona/acidez libre es baja.
- El ácido que predomina es el cítrico, posee muy baja cantidad de otros ácidos orgánicos tales como el fumárico, succínico y málico encontrados en la miel de flores.
- Posee mayor contenido de cenizas. El mineral que predomina es el potasio frente al sodio, calcio, magnesio cloruro, azufre, hierro y fósforo que se encuentran en pequeña cantidad.
- La conductividad eléctrica es mayor.
- Contiene melezitosa y maltotriosa, este es un buen indicador de que la miel contiene miel de mielada.
- Es dextrorrotatoria.
- El contenido de prolina es mayor.
- Posee ácido úrico.
- Posee mayor actividad antimicrobiana.
- Posee elementos microscópicos característicos tales como: hifas y esporas de hongos, algas y elementos céreos provenientes de insectos productores de mielada.

La determinación de estos parámetros permite diferenciar la miel de flores de la miel de mielada y detectar su presencia en mezclas.

En general la miel de flores es la más apreciada pero en algunos países la miel de mielada es considerada de mejor calidad porque posee mejor sabor, contiene mayor cantidad de

minerales y de enzimas, es más estable frente a la acción del calor y se puede almacenar durante períodos mayores sin perder enzimas.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A continuación, a modo de ejemplo se presentan los valores promedio de algunos parámetros físico-químicos determinados sobre 72 muestras de mieles argentinas (Fattori, 1996)

Tabla Nº 16: Características Físico-Químicas de Mieles Argentinas.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	VALORES OBTENIDOS
AGUA (g%)	Mín. 14,0 Máx. 18,0 Prom. 16,2
CENIZAS (g%)	Mín. 0,01 Máx. 0,21 Prom. 0,06
AZÚCARES REDUCTORES DIRECTOS (en g% de azúcar invertido)	Mín. 70,3 Máx. 85,3 Prom. 78,7
SACAROSA APARENTE (g%)	Mín. 0,7 Máx. 10,0 Prom. 2,8
DEXTRINAS TOTALES (g%)	Mín. 0,3 Máx. 2,8 Prom. 1,5
pH	3,47 a 3,87
ACIDEZ LIBRE (miliequivalentes/kg)	Mín. 6,8 Máx. 35,8 Prom. 16,4
HIDROXIMETILFURFURAL (mg/kg)	Mín. 0,7 Máx. 18,5 Prom. 5,8
ACTIVIDAD DIASTÁSICA (Unidades/g)	Mín. 8,0 Máx. 18,5 Prom. 11,4

- **FLAVONOIDES**

Estos compuestos conforman un grupo de sustancias hidrofílicas caracterizadas por la presencia de grupos hidroxifenilos. Son derivados de las γ-pironas y se dividen en *flavonas* e *isoflavonas* y, de acuerdo con su grado de oxidación en *flavonoles* y *flavononas*, presentan fluorescencia.

Se han reportado valores comprendidos entre 5-50 miligramos / 100 gramos de miel.

BIBLIOGRAFÍA

A. R. (Julio, 2001) El Poder Antioxidante de la Miel. *El Mundo, Suplemento de Salud, Nº 441.* Consulta del 2 de febrero, 2004, *http://www.el-mundo.es/salud/2001/441/994430341.html*

Baldi, B., Dall'Ogllio, A. y Lescano, S. Estudio de la variación del índice glucosa/humedad como indicador de cristalización y su relación con el origen botánico en las mieles (1996) *V Congreso Iberolatinoamericano de Apicultura, pp. 226-230.*

Bogdanov, E., Charrière, J-D., Imdorf, A., Kilchenmann, V. and Fluir, P. Determination of Residues in Honey after Treatments with Formic and Oxalic Acid under Field Conditions (2002) *Apidologie 33, pp. 399-409.*

Fattori S. y Cukier A. Importancia del Control de Calidad de la Miel (1996) *V Congreso Ibero Latinoamericano de Apicultura, Mercedes*. *30 de mayo al 2 de junio, pp. 233.*

Fernández Márquez, M., García Villanova, B., Ruiz López, M. D. y Montilla, J. Determinación de Humedad en Cereales y Derivados por Calentamiento con Microondas y Análisis de Hidroximetilfurfural (HMF) Formado (1995) *Ars Pharm.36 (2); pp. 207-213.*

INFyB. Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología. Contribución a la Caracterización Química de la Jalea Real y a su Detección en Mezclas con Miel (1978) *Boletín Interno N°21.*

Gomez Pajuelo, A. (1995) *Vida Apícola Nº 71, Mayo-Junio, pp. 47-51.*

Horn, H. Intensive Practical Course of Honey Analysis (1996) *Landesanslalt für Bienenkunde. Universität Hohenheim. Stuttgart. Germany.*

Jeuring, H.J. and Kuppers, F. J. High Performance Liquid Chromatography of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Spirits and Honey (1980) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.63, N°6, pp. 1215-1218.*

Karabournioti, S. and Zervalaki, P. Efecto del Calentamiento en el HMF y la Invertasa de la Miel (2001) *Apiacta, 36 (4), pp. 177-181.*

Pereyra González, A. S. Estudios sobre Mieles de Abeja, Apis mellífera, de Producción Nacional: Evaluaciones de Contenidos de Nitrógeno, Lípidos Totales y sus Composiciones Acídicas y Valores de la Relación Glucosa/Fructosa (1993) *Tesis Doctoral, pp. 43-86.*

Persano Oddo, L., Piazza, M.G. and Accorti, M. Diagnosis of unifloral Honeys. 1. Present Knowledge and Problems (1988) *Apicultura, 4, pp. 1-11*.

Schade, J. E., Marsh, G. L. and Eckert, J. E. Diastase Activity and Hidroxi-methyl-furfural in Honey and their Usefulness in Detecting Heat Alteration (1958) *Food Res. 23, pp. 446-463.*

Serra Bjonvehi, J. Determinación de Antranilato de Metilo en la Miel de Cítricos *(Citrus sp)* del Levante Español, y su Influencia en la Actividad Diastásica de la Miel (1988) *Alimentaria 11, pp. 37-40.*

Snowdon, J. A and Cliver, D. O. Review Article. Microorganisms in Honey (1996) *International Journal of Food Microbiology 31, pp. 1-26.*

Santforn, V. O. and Manura, J.J. Flavor and Aroma in Natural Bee Honey (1999) Consulta del 3 de febrero, 2004, *http://www.sisweb.com/referenc/applnote/app-25-a.htm.*

Tello Durán, J. E., Cortopassi-Laurino, M., Cavichio Issa, M. R., Vagner de Alencar, A de T., Bastos, E. e Egea Soares, A. E. Méis Brasileiros: Resultados de Análises Físico-Químicas e Palinológicas (1996) *Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura. Teresina, Piauí. 26 a 30 de Novembro, pp. 403-429.*

USDA. Composition of American Honeys (1962) *U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC, Technical Bulletin 1261.*

Vorlova, L., Celechovska, O. Activity of Enzymes and Trace Element Content in Bee Honey (2002) *Acta Vet. Brno., 71, pp. 375-378.*

Wehling, M., von der Ohe, W. and von der Ohe K. Natural Content of Formic and Oxalic Acids in Honeys (2003) *Apiacta.38, pp. 257.*

White, W. J., Jr. Determination of Acidity, Nitrogen and Ash in Honey (1962) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.45, N°3, pp. 548-551.*

White, J. and Subers, M. Studies on Honey Inhibine. 2. A Chemical Assay. (1963) *J. Apic. Res. 2 (2), pp. 93-100*.

White, J. W., Jr. and Doner, Landis W. Honey Composition and Properties. (Revised October 1980) Beekeeping in the United States. Agriculture Handbook Number 335. Consulta del 31 de enero, 2004, *http://www.beesource.com/pov/usda/beekpUSA82.htm*.

White, J. W. Quality Evaluation of Honey: Role of HMF and Diastase Assays. Part I of a two-part article (November 1992) *American Bee Journal, pp. 737-743*.

White, J. W. Quality Evaluation of Honey: Role of HMF and Diastase Assays. Part II of a two-part article (December 1992) *American Bee Journal, pp. 792-794*.

Winton, A. L, Ph.D. and Winton, K. B.,Ph.D. The Structure and Composition of Foods (1939) *John Wiley & sons, Inc., New York. Vol IV, pp. 45-66.*

CAPÍTULO IV

MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

√ Origen Geográfico y Botánico

√ Humedad

√ Hidratos de Carbono

√ Ácidos

√ Materia Mineral

√ Sólidos Insolubles en Agua

√ Materia Nitrogenada

√ Hidroximetilfurfural

√ Inhibina

√ Flavonoides

√ Compuestos Orgánicos Volátiles

MÉTODOS DE ANÁLISIS

En la República Argentina, en el *Código Alimentario* (ley 18.284 del año 1969 y Decreto Reglamentario 2126/71 del 30 de junio de 1971) se incluyen los métodos oficiales para el análisis de la miel.

El *Codex Alimentarius* contiene métodos de análisis y muestreo para este alimento, los cuales están incluidos en el Capítulo 13.

La *Comisión Internacional de la Miel*, formada en 1990, se ocupa de revisar los métodos de análisis presentes y las normas legislativas vigentes.
Esta Comisión está oficialmente reconocida por la Unión Europea y el Codex Alimentarius. Trabaja en colaboración con la *Comisión de Miel del Manual Suizo de Alimentos*, los métodos aprobados se publican primeramente en él.

Los métodos de análisis que pueden aplicarse para el control de calidad de este alimento son muchos y muy variados, se puede optar por aquellos utilizados tradicionalmente o por otros con semejante grado de precisión, reproducibilidad y con una buena correlación de los resultados.

MUESTREO

Obtención de la muestra de laboratorio

La muestra que va a ser analizada debe ser representativa. Una muestra representativa es aquella en la cual se estima que sus propiedades físico-químicas son un promedio de las propiedades físico-químicas del lote al cual pertenece.

Las muestras de miel que se reciben en el laboratorio para su análisis pueden ser mieles líquidas y homogéneas, total o parcialmente cristalizadas, con impurezas o contenidas en panales.

Para lograr resultados confiables es esencial que la muestra de partida esté perfectamente homogeneizada. En algunos casos esta es una tarea difícil dadas las características del producto.

La homogeneización debe realizarse lo más rápidamente posible debido a que la miel es muy higroscópica, por el mismo motivo después de tomar la muestra para cada uno de los análisis que se vayan a realizar debe cerrarse el frasco que la contiene. Es conveniente determinar el contenido de agua en primer lugar.

Siempre que sea posible debe evitarse calentar la miel, especialmente si se va a determinar el contenido de hidroximetilfurfural y/o su actividad enzimática.

Teniendo en cuenta las diferentes formas posibles de presentación de la muestra las operaciones que deben realizarse para lograr una correcta homogeneización son las siguientes (A.O.A.C. 920.180, 1995):

- ✓ Si la miel es líquida, basta invertir varias veces el recipiente que la contiene. En caso de presentar impurezas debe filtrarse a través de estopa de algodón.

- ✓ Si está cristalizada se homogeneiza con una varilla. Si presenta impurezas (restos de cera, palillos, abejas o larvas, partículas de panal, etcétera) se la pasa por un tamiz de 0,50 mm de apertura de malla con la ayuda de una espátula.

- ✓ Las mieles parcialmente cristalizadas pueden calentarse hasta 60 °C (140 ºF) con excepción de las porciones que van a utilizarse para determinar el contenido de hidroximetilfurfural y la actividad enzimática.

- ✓ Cuando la miel está contenida en panales, se elimina la capa de cera y se extrae la muestra por escurrido, si esto no es posible puede calentarse hasta 60 °C (140 ºF) para licuarla con las excepciones anteriormente expuestas.

Este método ha sido adoptado internacionalmente para llevar a cabo la preparación de la muestra de miel.

Los métodos de análisis que se tratarán en este capítulo son los que se especifican a continuación:

- **ORIGEN GEOGRÁFICO Y BOTÁNICO**
  Análisis Microscópico
  Análisis Botánico
  Melisopalinología
  Antranilato de metilo
  Espectrofotometría
  Cromatografía Gas-Líquido

- **HUMEDAD**
  Directos
  Secado en estufa de vacío
  Arrastre con tolueno
  Karl Fisher
  Indirectos
  Refractometría

- **HIDRATOS DE CARBONO**
  Sólidos Solubles
  Refractometría
  Densitometría
  Azúcares Totales
  Cromatografía en Columna
  Oxidación con Sales Cúpricas en Medio Alcalino
  - Fehling – Causse – Bonnans
  - Lane-Eynon
  - Munson y Walker

Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- Con detector de índice de refracción
- Con detector amperométrico
Cromatografía Gas-Líquido

Monosacáridos y Disacáridos
Enzimático con Glucosa-Oxidasa
- Determinación de Glucosa
- Determinación de Sacarosa
Métodos Polarimétricos
- Rotación Específica
- Mutarrotación
- Determinación de glucosa y fructosa

Dextrinas Totales
Gravimetría

- **ÁCIDOS**
  Titulación Ácido-Base

- **MATERIA MINERAL**
  Cenizas Totales
  Cenizas Solubles
  Alcalinidad de Cenizas
  Conductividad Eléctrica

- **SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA**
  Gravimetría

- **MATERIA NITROGENADA**
  Aminoácidos: Prolina
  Espectrofotometría
  Proteínas
  Micro-Kjeldhal
  Biuret
  Folin y Ciocalteu
  Ácido Úrico
  Cromatografía en Capa Fina
  Actividad diastásica
  Gothe
  Schade
  Phadebas
  Actividad de Invertasa
  Espectrofotometría
  Actividad de Glucosa-oxidasa
  Espectrofotometría

- **HIDROXIMETILFURFURAL**
  Colorimetría
  Fiehé
  Feder

Espectrofotometría
Winkler
White
Schade
Cromatografía Líquida de Alta Resolución

- **INHIBINA**
  Método microbiológico

- **FLAVONOIDES**
  Cromatografía en Capa Fina

- **COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES**
  Cromatografía Gas-Líquido

ORIGEN GEOGRÁFICO Y BOTÁNICO

El examen microscópico reviste suma importancia, un análisis físico-químico de miel no puede ser considerado completo si no fue realizada una observación microscópica de la muestra. Este análisis es útil, por un lado para detectar la presencia de ciertos contaminantes e impurezas y por otro para clasificar la miel según su origen.

Análisis Microscópico

Mediante la observación microscópica pueden encontrarse pelos, restos de abejas, tejidos vegetales, granos de almidón y otras partículas microscópicas que no deben estar presentes.
Puede alertar sobre una posible adulteración con productos derivados de la caña de azúcar porque entre los tejidos vegetales pueden detectarse anillos simples de los vasos del xilema, células parenquimáticas y esclereidas de la caña de azúcar que necesariamente deben estar ausentes en el producto genuino.
Proporciona información aproximada sobre el contenido de levaduras y como consecuencia orienta sobre una posible fermentación.

Si la miel se produce siguiendo las buenas prácticas de manufactura y dadas sus características físico-químicas el producto que se obtiene posee niveles muy bajos de contaminación.
En general pueden encontrarse microorganismos provenientes de una contaminación post-cosecha: hongos pertenecientes al género *Aspergillus* y *Penicillium*, distintas especies de levaduras del género *Saccharomyces* y *Torulopsis.* y bacterias del género *Clostridium, Micrococcus, Citrobacter, Enterobacter, Pseudomonas* y *Bacillus.* Entre estos últimos se encuentran *Bacillus larvae* y *Bacillus alvej* responsables de las enfermedades de las abejas conocidas como "loque americana" y "loque europea" respectivamente.
También se hallan microorganismos que indican la calidad sanitaria y comercial tales como *Escherichia coli* y levaduras y otros que bajo ciertas condiciones pueden causar enfermedades

al hombre como ciertas especies de *Clostridium*., si bien las esporas no pueden germinar, dadas las características osmofílicas del alimento, la miel es un vehículo para ellas.
Las formas vegetativas de los microorganismos no se encuentran normalmente en la miel (Snowdon, 1996)

El polen, tracto digestivo de la abeja, polvo, aire, tierra y néctar son potenciales fuentes de contaminación que no pueden manejarse, a diferencia de otras contaminaciones controlables por las buenas prácticas de manufactura.
De lo anteriormente expuesto se desprende que la observación de los microorganismos permite inferir sobre las buenas prácticas de manufactura aplicadas en el proceso de producción y procesamiento y sobre la conservabilidad del producto durante su almacenamiento.

Como ya se explicó en el capítulo I el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel (Resolución GMC 15/94) establece límites para ciertos microorganismos (Bacterias Coliformes Totales - Salmonella spp. - Shigella spp. y Hongos y Levaduras) y los métodos de análisis que deberán utilizarse. No es la finalidad de este libro ahondar en métodos microbiológicos de modo que solamente se hará referencia a ellos.
La determinación de bacterias coliformes totales debe realizarse según el método de recuento directo en placa de agar bilis lactosa - rojo neutro- cristal violeta (ICMSF, 1978)
La investigación de Salmonella y el recuento de hongos y levaduras según los métodos 26.12 y 17.52 respectivamente (A.P.H.A., 1978)

Análisis Botánico

Una miel genuina necesariamente debe contener granos de polen y trazas de cera junto a los cristales de azúcar, no deben encontrarse gránulos de almidón.
Para realizar el análisis microscópico la muestra se diluye con el doble de volumen de agua y se deja toda la noche en reposo. Se toma el sedimento con una pipeta y se observa al microscopio (Pearson, 1976)

La melisopalinología es la aplicación de la palinología al estudio de la miel, permite afirmar si el espectro polínico es normal. Mediante el análisis microscópico del polen es posible clasificar el producto de acuerdo con su origen geográfico y botánico, comprobar si la miel puede llamarse monofloral. En algunos casos este método puede complementarse con ciertas determinaciones químicas que permiten obtener conclusiones sobre el origen de la miel. El origen geográfico permite conocer la región donde se produjo la miel y el origen botánico la fuente floral utilizada por las abejas.
Esta clasificación es muy importante desde el punto de vista comercial, se realiza en la mayoría de las transacciones comerciales para comprobar si el espectro de polen encontrado corresponde a una miel genuina de un determinado origen y si se la puede considerar monofloral.

En principio el origen geográfico puede determinarse en cualquier miel que contenga polen mientras que, sólo es posible conocer el origen botánico en mieles extraídas por centrifugación. En miel prensada, miel de brezo y aquellas sometidas a procesos de filtración a través de tierra de diatomeas u otros métodos que eliminen los granos de polen no es posible conocer el origen botánico.

En algunas muestras puede ser necesario conocer la cantidad de sedimento y determinar la cantidad absoluta de constituyentes de plantas con el fin de establecer si la miel fue extraída por centrifugación, principalmente en aquellos casos en los cuales exista considerable cantidad de partículas que no se encuentran usualmente en este producto.

Los métodos de análisis disponibles son subjetivos, muy laboriosos y requieren mucho tiempo. Sólo pueden ser llevados a cabo por personas altamente especializadas.
Los análisis cualitativo y cuantitativo para la determinación del origen botánico deben realizarse siguiendo la metodología de Louveaux, Maurízio y Vorwohl (Louveaux, 1978)
El Codex Alimentarius, a través de su Comité sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras elaboró una Norma sobre el examen microscópico de la miel (CCA, 1968)

Análisis cualitativo

Consiste en la examinación microscópica del sedimento que queda luego de centrifugar una solución de miel sin tratamiento previo o sometida a un proceso de acetólisis.
La acetólisis es un proceso que destruye hifas de hongos, levaduras, algas, la pared de algunos granos de polen y otras partículas que contaminan la miel. Se realiza sobre el sedimento completamente seco tratándolo con ácido sulfúrico y anhídrido acético.
La muestra de laboratorio debe ser de 100 a 200 gramos.

La determinación del origen geográfico se basa en la identificación y recuento de granos de polen y otras partículas. Los granos de polen se identifican con la ayuda de preparados de referencia o datos de la literatura.
En algunos casos el origen geográfico puede determinarse por la presencia de polen característico de una dada región pero en general lo que se determina son combinaciones de ciertos pólenes. El espectro polínico de una miel va a depender de las condiciones florales, agrícolas y forestales de la región donde se produce el alimento.

El análisis puede ser:

a) Estimativo: se identifican los elementos vegetales más frecuentes y se buscan aquellos cuya caracterización es importante para el fin perseguido.

Para estimar la frecuencia de los granos de polen se utilizan los siguientes términos:

- Muy frecuente: más del 45% del total de granos de polen.
- Frecuente: entre el 16 y el 45% del total de granos de polen.
- Raro: entre el 3 y el 15% del total de granos de polen.
- Esporádico: menos del 3% del total de granos de polen.

b) Completo: la cantidad de granos de polen y elementos de mielada que deberán contarse dependerán del grado de exactitud que se requiera. El análisis implica la determinación de todos los elementos vegetales.

En este caso se utilizan los siguientes términos para expresar los resultados:

- Polen predominante: más del 45% de los granos de polen contados.
- Polen secundario: entre el 16 y el 45% de los granos de polen contados.
- Polen minoritario importante: entre el 3 y el 15% de los granos de polen contados.
- Polen minoritario: menos del 3% de los granos de polen contados.

El estudio del origen botánico permite clasificar el producto como monofloral o multifloral, esto se realiza sobre la base de la frecuencia de los pólenes y elementos de mielada que contenga la muestra.

Elementos vegetales indicadores de mielada son: hifas y esporas de hongos, en particular fumaginas, algas y elementos céreos provenientes de insectos productores de mielada.

Existen casos en los cuales los granos de polen de algunas flores están sobre representados, esto quiere decir que el porcentaje de polen en el sedimento es mayor que el porcentaje correspondiente en el néctar. También ocurre la situación inversa. Ejemplos de estos casos son la miel de *Citrus, Salvia (europea), Robinia, Tilia y Medicago.*

Algunas mieles florales poseen propiedades físico-químicas específicas que pueden ayudar a confirmar los resultados del análisis microscópico, por ejemplo la miel de brezo *(Calluna)* en lo referente al contenido de proteínas y la tixotropía, las mieles de acacia *(Robinia)* y de tupelo *(Nyssa)* que poseen un contenido muy alto de fructosa y la miel de *Citrus* en cuanto a la presencia de antranilato de metilo.

En la República Argentina, la Resolución 1051/94 modificada por la Resolución 274/95, de la ex Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, establece un sistema de clasificación de la miel sobre la base de su origen botánico, su aplicación es optativa.
De acuerdo con la citada Resolución una miel puede ser considerada monofloral sólo si posee como mínimo el 45% de polen de la misma familia, género o especie floral.
Se exceptúan la miel de citrus *(Citrus sp.)*, en cuyo caso se permite un contenido de 10 a 20% de granos de polen de citrus, la miel de Eucaliptos *(Eucalyptus sp.)* que no puede contener menos del 70% de granos de polen de esa especie y la miel de tréboles *(Trifolium sp.)* con un mínimo de 45% de pólenes de melilotus, alfalfa *(Medicago sativa)* y lotus. La miel de alfalfa *(Medicago sativa)* deberá contener como mínimo 20% de granos de polen de dicha especie.

La Resolución 111/96 de la ex Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, establece los lineamientos para la habilitación, inscripción y funcionamiento de los laboratorios certificadores del origen botánico de la miel.

Análisis Cuantitativo

La cuantificación de los granos de polen involucra diferentes determinaciones:

a) Determinación de la cantidad de sedimento.

Se mide el sedimento en tubos de centrífuga graduados luego de centrifugar 10 gramos de muestra disuelta en 20 ml de agua caliente.
Si la miel fue extraída por centrifugación posee entre 0,0015 y 0,0035 ml de materia insoluble. Un sedimento que supere los 0,01 ml indica que se trata de miel prensada con material que usualmente no está presente en el producto (polvo, levaduras, sustituyentes de polen, etcétera)

Si el sedimento es pobre puede indicar que se trata de miel que naturalmente posee escasa cantidad de granos de polen (miel de cítricos), que proviene de abejas alimentadas artificialmente, que fue excesivamente filtrada o que está adulterada.

b) Determinación del número absoluto de elementos de plantas.

Se calcula el número de elementos contados contenidos en un volumen perfectamente medido de sedimento que previamente fue concentrado y resuspendido en un volumen conocido de agua.
Existen diferentes métodos para llevar a cabo el recuento. En el método de Maurízio se cuentan granos de polen, esporas de hongos y células de algas y se toman los datos separadamente. De acuerdo con la cantidad de constituyentes de plantas encontrada la muestra se clasifica en diferente grupos.

Tabla N° 17: Clasificación de Maurízio

GRUPOS	Número de constituyentes por 10 gramos de miel	Origen de la miel
I	$<$ 20.000	Mieles florales pobres en polen
II	20.000 - 100.000	Mieles florales y mezclas con mielada
III	100.000 - 500.000	Mieles florales ricas en polen
IV	500.000 - 1.000.000	Mieles florales muy ricas en polen y algunas prensadas
V	$>$ 1.000.000	Mieles prensadas ricas en polen

Los recuentos generalmente se expresan con las unidades de mil.
Por ejemplo si se encontraron 32.000 granos de polen, 38.000 esporas fúngicas y 700 células de algas el resultado será: 32/38/0.7 - II y la miel es una mezcla de miel floral y miel de mielada mientras que, una miel floral puede dar 28/1/0 - II.

El otro método aplicable, de Demianowicz, difiere del anterior en el procedimiento de preparación de los “slides” y conteo.

Por último, el método de Louveaux que cuenta los elementos retenidos luego de filtrar una cantidad conocida de sedimento suspendido en agua a través de un filtro de superficie conocida y tamaño de poro menor que el diámetro de las partículas que se desean contar.
El número de elementos microscópicos contenidos en una dada masa de muestra se calcula con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{F \times n}{f \times a}$$

F superficie del filtro, en mm^2.

n número de elementos contados.

f superficie del campo, en mm^2.

a número de campos contados.

Con el dato obtenido se clasifica la miel de acuerdo con la clasificación de Mauricio (Louveaux. 1978)

La melisopalinología es el principal procedimiento para determinar el origen de la miel, se complementa con otros métodos.
Gracias a esta metodología fue posible reconstruir en parte la vegetación existente en Egipto en la época de los faraones ya que estos eran enterrados con vasijas conteniendo miel.

Además de los métodos descriptos, cuyos resultados son concluyentes con respecto al origen de la miel, el analista cuenta con una serie de determinaciones físico-químicas que permiten diferenciar la miel de flores de la miel de mielada y en algunos casos el origen botánico. Un ejemplo de esto es la determinación de antranilato de metilo, la caracterización de flavonoides y proteínas característicos de miel de determinado origen.

Diferenciación de Miel de Mielada y Miel de Flores

La presencia de miel de mielada en miel de flores no es una adulteración pero su existencia debe ser declarada perfectamente en el rótulo del producto.
Algunos de los métodos que se aplican en los análisis de rutina permiten establecer diferencias entre ambos tipos de miel u orientar sobre su origen.
Si la miel es miel de mielada o mezcla con miel de flores pueden encontrarse valores diferentes, de los parámetros que se enumeran a continuación, con respecto a los esperados para miel de flores.

- **Observación microscópica**: debido a que su origen no es floral es muy pobre en granos de polen. Posee elementos característicos que consisten en: hifas y esporas de hongos, algas y elementos cerosos de insectos productores de mielada.
La observación de materia granulada y microcristalina generalmente es indicativo de miel de mielada pero también puede encontrarse en algunas mieles florales (Louveaux, 1978)
También pueden observarse tejidos vegetales y fibras de celulosa.
- **Actividad antimicrobiana**: la miel de mielada posee mayor actividad antimicrobiana que la miel floral, en parte debido a la alta concentración de azúcares superiores, a la presencia de ciertos ácidos orgánicos y a una mayor concentración de inhibina.
- **Índice de refracción**: alcanza valores mayores que los correspondientes para miel de flores.

- **Contenido de azúcares**: puede presentar una distribución anormal de los hidratos de carbono. En general contiene más de 5% de melezitosa y menos de 8% de sacarosa (FAO, 1986)
- **Cromatografía en capa fina**: la miel de mielada presenta manchas o bandas que se extienden desde el origen. Debe confirmarse que la miel no esté adulterada.
- **Composición cualitativa y cuantitativa de aminoácidos**: posee algunos aminoácidos que no están presentes en la miel floral, la concentración de prolina es mayor que en miel floral.
- **Rotación específica**: son dextrorrotatorias.
- **Mutarrotación**: la polarización constante directa presenta valores más positivos que - 2ºS (FAO, 1986)
- **pH y relación lactona / acidez libre**: el pH de la miel de mielada es mayor que en el caso de mieles florales mientras que la relación lactona / acidez libre presenta valores bajos.
- **Cenizas**: presenta valores más altos que la miel de flores.
- **Conductividad eléctrica**: la miel de mielada posee mayor cantidad de minerales y como consecuencia la conductividad eléctrica es mayor.
- **Ácido Úrico**: este ácido es el principal producto del metabolismo de los insectos y probablemente la única sustancia proveniente de los insectos que se encuentra en la miel de mielada en cantidades detectables (Cowan, 1964)

Además de analizar los valores de los parámetros anteriormente expuestos es posible identificar la miel de mielada aplicando una ecuación lineal desarrollada por Kirkwood, Mitchell y Smith.

$$X = - 8,3\ pH - 12,6\ cenizas + 1,4\ ARD$$

Si X es menor de 73,1 la miel es de mielada, si le valor es mayor de 73,1 la miel es de flores (Cowan, 1964)

Diferenciación de Distintos Tipos de Miel de Flores

En algunos casos la diferenciación de la miel monofloral de acuerdo con su origen es relativamente fácil si poseen características físico-químicas bien diferenciadas, pero en la mayor parte de las ocasiones el analista se enfrenta a una difícil decisión si solamente cuenta con un análisis físico-químico para determinar el origen floral.

En un trabajo realizado sobre mieles de diferentes orígenes (Persano Oddo, 1988) se enumeran una serie de propiedades físico-químicas que ayudan a diferenciar mieles de distintos orígenes. Teniendo en cuenta estos parámetros, juntamente con el análisis melisopalinológico, el origen botánico puede determinarse con gran precisión.

Miel de castaño y de mielada: estas mieles pueden diferenciarse de otras mieles por:

- Color: muy oscuro.
- Cristalización: la miel de castaño es típicamente una miel líquida, la miel de mielada en menor grado.
- Conductividad eléctrica: es muy alta.
- pH: es alto.
- Rotación específica: es positiva para la mielada y negativa para la miel de castaño.
- Composición de azúcares: es diferente entre ambas.

- Contenido de azúcares: la miel de castaño posee alto contenido de fructosa y glucosa, presenta un valor bajo de la relación glucosa / a_w y alto de la relación fructosa / glucosa. La miel de mielada posee bajo contenido de fructosa y glucosa.

Miel de *Erica y Arbutus*: Se las puede diferenciar de otras mieles por:

- Color: estas mieles no son tan oscuras como las anteriores y poseen tonalidad naranja. La miel de *Arbutus* es ámbar-gris.
- Conductividad eléctrica: los valores están comprendidos entre 5 y 9 x 10^{-4} S/cm.
- Acidez: es alta.
- Actividad diastásica: poseen baja actividad diastásica.
- Contenido de HMF: es anormalmente alto en la miel de *Arbutus*.

Miel de Eucaliptos

- Color: es ámbar con matices verde-grisáceos.
- Fenómeno de filancia.

Miel de *Thymus*

- Color: de ámbar claro a ámbar.
- Acidez: es muy variable pero siempre se mantiene alta.
- Actividad diastásica. es alta.
- Rotación específica: presenta valores muy negativos.
- Conductividad eléctrica: los valores están comprendidos entre 3 y 4,5 x 10^{-4} S/cm.
- Contenido de azúcares: posee alto contenido de fructosa.

Miel de *Taraxacum*

- Color: amarillo claro con tonos grisáceos.
- Acidez: es baja.
- Actividad diastásica: es baja.
- Conductividad eléctrica: los valores están comprendidos entre 4,5 y 6 x 10^{-4} S/cm.
- Contenido de azúcares: posee alto contenido de glucosa y de azúcares reductores, presenta un valor muy alto de la relación glucosa / a_w y muy bajo de la relación fructosa / glucosa.

Miel de *Helianthus*

- Color: es muy característico, amarillo brillante o amarillo huevo.
- Conductividad eléctrica: los valores están comprendidos entre 3 y 4,5 x 10^{-4} S/cm.
- Rotación específica: presenta valores ligeramente negativos.
- Contenido de azúcares: posee alto contenido de glucosa y de azúcares reductores, presenta un valor muy alto de la relación glucosa / a_w y muy bajo de la relación fructosa / glucosa.

Miel de *Robinia*

- Color: claro.
- Conductividad eléctrica: es muy baja.
- Cristalización: nunca cristaliza.
- Actividad diastásica: es muy baja.
- Composición de azúcares: posee alto contenido de fructosa acompañado por un bajo porcentaje de glucosa, como consecuencia presenta un valor muy bajo de la relación glucosa / a_w y muy alto de la relación fructosa / glucosa.

Miel de *Hedysarum*

- Color: claro.
- Conductividad eléctrica: es muy baja.
- pH: es muy bajo.
- Acidez: es alta comparada con la de otras mieles claras.
- Actividad diastásica: es mayor que la de otras mieles claras.

Miel de *Citrus*

- Color: claro.
- Conductividad eléctrica: es muy baja.
- Actividad diastásica: tiende a ser baja.
- Contenido de antranilato de metilo: es característico de esta miel.

Miel de rododendro

- Color: claro.
- Conductividad eléctrica: es muy baja comparada con las mieles anteriores.
- Rotación específica: presenta valores negativos más bajos que otras mieles claras.

Antranilato de Metilo

El antranilato de metilo (AM) es una sustancia aromática presente en frutos tales como los cítricos. La determinación de este componente permite dictaminar la monofloralidad de la miel de cítricos *(Citrus sp.)*

La máxima secreción nectarífera del naranjo no coincide con la maduración de la antera de modo que las mieles obtenidas a partir de este fruto no contienen suficiente cantidad de polen de esa especie como para ser consideradas monoflorales de acuerdo con los parámetros normales de contenido de polen de una miel.

Debe tenerse en cuenta que este éster no es exclusivo de la miel de *(Citrus sp.)*, también se ha encontrado en miel de lavanda *(Lavándula sp.)*

Este compuesto es suficientemente selectivo como para que, con una sola determinación sea posible dictaminar la monofloralidad de la miel de cítricos, mieles con contenidos de antranilato de metilo de 0,5 miligramos por kilogramo pueden caracterizarse como mieles monoflorales. En mieles de cítricos se han encontrado valores comprendidos entre 0,57 y 4,22 mg/kg, el valor más bajo corresponde a una miel almacenada durante 1 año (Serra Bjonvehi, 1988)

El contenido de agua, el grado de frescura, la mayor o menor monofloralidad, las condiciones de conservación, entre otras, influyen en el contenido de antranilato de metilo de la miel (White et.al., 1964)

La identificación de este compuesto puede realizarse por Cromatografía en Capa Fina o Cromatografía Gas-Líquido y su cuantificación por Espectrofotometría (White, 1965) o Cromatografía Gas-Líquido.

Espectrofotometría Visible

La determinación espectrofotométrica se basa en la medición de la absorbancia a 495 nm del compuesto coloreado formado por diazotación y posterior copulación del antranilato de metilo con 1-hidroxi-2-naftalen-2-sulfonato de sodio.
Este método es aplicable para muestras con contenidos de AM menores de 500 miligramos/l (Manuel Suisse, 1978)

Para llevar a cabo el ensayo debe pesarse una cantidad de miel que contenga entre 0,5 y 5 miligramos del éster, el cual se extrae de la muestra por destilación por arrastre con vapor recogiéndose aproximadamente 100 ml.
Se agregan al destilado 25 ml de HCl 1 N y 2 ml de solución de $NaNO_2$ 2%. Se deja en reposo exactamente 2 minutos y a continuación se agregan 6 ml solución de sulfato de hidrazina 3% ($N_2H_4.H_2SO_4$) para destruir el exceso de nitrito. Al cabo de 1 minuto se agrega rápidamente 5 ml de solución de 1-hidroxi-2-naftalen-2-sulfonato de sodio (2,4 gramos en 100 ml de agua hirviente y carbón, luego de agitar se filtra) e inmediatamente 15 ml de solución de Na_2CO_3 25% y se lleva a 500 ml.
Se lee la absorbancia a 495 nm del compuesto rojo anaranjado formado.

Se prepara una curva de calibración en las mismas condiciones que la muestra partiendo de una solución estándar de AM de 1mg/ml. La solución madre se prepara disolviendo 250 miligramos de AM en 60 ml de etanol 96º y posterior enrasado a 250 ml con agua destilada.

Por extrapolación se calcula la concentración de antranilato de metilo en miligramos / kilogramo de miel teniendo en cuenta la concentración inicial de la solución de muestra. La fórmula que se utiliza es la siguiente:

$$\text{Antranilato de Metilo} = \frac{m_{AM} \times 1000}{m_m}$$

m_{AM} masa de AM calculada por extrapolación, en miligramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

El A.O.A.C. propone este método para la determinación de antranilato de metilo en bebidas sin alcohol con la diferencia que se recogen 300 ml del destilado en lugar de 100 ml (A.O.A.C. 950.25, 1995)

Cromatografía Gas-Líquido

La determinación se lleva a cabo utilizando eicosano como patrón interno. Se prepara disolviendo 50 miligramos de eicosano en 250 ml de diclorometano, se toman 30 ml de esta solución y se llevan a 50 ml.

El AM se extrae de una masa apropiada de miel (con agregado de 1,7 ml de la solución de eicosano) con diclorometano. Se realizan 5 extracciones y se evaporan los extractos a 30 ºC (86 ºF) La muestra así preparada se analiza por cromatografía.

Las condiciones recomendadas de trabajo son las siguientes (Serra Bjonvehi, 1988):

- Columna: se utiliza una columna rellena con Chromosorb G con 1,5% de SP-1000.

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: la temperatura es de 260 º C (500 ºF)

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 20 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 250 °C (482 °F) La temperatura inicial de la columna es de 180 °C (356 °F), luego se aplica una rampa de 6 °C/min. (42,8 °F/min.) hasta los 220 °C (428 °F)
  c) La concentración del AM se calcula utilizando el método del patrón interno sobre la base del factor de respuesta obtenido utilizando una solución patrón de AM preparado de igual forma que la descripta anteriormente.
  d) El volumen de inyección es de 3 a 3,5 μl.

En estas condiciones de trabajo los tiempos de retención relativos (AM / eicosano) encontrados oscilaron entre 1,53 y 1,60 minutos.

Los resultados se expresan en miligramos de AM por 1000 gramos de miel.

Los contenidos de AM encontrados fueron inferiores a los obtenidos aplicando el método espectrofotométrico.

La exactitud en el método espectrofotométrico fue de 94,10% mientras que en la Cromatografía Gas-Líquido fue de 98,30%.

- HUMEDAD

El contenido acuoso de la miel es un parámetro cuya determinación es importante porque de él depende notablemente su conservabilidad.

Los métodos de análisis (White, 1969) se dividen en:

- Directos

Existen tres posibles métodos:

- Secado en estufa de vacío (no más de 50 mm, a 70 °C (158 °F) o menos) con arena hasta peso constante dentro de 2 mg (A.O.A.C. 969.38A, 1995)

- Arrastre con tolueno recogiendo en trampa de Dean Stark.

- Karl Fisher.

El primer método no es recomendable debido a que los datos obtenidos no son muy confiables porque la fructosa puede descomponerse parcialmente, aún a 70 °C (158 °F), Se cuestiona si el agua se elimina totalmente a la temperatura de trabajo.
El método de Karl Fisher conduce a valores mayores del contenido de agua que aquellos obtenidos aplicando el método refractométrico tradicional.

- Indirectos

Medición del índice de refracción y cálculo del contenido de agua sobre la base de la tabla de Chataway (1932) completada por Wedmore (1955) Chataway calibró una serie de determinaciones refractométricas a 25 °C (77 °F) con un refractómetro Abbé con ensayos en estufa de vacío para 60 mieles y calculó un factor de corrección por temperatura. Wedmore, sobre la base de los datos obtenidos por Chataway y otros investigadores, dio la mejor relación entre el contenido de agua y el índice de refracción y elaboró una tabla donde relacionó el índice de refracción, a 20 °C (68 °F), con porcentajes de agua desde 13,0 hasta 22,0 g%.

El método consiste en medir el índice de refracción de la muestra con la ayuda de un refractómetro Abbé (A.O.A.C. 969.38B, 1995)
Si la muestra es líquida y está perfectamente homogeneizada puede colocarse directamente una gota sobre el prisma del aparato, en caso de estar total o parcialmente cristalizada deben disolverse los cristales antes de efectuar la medición. Se calienta hasta 50 ºC (122 °F) una porción en un pequeño recipiente cerrado y luego se homogeneiza varias veces por inversión antes de tomar la muestra.
La medición debe realizarse a 20 ºC (68 °F), en caso contrario será necesario aplicar una corrección por temperatura antes de utilizar la tabla. Si el índice de refracción se mide a temperaturas por debajo de 20 °C (68 °F) debe restarse 0,00023/°C al valor hallado; si la temperatura es superior a 20 °C (68 °F) se suma 0,00023/°C al índice de refracción medido.
Con ayuda de la tabla se calcula el contenido de agua de la muestra. Los resultados se expresan en gramos / 100 gramos de miel.

Es un método sencillo y reproducible, sólo requiere unos minutos, puede realizarse con pequeña cantidad de muestra y no es necesario un operador experimentado. En muchos casos es el apicultor quien realiza este análisis utilizando un refractómetro manual cuando necesita saber si la miel está madura como para ser cosechada.
El análisis llevado a cabo con otro refractómetro distinto del Abbé sólo puede practicarse como método orientativo porque la tabla, que necesariamente debe utilizarse para calcular el valor del contenido de agua, fue construida sobre la base de mediciones realizadas con ese instrumento.

Este método ha sido adoptado internacionalmente para la determinación de la humedad de la miel a pesar que no conduce al verdadero contenido de agua de la muestra. Su aplicación no ofrece dificultades y se utiliza satisfactoriamente desde hace mucho tiempo (Bogdanov, 1997)

De acuerdo con la legislación MERCOSUR la humedad debe ser menor o igual a 20 gramos / 100 gramos de miel, otras legislaciones permiten límites mayores.

La normativa del Codex establecía un límite de 21g/100g y exceptuaba a la miel de trébol. En la última revisión de esta norma fueron tomados en cuenta datos obtenidos en controles de rutina realizados sobre 30.000 mieles, entre los años 1989-1997, por la Comisión Internacional de la Miel (IHC) En el 91-95% de las muestras el contenido de agua fue inferior a 20g/100g de miel y no se encontró razón que justificara exceptuar a la miel de trébol.
El límite propuesto fue fijado en 20g/100g para todas las mieles con excepción de las de brezo para las cuales se mantuvo un límite de 23g/100g.

- **HIDRATOS DE CARBONO**

Su determinación es importante para comprobar la genuinidad de la miel. El analista cuenta con diversidad de métodos con diferente grado de complejidad y sensibilidad para conocer el contenido de hidratos de carbono en el producto. A continuación se detallan en forma somera los fundamentos de cada uno de ellos prestando especial atención a aquellos adoptados internacionalmente.
Es posible diferenciar miel de flores de miel de mielada sobre la base de los contenidos de glúcidos.

- **Sólidos Solubles**

La determinación de los sólidos solubles es un método rápido que únicamente es útil como análisis comparativo, no brinda información sobre el porcentaje de azúcares. Se obtienen valores del contenido de sólidos solubles los cuales en la miel son prácticamente en su totalidad hidratos de carbono.
Las mediciones pueden llevarse a cabo por refractometría o densitometría (Hart, 1977)

Refractometría

El ensayo se realiza siguiendo el mismo procedimiento que para la determinación indirecta del contenido de humedad, a 20 ºC (68 °F) utilizando un refractómetro Abbé o similar. Con ayuda de tablas puede calcularse el contenido de sacarosa de la muestra pero, como existen diferentes modelos de refractómetros, es importante tener en cuenta que las mediciones deben llevarse a cabo utilizando el mismo instrumento con el cual fueron construidas las tablas.
Siguiendo este procedimiento puede conocerse la cantidad total de sólidos solubles de la miel y el contenido de sacarosa. En el caso particular de la miel para conocer el porcentaje de sacarosa (aparente) al total de sólidos solubles debe restarse el porcentaje de azúcares reductores directos ya que el disacárido representa un pequeño porcentaje del total de sólidos solubles. La diferencia obtenida se multiplica por 0,95 para expresar el resultado en sacarosa.
Debe tenerse en cuenta que la miel posee otros sólidos solubles además de los azúcares solubles como por ejemplo ácidos. Para obtener el valor real de sólidos solubles cuando se utiliza un refractómetro es necesario corregir la lectura por acidez (Lindsay, 1993)
Los resultados se expresan en º Brix o % de sólidos solubles / 100 gramos de miel.

Densitometría

Se emplea un densitómetro graduado en décimas de º Brix y calibrado con soluciones patrón de sacarosa. Estos instrumentos están diseñados para un rango limitado de medición (de 0º a 6º, de 6º a 12º hasta 66º a 72º)
En el caso particular de la miel, dada su alta viscosidad, debe prepararse una solución de concentración tal que la cantidad de sólidos solubles esté comprendida en alguno de los rangos anteriormente expuestos, por ejemplo mezclar partes iguales de miel y agua.
Cualquiera sea la dilución practicada debe tenerse en cuenta para calcular la concentración real de sólidos solubles, si es al medio la lectura debe multiplicarse por 2.

Se transfiere la solución a una probeta de vidrio suficientemente ancha como para permitir que el instrumento flote sin tocar las paredes, evitando que queden atrapadas burbujas de aire y se realiza la medición.
La temperatura de medición debe ser 20 °C (68 °F) o aquella a la cual fue calibrado el densímetro. Si la temperatura difiere en más de 1º con respecto a la temperatura de calibración del instrumento es necesario corregir el valor medido utilizando una tabla de corrección (A.O.A.C. 43.005, 1965) Si la temperatura es inferior a 20 °C (68 °F) la corrección se resta y se suma si es más alta. Estas correcciones oscilan entre 0,04 a 0,09 º Brix / º C según la cantidad de azúcar presente en la muestra.
Los resultados se expresan en gramos de sacarosa / 100 gramos de miel.
Para un control de rutina puede obtenerse un valor razonablemente aproximado del contenido de sólidos solubles de la miel.

- **AZÚCARES TOTALES**

Cromatografía en Columna (A.O.A.C. 954.11, 1995)

La muestra se pasa a través de una columna de carbón y celite (1:1) Los monosacáridos, disacáridos y azúcares superiores presentes en la miel se eluyen progresivamente con concentraciones de alcohol cada vez mayores obteniéndose tres fracciones:

Fracción I: contiene la glucosa y la fructosa.
Fracción II: contiene la sacarosa y los disacáridos reductores.
Fracción III: contiene los azúcares superiores.

La glucosa y la fructosa se determinan individualmente en la fracción I utilizando el método de Shaffer-Somogyi (A.O.A.C. 959.11, 1995)
Los disacáridos reductores y la sacarosa se cuantifican en la fracción II por titulación iodométrica. Los primeros se determinan titulando directamente la porción eluida (se expresan en maltosa) y la sacarosa después de hidrolizar una porción de esta fracción con HCl 6N a 60 °C (140 °F).
En la fracción III se determinan los azúcares superiores, previa hidrólisis ácida con HCl concentrado a 100 °C (212 °F), por el método de Shaffer-Somogyi y los resultados se expresan como glucosa.

La separación en columna permite eliminar la interferencia de los disacáridos en la determinación de glucosa y fructosa.

Si lo que interesa en primer lugar es conocer el contenido de sacarosa se recomienda separar los azúcares a través de la columna y determinar la glucosa en la fracción II con glucosa-oxidasa antes y después de una hidrólisis con invertasa (A.O.A.C. 979.21, 1995) Los porcentajes de monosacáridos, otros disacáridos y azúcares superiores se analizan pesando los residuos obtenidos luego de evaporar una porción de cada una de las fracciones eluidas. Esta alternativa permite conocer el porcentaje exacto de sacarosa.

La Cromatografía en Columna no es muy recomendable porque, alrededor del 2,5% del material que pasa a través de la columna no se analiza, si bien la determinación de los monosacáridos no presenta diferencias significativas con otros métodos químicos en la fracción II quedan azúcares que no se cuantifican debido a que poseen muy bajo poder reductor, como por ejemplo, maltosa e isomaltosa o directamente no son reductores como la trehalosa; es la fracción que posee mayor cantidad de carbohidratos no analizados. En un estudio realizado para comprobar la exactitud del método se encontró 0,40% del material no analizado en la fracción de monosacáridos y un estudio polarimétrico demostró que el principal constituyente era glucosa.
En el análisis de la tercera fracción se comete un error sistemático debido a una hidrólisis incompleta de los azúcares superiores o destrucción de fructosa durante la hidrólisis ácida (White, 1960)

Este método fue adoptado en 1977 por la A.O.A.C. (*Official Association Agricultural Chemists*) como método oficial para la separación de azúcares en la miel.

Oxidación con sales cúpricas en medio alcalino (Montes, 1981)

Existen distintos métodos basados en la oxidación con sales cúpricas en medio alcalino.
En todos los casos, debido a que la reacción de óxido-reducción no es estequeométrica deben respetarse estrictamente las condiciones de trabajo para que los datos obtenidos sean reproducibles y confiables.
Los resultados se expresan en gramos de azúcar invertido / 100 gramos de miel y gramos de sacarosa aparente / 100 gramos de miel.

Método de Fehling – Causse – Bonnans

Se prepara una solución que contenga aproximadamente 1 gramo de miel en 100 ml de agua, se agrega solución de acetato básico de plomo, se lleva a volumen y se filtra, obteniéndose una “Solución Concentrada” de azúcares en la cual, después de diluirla al medio, se valorarán los azúcares reductores directos (solución A)
Se toma una alícuota de la solución concentrada y se invierte con HCl 6 N durante 15 minutos a 67 °C ± 2 °C (152,6 °F ± 2 °F) Se neutraliza al tornasol con NaOH 6 N obteniéndose una solución donde serán valorados los azúcares reductores directos y los productos de la inversión ácida (solución B)
El contenido de sacarosa aparente se obtiene por diferencia entre los valores obtenidos en ambas titulaciones.

Antes de comenzar la determinación debe valorarse el reactivo frente a una solución patrón de azúcar invertido de 5 gramos / litro debiéndose gastar exactamente 8,2 ml de dicha solución, esto equivale a que el factor del reactivo sea igual a 4,1. De no ser así deberá

modificarse el reactivo agregando agua o sulfato cúprico según sea necesario hasta alcanzar el volumen requerido.

Del mismo modo debe realizarse la titulación preliminar de la muestra con el objeto de conocer el volumen aproximado de solución de azúcar que se requerirá.

La cuantificación de los azúcares reductores directos antes y después de la inversión ácida se realiza titulando, en caliente, 15,0 ml del reactivo de Fehling-Causse-Bonnans con las soluciones de azúcar preparadas como se explicó anteriormente. Se agrega en frío desde una bureta de Fehling el volumen de solución de azúcar hallado en la titulación preliminar menos 1 ml. Se calienta manteniendo 2 minutos exactos la ebullición, se agregan unas gotas de la solución de azul de metileno y cuidando de mantener una franca ebullición se completa la titulación; en las cercanías del punto final la solución adquiere una coloración verdosa débil hasta que desaparece todo tinte azul y la solución es color amarillo (punto final)
El volumen utilizado debe estar comprendido entre 8 y 11 ml, en caso contrario deberá modificarse la concentración de la solución de azúcares.

Se trabaja en un medio básico suave (Na_2CO_3, Na_2HCO_3 o mezcla de ambos) para evitar que la sacarosa, si el medio es fuertemente alcalino pueda sufrir un reordenamiento parcial y convertirse en reductora.
El reactivo de Fehling-Causse-Bonnans contiene $C_4H_4NaKO_6.4H_2O$ que mantiene el Cu^{++} en solución evitando que precipite el hidróxido cúprico debido al medio alcalino y $Fe(CN)_6K_4$ (ferrocianuro de potasio) que impide que precipite el Cu_2O por formación de $Fe(CN)_6Cu_4$ (ferrocianuro cuproso) amarillo. Se utiliza azul de metileno como indicador que es reducido a su forma incolora, obteniéndose un punto final neto.

El contenido de sacarosa se informa como sacarosa aparente ya que no representa el contenido real de este disacárido en la muestra. Algunos azúcares, que forman parte de la composición normal de la miel, interfieren porque son hidrolizados juntamente con la sacarosa como por ejemplo la melezitosa que genera glucosa y turanosa o la erlosa que se hidroliza en maltosa y fructosa cuando son sometidos a una hidrólisis suave (White, 1977)

Los cálculos se realizan empleando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ ARD} = \frac{4{,}1 \times 200}{m \times V_1}$$

$$\% \text{ ARPI} = \frac{4{,}1 \times 200}{m \times V_2}$$

$$\% \text{ Sacarosa aparente} = (\%\text{ARPI} - \%\text{ARD}) \times 0{,}95$$

ARD azúcares reductores directos, en gramos de azúcar invertido / 100 gramos.

ARPI azúcares reductores previa inversión, en gramos de azúcar invertido / 100 gramos.

4,1 factor del reactivo.

200 factor de dilución.

m masa de muestra, en gramos.

V_1 volumen de solución A empleado para la valoración de los azúcares reductores directos, en ml.

V_2 volumen de solución B empleado para la valoración de los azúcares reductores luego de la inversión ácida, en ml.

0,95 factor de conversión de azúcar invertido a sacarosa.

Método de Lane – Eynon (A.O.A.C. 920.183b, 1995)

Consiste en una titulación del reactivo de Fehling modificado por Soxhlet, en el punto de ebullición, con la solución de miel tal cual y luego de su hidrólisis utilizando azul de metileno como indicador. El contenido de sacarosa aparente se calcula multiplicando por 0,95 la diferencia entre la concentración de azúcares reductores después de la inversión y la concentración de azúcares reductores directos.

El reactivo se prepara mezclando, en el momento de usar, partes iguales de la solución de Fehling A (solución acuosa de $CuSO_4$) y solución de Fehling B (NaOH y $C_4H_4NaKO_6.4H_2O$)

La preparación de la muestra difiere de acuerdo con las características del producto:

a) Si contiene sedimento se pesan aproximadamente 25 gramos de miel homogeneizada y se llevan a 100 ml (solución concentrada I), 10,00 ml de esta solución se diluyen a 500 ml (solución diluida I para la determinación de ARD)
Para la cuantificación del contenido de sacarosa se toman 10,00 ml de la solución concentrada I y luego de la hidrólisis se diluyen a 250 ml.

b) Si la miel no posee sedimento se pesan alrededor de 2 gramos de miel homogeneizada y se llevan a 100 ml (solución concentrada II), 50,00 ml de esta solución se diluyen a 100 ml (solución diluida II para el análisis de los ARD)
Para la determinación del contenido de sacarosa se utiliza directamente la solución concentrada II.

Se toma una alícuota de 50,00 ml de la solución preparada para la determinación de sacarosa correspondiente y se calienta a 65 °C (149 °F), se remueve del baño, se agregan 10 ml de HCl 6,34 N y se deja enfriar espontáneamente durante 15 minutos. A continuación se lleva a 20 °C (68 °F) y se neutraliza al tornasol con NaOH 6 N obteniéndose una solución donde serán valorados los azúcares reductores directos y los productos de la inversión ácida.

Antes de comenzar la determinación debe valorarse el reactivo frente a una solución patrón (2 g%) de azúcar invertido. 5 ml de solución A exactamente medidos con 5 ml de solución B deben reaccionar completamente con 25 ml de la solución de azúcar invertido.

Es esencial realizar una titulación preliminar de la solución en estudio para cada muestra en particular con el objeto de establecer, en cada caso, el volumen de agua indispensable para obtener un volumen final de reactantes de 35 ml.

Se agregan en un Erlenmeyer 5 ml de solución de Fehling A exactamente medidos y 5 ml de solución de Fehling B y la cantidad de agua destilada necesaria para que el volumen final de reactantes, al completar la titulación, sea de 35 ml restando a 25 ml el volumen hallado en la valoración del reactivo. Se agregan 1,5 ml menos del volumen de solución de muestra diluida I o II, de acuerdo con el método de preparación elegido, determinado en la titulación preliminar y se calienta a ebullición durante 2 minutos, luego de agregar unas gotas de la solución de azul de metileno se titula con la solución restante, manteniendo una franca ebullición, en un total de 3 minutos hasta que el indicador se decolore (punto final)
Se repite la titulación utilizando la solución diluida de muestra obtenida después de la inversión ácida.

Los cálculos se realizan empleando las siguientes fórmulas:

a) Si se utilizó el primer procedimiento

$$\% \text{ ARD} = \frac{25 \times 1000}{m \times V_1}$$

$$\% \text{ ARPI} = \frac{25 \times 1000}{m \times V_2}$$

b) Si se utilizó el segundo procedimiento

$$\% \text{ ARD} = \frac{2 \times 1000}{m \times V_1}$$

$$\% \text{ ARPI} = \frac{2 \times 1000}{m \times V_2}$$

$$\% \text{ Sacarosa aparente} = (\%\text{ARPI} - \%\text{ARD}) \times 0{,}95$$

ARD azúcares reductores directos, en gramos de azúcar invertido / 100 gramos.

ARPI azúcares reductores previa inversión, en gramos de azúcar invertido / 100 gramos.

m masa de muestra, en gramos.

V_1 volumen de solución diluida empleado para la valoración de los azúcares reductores directos, en ml.

V_2 volumen de solución empleado para la valoración de los azúcares reductores luego de la inversión ácida, en ml.

0,95 factor de conversión de azúcar invertido a sacarosa.

El Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de miel adopta este método para la determinación de los azúcares reductores y la sacarosa aparente.

El valor límite para el contenido de azúcares reductores aceptado en la legislación MERCOSUR para miel de flores es de 65 g% mientras que para la miel de mielada fue establecido en 60 g%. Con respecto al contenido de sacarosa aparente los valores límites corresponden a 6 y 15 g% respectivamente.

La Norma Codex sobre Miel anterior a la última revisión establecía límites de 65 g% de azúcares reductores directos para las mieles florales y 60 g% para la miel de mielada y sus mezclas con miel de flores, excepto la miel de *Xanthorrhoea preissii* para la cual aceptaba 53 g%. Con respecto al contenido aparente de sacarosa los valores límites eran 5, 10 y 15 g% dependiendo del tipo de miel.

Debe recordarse que el contenido de sacarosa es "aparente" porque este hidrato de carbono se determina por diferencia entre los azúcares reductores luego de la inversión y los azúcares reductores directos y por lo general ese valor es distinto del contenido real de sacarosa.

Método de Munson y Walter

A diferencia de los anteriores este es un método gravimétrico, se obtiene un precipitado de Cu_2O el cual se filtra a través de asbesto y se pesa.
El porcentaje de azúcar invertido se calcula sobre la base de tablas. El valor obtenido no es muy exacto, sólo es útil a los fines de comparación.

Este método, conjuntamente con el anterior es uno de los métodos incluidos en la metodología oficial de la A.O.A.C para la determinación de azúcares reductores en miel (A.O.A.C. 920.183a, 1995)

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Mediante este método es posible separar y cuantificar los principales azúcares contenidos en la miel. La cantidad y calidad de los glúcidos eluidos dependerá de las características de la columna utilizada, del tipo de detector empleado y de las condiciones de trabajo.

Con detector de Índice de Refracción

Se prepara una solución acuosa que posea un contenido individual de azúcar entre 0,5 y 5 g% y se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 a 0,45 μ de diámetro de poro.

La cromatografía se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Columna: la fase estacionaria es una base o soporte de sílice modificado químicamente, el grupo adicionado es el que interactúa con el soluto. Los sustituyentes pueden ser desde grupos metilo hasta C_{18}, grupos amino o nitrilos. En el caso particular de carbohidratos el sustituyente es un grupo amino o C_{18}, en esta columna la separación se realiza sobre la base de la partición polar / no polar. La columna tiene mayor afinidad por los compuestos no

polares de manera que estos son los últimos que salen de la columna. Los métodos que utilizan este tipo de columna se denominan "Cromatografía de Fase Reversa".

- Solvente: las mezclas de solventes de elución más utilizadas son mezclas de agua con acetonitrilo o con metanol.

- Detector: en Cromatografía Líquida es posible utilizar diferentes tipos de detectores que midan alguna propiedad de la sustancia analizada, proporcional a su concentración. En el caso particular de los azúcares el más comúnmente utilizado es el detector de índice de refracción que mide cambios en una propiedad física de soluto y solvente. Es muy sensible a cambios de temperatura, la sensibilidad a la muestra es de 10^{-7} g/l.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra. En caso de no disponer de un integrador se pueden comparar las alturas o las áreas de los picos de las muestras con las alturas o las áreas de los picos de los patrones y calcular la concentración del compuesto de interés con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Compuesto} = \frac{C_P \times A_M \times f}{A_P \times m_m}$$

C_P concentración del estándar, en gramos por 100 gramos de miel.

A_M altura o área del pico correspondiente a la muestra.

A_P altura o área del pico correspondiente al estándar.

m_m masa de muestra, en gramos.

f factor de dilución correspondiente.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con flujos que oscilan entre 0,3 y 3 ml/min. Los valores recomendados que aseguran una buena separación de los componentes de la muestra en un tiempo relativamente corto (15-20 minutos) son 1-2 ml/min.
  b) La temperatura óptima de trabajo varía entre 25 y 30 °C (77 y 86 °F)
  c) En general se trabaja con patrones externos (soluciones patrón de cada uno de los azúcares), el aparato mide las alturas o las áreas de los picos correspondientes a cada uno de los constituyentes de la muestra referidas al valor correspondiente del patrón. Los picos se identifican sobre la base de sus tiempos de retención.
  d) Los volúmenes de inyección son variables, en general se trabaja con 10 μl.

Los resultados se expresan en gramos de cada azúcar por 100 gramos de miel.

En el caso particular de la miel, los componentes son eluidos de la columna en el siguiente orden, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y así sucesivamente.

Este método presenta una serie de ventajas frente a otros métodos tradicionales.

- La muestra no requiere pretratamiento.
- Es posible recuperar los componentes de la muestra con sólo evaporar el solvente.
- Es un método sensible, se pueden detectar hasta 50μg de cada azúcar usando el detector de índice de refracción, es posible determinar cantidades menores inyectando volúmenes mayores.

Entre las desventajas se pueden citar:

- Los reactivos deben ser de alta pureza (grado HPLC), lo que encarece el método.
- El manipuleo del acetonitrilo debe realizarse evitando el contacto con la piel y los ojos; es indispensable tomar los recaudos necesarios para no respirar los vapores. Puede producir irritación de la piel.
- Es más económico y más rápido que la Cromatografía Gas-Líquido pero es mucho menos preciso, 5% de error (Conrad, 1976)

Con la Cromatografía Líquida de Alta Resolución se separaron componentes de la miel tales como: fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa, maltosa, trehalosa, isomaltosa, erlosa, melezitosa y maltotriosa.

Si se establecen diferentes condiciones de trabajo es posible identificar y determinar el contenido de distintos sacáridos.
S.Thean y W.Funderburk, Jr. separaron y cuantificaron fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa a partir de 10 μl de una solución de miel de 10 g% preparada en acetonitrilo:agua (1:5). La determinación se llevó a cabo a 23 °C (73,4 °F) con una columna C_{18} y a una velocidad de flujo de 1ml/min. utilizando como solvente una mezcla de acetonitrilo / agua (83:17) (Thean, 1977)

La A.O.A.C. incluye entre los métodos oficiales para la separación de azúcares en miel este método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (A.O.A.C. 977.20, 1995)
El Codex Alimentarius actualmente acepta este método para la determinación del perfil de azúcares de la miel con el objeto de comprobar su genuinidad..

En este caso la muestra se prepara disolviendo 5,000 gramos de miel en 25 ml de agua y se lleva a 50 ml con acetonitrilo, las condiciones cromatográficas son las siguientes:

- Columna: C_{18}.
- Solvente: acetonitrilo / agua (83 +17)
- Detector: índice de refracción.
- Otros parámetros:
  a) Flujo de 1 ml/min.
  b) Temperatura 23 °C (73,4 °F)
  c) Las soluciones estándar de cada uno de los azúcares se preparan a partir de 3,804 gramos de fructosa, 3,010 gramos de glucosa y 0,602 gramos de sacarosa. Los azúcares se disuelven en 50 ml de agua y se llevan a 100 ml con acetonitrilo.
  d) El volumen de inyección es de 10 μl.

Si se aplican las condiciones establecidas en la Norma DIN: inyectando 10 μl de muestra en una columna amino, con una mezcla de agua / acetonitrilo (20:80) como solvente, una velocidad de flujo igual a 1,3 ml/min. y 30 °C (86 °F) de temperatura se pueden obtener una serie de picos correspondientes a fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa, maltosa, trehalosa, isomaltosa, erlosa, melezitosa y maltotriosa (DIN 10758, 1995)

En la Norma Revisada para la Miel del Codex se establecieron límites de 60 g% de glucosa y fructosa para las mieles florales y 45 g% para la miel de mielada y sus mezclas con miel de flores. Esta modificación se planteó teniendo en cuenta que las mieles de mielada poseen cantidades menores de azúcares reductores directos y mayores de oligosacáridos no reductores tales como melezitosa, maltotriosa y rafinosa.
Con respecto al contenido de sacarosa los valores límites aceptados son 5, 10 y 15 g% dependiendo del tipo de miel.
Se especifican límites para los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa porque se adoptó esta metodología para la determinación de hidratos de carbono.

Con detector Amperométrico (Bogdanov, 1997)

Los azúcares que poseen pKa comprendidos entre 12 y 13 se comportan como ácidos débiles a pH superior a 12 estando parcial o totalmente ionizados. Estos compuestos pueden separarse por un mecanismo de intercambio iónico.

Para que el detector proporcione una respuesta lineal la concentración de la muestra no puede superar los 6g/l, se recomienda preparar una solución acuosa de 0,2 g%. La solución, previamente filtrada a través de un filtro de membrana de 0,22 de diámetro de poro, se inyecta en el equipo.

Las condiciones cromatográficas son las que se detallan a continuación:

- Columna: se requiere una columna de intercambio aniónico que posea una rápida transferencia de masa y difusión, alta estabilidad mecánica y frente a variaciones de pH. Debe utilizarse una precolumna.

- Solvente: los azúcares se eluyen con una mezcla de agua / hidróxido de sodio 50% (45:55)

- Detector: se utiliza un sistema de pulso amperométrico que debe ser estable y sensible debido a que continuamente se eliminan compuestos de oxidación de los azúcares. Este es un detector electroquímico sensible a cambios en propiedades específicas del soluto. La sensibilidad a la muestra es de 10^{-12} g/ml.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  a) El análisis completo demanda aproximadamente 40 minutos, se recomienda trabajar con un flujo de 0,5 ml/min durante los primeros 16 minutos, aplicar un gradiente de + 0,1 ml/min durante 5 minutos y a continuación proseguir la corrida con un flujo de 1 ml/min.
  b) Se trabaja a temperatura ambiente.

c) Se trabaja con patrones externos y el integrador calcula directamente la concentración de los constituyentes de la muestra. Los picos se identifican sobre la base de sus tiempos de retención.
d) El volumen de inyección más apropiado es de 25μl.

Los resultados se expresan en gramos de cada azúcar por 100 gramos de miel.

A pesar que el detector utilizado en este caso es más sensible que el detector de índice de refracción es un método poco utilizado para análisis de rutina. La determinación es muy cara y de acuerdo con el tipo de detector electroquímico empleado la muestra se destruye en un 10% o totalmente.

Cromatografía Gas-Líquido (CGL)

La Cromatografía Gas-Líquido proporciona una alternativa para el análisis de los carbohidratos predominantes en la miel, en este caso la fase móvil es un gas y como consecuencia los componentes de la muestra deben ser volátiles.
Los carbohidratos o sus oximas se transforman en trimetilsilil derivados que al ser inyectados en la columna se separan y cuantifican usando manitol como patrón interno. Es importante derivatizar los componentes de la muestra porque, en general contiene componentes polares, difíciles de vaporizar, generándose material no reactivo y “side products” que dificultan la cuantificación de los compuestos en estudio.

La concentración de muestra recomendada es de 0,6 g% y se prepara en agua con agregado de manitol como patrón interno. Se seca una porción en corriente de nitrógeno a 50 °C (122 °F) y a partir de ella se obtienen las oximas en caso de optar por esta alternativa antes de obtener los derivados correspondientes. Se preparan los derivados con la solución silanizante (5 partes de piridina, 2 partes de hexametildisilazano y 1 parte de trimetilclorosilano)

Las condiciones recomendadas de trabajo son las siguientes (Bogdanov, 1997):

- Columna: se utiliza una columna capilar SE 52 o similar.

- Gas carrier: hidrógeno.

- Detector: mide propiedad física del gas eluente. En el caso particular de los azúcares se usa un detector de ionización de llama.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 4 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 70 °C (158 °F) La temperatura de la columna se programa a 49 °C/min. (120,2 °F/min.) hasta los 140 °C (284 °F) y luego a 6 °C/min. (42,8 °F/min.) hasta los 300 °C (572 °F)
  c) Las concentraciones de los azúcares se calculan utilizando el método del patrón interno sobre la base de los factores de respuesta obtenidos utilizando una mezcla patrón de

cada uno de los azúcares preparados de igual forma que la descripta anteriormente para la preparación de la muestra.

d) El volumen de inyección de muestra derivatizada disuelta en hexano es de 0,6μl.

Los resultados se expresan en gramos de cada azúcar por 100 gramos de miel.

La muestra frecuentemente se destruye de modo que no pueden recuperarse sus componentes. Para recobrar los azúcares en aquellos casos en los cuales no hay destrucción, como el efluente es vapor, debe atraparse y enfriarse en hielo o nitrógeno líquido. Para poder identificarlos es necesario transformar nuevamente el derivado en el azúcar libre correspondiente.

A pesar que los detectores son más sensibles que en la Cromatografía Líquida no permite una separación tan exhaustiva, es un método rápido que puede utilizarse para determinaciones de rutina (Conrad, 1976)

Una alternativa consiste en separar los azúcares por Cromatografía en Papel o en Capa Fina y a continuación analizar los compuestos obtenidos luego de separar y disolver convenientemente las manchas por Cromatografía Líquida o Cromatografía Gas-Líquido lográndose de esta manera determinar trazas de constituyentes u oligosacáridos.

- MONOSACÁRIDOS Y DISACÁRIDOS

Enzimático con Glucosa-oxidasa

Determinación de Glucosa

En algunos casos interesa conocer la tendencia de la miel a cristalizar, este fenómeno puede predecirse conociendo el valor de la relación entre el contenido de glucosa y la actividad acuosa. Este es un caso en el cual el método es ideal porque permite determinar únicamente el contenido de glucosa. Es rápido y el reactivo es específico para la determinación de este hidrato de carbono, quedando así eliminada la interferencia de los disacáridos presentes en la miel, que complican la determinación de glucosa por los métodos tradicionales.

Se determina con glucosa-oxidasa, las preparaciones comerciales de esta enzima contienen tris – (hidroximetil) aminometano que inhibe la actividad de la invertasa y de la α-glucosidasa, enzimas presentes en la miel que conllevan a un considerable error en la determinación de la glucosa.

La reacción que cataliza la enzima es la siguiente:

$$\text{D – GLUCOSA} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{ÁCIDO GLUCÓNICO} + H_2O_2$$

Otra enzima, la peroxidasa, descompone el agua oxigenada que se produce durante la oxidación de la glucosa liberando oxígeno que será responsable de oxidar a un cromóforo cuya

forma oxidada es azul, la coloración producida será proporcional a la cantidad de glucosa de la muestra.

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

$$O_2 + \text{CROMÓGENO RED.} \rightarrow \text{CROMÓGENO OXID.}$$

Es posible trabajar con un Kit comercial o preparar los reactivos en el laboratorio. En caso de optar por esta alternativa serán necesarios: peroxidasa, Tris-aminometano, glucosa-oxidasa, diclorhidrato de o-toluidina, dextrosa y buffer Tris a pH 7,6.

El método consiste en preparar una solución de miel de 1 g%, medir 5,00 ml y diluir a 100 ml (solución de trabajo) Paralelamente se prepara una solución estándar de dextrosa disolviendo en agua 30 a 35 miligramos de dextrosa exactamente pesados y diluidos a 200 ml.
Se calientan en baño de agua hirviente alícuotas de 2,00 ml de la solución de trabajo y de la solución estándar durante 2 minutos y luego de enfriar se agregan 5,0 ml de la mezcla reactiva. La mezcla de reactivos se prepara filtrando una solución de 800 miligramos de glucosa-oxidasa y 16 miligramos de peroxidasa en 200 ml de buffer TRIS (384 ml de HCl 0,8 M más 500 ml de solución de TRIS 0,8 M ajustada a pH 7,6 y llevada a 1 litro) y una solución de 180 miligramos de o-toluidina en 260 ml de agua. Debe dejarse toda la noche antes de ser usada.
A continuación se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos, se agrega 0,1 ml de HCl 4N y se determina la absorbancia a 500 nm, el color debe ser netamente violeta, es estable durante 1 hora (White, 1964)

El resultado se calcula en gramos de glucosa / 100 gramos de miel utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ glucosa} = \frac{A_m \times m_d \times 1000}{A_d \times m_m}$$

A_m absorbancia de la solución de muestra.

m_d masa de dextrosa, en mg.

A_d absorbancia de la solución de dextrosa.

m_m masa de muestra, en mg.

Si se utiliza el reactivo comercial la determinación debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de Sacarosa

Este método puede aplicarse para la determinación del contenido de sacarosa y evitar así las interferencias presentes en su cuantificación y la necesidad de informar el contenido como sacarosa aparente.

El ensayo consiste en destruir la glucosa libre con glucosa-oxidasa y catalasa antes de realizar la inversión enzimática de la sacarosa (invertasa) evitándose así la hidrólisis ácida de la muestra que desdobla otros disacáridos presentes tales como la melesitosa y enlosa y no permite conocer el contenido real de sacarosa (White, 1977)

Se parte de 1 gramo de miel y luego de realizar una dilución apropiada se incuba durante 1 hora a 40 °C (104 °F) con la mezcla de glucosa-oxidasa y catalasa preparada en buffer fosfato a pH 6,6, a continuación se toman 4 porciones de muestra tratada y se agrega solución de invertasa en buffer acetato a pH 4,5 a dos de ellas y agua destilada a las dos restantes incubándolas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Paralelamente se trabaja con una solución estándar de glucosa de 100 μg/ml la cual se somete a idéntico tratamiento que la muestra.
Se intercalan los tubos de muestra y estándar y se agrega la mezcla de glucosa-oxidasa y peroxidasa, al cabo de 60 minutos se mide la absorbancia a 520 nm luego del agregado de HCl 4N.

El resultado se calcula en gramos de sacarosa / 100 gramos de miel utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ sacarosa} = \frac{1{,}9\,(m_2 - m_1) \times 100}{100 \times m_m}$$

m_1 masa de glucosa antes de la inversión, en μg.

m_2 masa de glucosa después de la inversión, en μg.

m_m masa de muestra, en mg.

Métodos Polarimétricos

Rotación Específica

Este método se basa en la medición de la rotación angular (α) del plano de polarización de la luz polarizada producida por sustancias ópticamente activas, tales como los hidratos de carbono.

La rotación angular depende de distintos factores:

- Concentración de azúcar (sobre todo si se trata de glucosa o azúcar invertido)
- Solvente, si la medición no se realiza en solución acuosa debe aclararse.
- Otras sustancias disueltas como por ejemplo sales.
- Mutarrotación.

- Temperatura.

- Longitud del tubo.

La rotación específica $[\alpha]_D^{20°C}$ se define como la rotación de la luz polarizada producida por 1 gramo de sustancia seca ópticamente activa en 1 ml de solución, en un tubo de 1 dm de paso óptico, a 20 °C (68 °F) y a la longitud de onda correspondiente a la línea D del sodio.
Es igual a α x 100 / m x l si se mide en una solución cuya concentración está expresada en g/100 ml y se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$[\alpha]_D^{20°C} = \frac{\alpha}{c \times l} = \frac{\alpha \times 100}{m \times l}$$

α rotación angular en grados de ángulo.

c concentración de la solución en estudio, en g%.

l longitud del tubo, 2 dm.

m masa seca de muestra, en gramos.

El valor de $[\alpha]_D^{20°C}$ dependerá de la composición de los hidratos de carbono. En general la miel de flores desvía el plano de polarización de la luz polarizada hacia la izquierda mientras que, las mieles de mielada son dextrógiras.

Luego de clarificar una solución aproximadamente 12 g% de miel se lee, a 20 °C (68 °F), la rotación angular con la ayuda de un polarímetro. Separadamente se determina el contenido de agua de la muestra, es necesario conocer este parámetro porque la rotación específica está definida sobre la base de la materia seca (Bogdanov, 1997)

El valor de la rotación angular orienta sobre el origen de la miel y ayuda en la detección de adulteraciones, las mieles florales adulteradas con jarabe de glucosa pueden volverse dextrorrotatorias dependiendo del porcentaje de adulterante.

A título ilustrativo se dan algunos datos de los valores obtenidos en un estudio realizado a 20 °C (68 °F) La medición se llevó a cabo a la longitud de onda correspondiente a la línea D del sodio en un tubo de 2 dm de longitud. El cálculo de la rotación específica se realizó teniendo en cuenta la masa de miel seca.

Tabla Nº 18: Rotación Específica de Mieles Florales Argentinas.

Muestra	Agua [g%]	Maltodextr.	α[°]	$[\alpha]_D^{20°C}$ [°ml/gdm]
1	18,6	Negativo	- 7,00	- 16,4
2	16,9	Negativo	- 4,40	-10,5
3	17,0	Negativo	- 6,50	- 14,9
4	17,5	Negativo	- 5,65	- 14,9
5	18,0	Negativo	- 4,25	- 11,2
6	18,8	Negativo	- 7,60	- 20,3
7	17,9	Negativo	- 5,30	- 14,0
8	17,2	Negativo	- 7,15	- 16,5
9	16,9	Vestigios	-4,25	- 9,9
10	19,6	Positivo	-2,60	- 7,0
11	18,9	Positivo	-3,20	- 8,6
12	20,5	Positivo	+10,50	+ 28,7
13	21,0	Positivo	+26,80	+ 73,6

Sobre la base de los resultados presentados en la tabla es posible comprobar que la miel genuina produce una desviación del plano de polarización de la luz polarizada hacia la izquierda, es netamente levógira.
En algunos casos las muestras adulteradas presentan características levógiras, generan una desviación del plano de polarización de la luz polarizada menos pronunciada que las mieles puras y en otros la muestra es dextrógira.

Mutarrotación

La mutarrotación es otro dato interesante que permite orientar sobre el origen de la miel y ayudar a detectar adulteraciones.

Es un proceso por el cual se alcanza el equilibrio entre las formas α y β de los carbohidratos, la mutarrotación es catalizada por la adición de H^+ o de iones OH^-. La mayoría de los monosacáridos y algunos disacáridos presentan este fenómeno. Por ejemplo la glucosa cristalina está en su forma α y presenta una desviación polarimétrica, a 20 °C (68 °F), de +109,6° mientras que en solución se encuentra en su forma β con una desviación polarimétrica igual a +19.8°. Cuando alcanza el equilibrio la desviación es igual a +52,7°.

Para realizar este ensayo se prepara una solución de 26 g% de miel, se clarifica con crema de alúmina, se lleva a volumen y luego de filtrar se mide la desviación polarimétrica a 20 °C (68 °F) en tubo de 200 mm. de paso óptico obteniéndose el valor de la *Polarización Directa Inmediata.*
Después de realizar esta lectura se deja la solución toda la noche y se mide nuevamente la desviación polarimétrica a 20 °C (68 °F) en tubo de 200 mm. El valor medido corresponde a la *Polarización Directa Constante.*

La *Mutarrotación* es la diferencia entre los valores de la *Polarización Directa Constante* y la *Polarización Directa Inmediata*.

El proceso de mutarrotación puede acelerarse calentando a ebullición la solución a pH 7 o agregando unas gotas de amoníaco o Na_2CO_3 anhidro hasta reacción alcalina al tornasol. Para asegurarse que la mutarrotación fue completa se realizan varias lecturas, a intervalos de 15 a 30 minutos hasta obtener una lectura constante.

Debe tenerse en cuenta que las soluciones no deben permanecer alcalinas durante mucho tiempo ni calentarse a altas temperaturas porque puede destruirse la fructosa.

La A.O.A.C. incluye este método entre las determinaciones que pueden realizarse para el análisis de la miel, fue adoptado oficialmente en 1983 (A.O.A.C. 920.182, 1995)

Los datos que a continuación se presentan corresponden a la Polarización Directa Inmediata y Polarización Directa Constante en mieles, con el objeto de brindar una idea aproximada de los valores que pueden obtenerse en relación con este parámetro (Winton, 1939)

Tabla Nº 19: Polarización Directa.

Origen de la Miel	Polarización Directa Inmediata a 20°C	Polarización Directa Constante a 20°C
Álamo	+ 6,7	+ 3,6
Naranja	- 11,7	- 15,5
Nogal	- 11,7	- 7,8
Manzana	- 2,7	- 8,6
Alfalfa	- 11,6	- 15,1
Trébol sueco	- 7,9	- 14,0
Trébol dulce	- 12,1	- 17,6
Trébol blanco	- 9,7	- 13,0
Algarrobo	- 18,5	- 21,4
Mielada	+ 24,9	+ 17,8
Mielada y miel de flores	Mín. - 10,6 Máx. + 9,8	Mín. - 15,1 Máx. + 5,3

Determinación polarimétrica de glucosa y fructosa

Uno de los factores que influyen sobre el valor que adopta la rotación angular, tal cual se expuso anteriormente, es la temperatura. La dependencia que existe entre ambos parámetros está dada por la siguiente fórmula:

$$\alpha = \alpha^{20°C} + \gamma\ (T - 20)$$

$\alpha^{20°C}$ rotación angular medida a 20 °C (68 °F), en °/g%dm.

γ constante.

T temperatura de la solución, en °C.

La rotación angular de la glucosa no depende de la temperatura, γ es igual a 0. Su valor es igual a + 52,7° a diferencia de la fructosa que adopta valores de - 90.7° y - 52,7° a 20 y 87 °C (68 y a 188,6 °F) respectivamente.
En esta propiedad se basa la cuantificación de estos glúcidos cuando se presentan juntos como en el caso de la miel.
Para ello se mide la desviación polarimétrica directamente sobre la muestra, a 20 y 87 °C (68 y a 188,6 °F) y luego de someterla a una hidrólisis ácida.

Se prepara una solución de 26 gramos de miel en 100 ml de agua clarificada con crema de alúmina, después de agregar 2 gotas de amoníaco se lleva a volumen y se filtra.

a) Se transfiere la solución a un tubo de 2 dm y se lee la rotación angular en el polarímetro a 20 °C (68 °F) La lectura se repite a 87 °C (188,6 °F)
b) Se toman 50 ml de la solución anterior en un matraz de 100 ml y se invierten con 10 ml de HCl δ=1,10 dejándola en reposo a 20 °C (68 °F) durante 24 horas o 10 horas a 25 °C (77 °F), se lleva a volumen y se lee la rotación angular en el polarímetro a 20 °C y a 87 °C (68 y a 188,6 °F), los resultados se multiplican por 2.
c) Se determina el contenido de agua de la muestra.

Los cálculos se realizan con las siguientes fórmulas:

$$g\% \text{ Fructosa} = \frac{(a - 1{,}0315 \times b) \times 100}{2{,}3919 \times 26}$$

$$g\% \text{ Glucosa} = ARD - 0{,}915 \times g\% \text{ Fructosa}$$

a desviación polarimétrica directa a 20 °C (68 °F)

b desviación polarimétrica directa a 87 °C (188,6 °F)

ARD azúcares reductores directos en glucosa determinados por el método de Felhing-Causse-Bonnans, en g%.

$$g\% \text{ Sacarosa} = \frac{(P - I) \times 100}{132{,}1+0{,}0833(13-m)-0{,}53(t-20)}$$

P desviación polarimétrica antes de la inversión.

I desviación polarimétrica después de la inversión.

m masa de residuo seco correspondiente a 100 ml de solución invertida, en gramos.

t temperatura de la lectura, en °C.

Este método (Lutz, 1976), a diferencia de otras determinaciones polarimétricas, permite conocer la composición en glucosa, fructosa y sacarosa de la miel. En caso de no disponer de un equipo de Cromatografía Líquida para analizar el perfil de azúcares constituye una alternativa interesante para evaluar la distribución de los principales hidratos de carbono y detectar adulteraciones.

Debe tenerse en cuenta que la determinación polarimétrica de fructosa no es exacta debido a que interfieren azúcares y otros materiales, si la solución se pasa a través de una columna de carbón se obtiene una solución que contiene únicamente glucosa y fructosa que puede analizarse polarimétricamente libre de interferencias.

- DEXTRINAS TOTALES

Gravimetría

Si se analizan los azúcares luego de pasar la muestra a través de una columna de carbón y celite las dextrinas estarán contenidas en la última fracción eluida, conjuntamente con otros azúcares superiores.

En algunos casos interesa cuantificar sólo las dextrinas totales porque su valor en mieles genuinas normalmente es bajo (< 3 g%), si está adulterada la cantidad de dextrinas totales puede aumentar considerablemente.

El método consiste en precipitar las dextrinas con alcohol etílico absoluto (A.O.A.C. 31.122, 1980)

Cuando el líquido sobrenadante está claro (se recomienda dejarlo toda la noche) se filtra el precipitado y a continuación se lo disuelve en agua, a una temperatura no mayor de 80 °C (144 °F)

Se evapora el agua y el residuo se lleva a peso constante en estufa a 70 °C (128 °F) y presión reducida (≤ 50 mm de Hg); luego se disuelve en agua el precipitado ya pesado y en la solución resultante se determinan los azúcares reductores después de invertir. Los resultados se expresan en gramos de dextrinas totales / 100 gramos calculándose la concentración de dextrinas totales mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Dextrinas} = \frac{m_p \times 100}{m_m} - \text{ARPI}$$

m_p masa de precipitado, en gramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

ARPI azúcares reductores después de invertir determinados por el método de Felhing-Causse-Bonnans, en gramos de azúcar invertido / 100 gramos de miel.

El artículo 783 del Código Alimentario Argentino establecía un límite de 3% para el contenido de dextrinas totales, esta exigencia quedó anulada cuando el citado artículo fue reemplazado

por el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel que no contempla este parámetro.

- ÁCIDOS

Este dato es eficaz para dictaminar sobre la calidad de la miel. Es importante como índice del estado de conservación del producto, mieles fermentadas o en vías de fermentación presentan valores altos de acidez.

Esta determinación también es útil para detectar aquellos casos en los cuales se haya usado ácido fórmico o ácido láctico para combatir la varroa.

El método se basa en la neutralización de los ácidos presentes en la miel. Se realiza una titulación rápida de 10 gramos de muestra, disueltos en un volumen adecuado de agua destilada, con NaOH 0,05 N hasta pH 8,50, se toma nota del volumen gastado e inmediatamente se agregan 10,00 ml de NaOH 0,05 N y sin pérdida de tiempo se titula el exceso de hidróxido con HCl 0,05 N hasta pH 8,30. El punto final de la titulación puede detectarse utilizando un peachímetro o fenoftaleína como indicador, en este último caso se considera que se ha alcanzado el punto final si el color rosado persiste durante 10 segundos. No es recomendable el uso de indicador pues el punto final es confuso debido a la presencia de la lactona, que se encuentra en equilibrio dinámico con el ácido glucónico. Paralelamente debe realizarse un blanco de reactivos.
La titulación debe realizarse en un tiempo relativamente corto para evitar la regeneración del ácido y la descomposición de los azúcares durante el período en el cual la solución se encuentra a pH mayor de 8,30. Si el punto final se alcanza agregando el NaOH gota a gota una determinada cantidad de lactona se titula antes de llegar a pH 8,50. La titulación hasta pH 8,50 es equivalente a mantener el color de la fenoftaleína 10 segundos mientras el pH cae a 8,30 con el tiempo (White, 1958)

La titulación directa permite conocer el valor de la *acidez libre* y la titulación por retorno el contenido de lactona *(acidez de reserva)* La *acidez total* es la suma de ambas.

Antiguamente la acidez se expresaba en ácido fórmico. Cuando se comprobó que el principal ácido de la miel era el ácido glucónico se abandonó esa forma de expresión de los resultados y actualmente se expresa en miliequivalentes de ácido / kilogramos de miel con el objeto de independizarse de la clase de ácido ya que el alimento posee una mezcla de ácidos. Los cálculos se realizan empleando las siguientes fórmulas.

$$\text{Acidez libre} = \frac{(V_1 - V_b) \times 0{,}05 \times 1000}{m}$$

$$\text{Lactona} = \frac{(10{,}00 - V_2) \times 0{,}05 \times 1000}{m}$$

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

V_1 volumen de NaOH 0,05 N gastado en la titulación directa, en ml.

V_b volumen de NaOH 0,05 N gastado en la titulación del blanco, en ml.

V_2 volumen de HCl 0,05 N gastado en la titulación por retorno, en ml.

m masa de muestra, en miligramos.

La medición del pH es un dato útil que puede obtenerse antes de comenzar el ensayo y orienta acerca del origen de la miel. Es imprescindible la calibración del peachímetro a pH 8,00 antes de comenzar la titulación, en caso contrario la determinación puede conducir a resultados erróneos.

El pH de las mieles de néctares o con ligeras mezclas de mielada oscila entre 3,5 y 4,5; en mieles de mielada varía entre 4,5 y 5,5. Se han reportado datos de pH menores de 4,5 en mieles florales y menores de 5,5 en mieles de mielada.

Es importante calcular la relación entre la lactona y la acidez libre (lactona / acidez libre) Valores bajos de esta podrían indicar la presencia de miel de mielada.
El valor promedio encontrado en miel de flores es 0,355 y en miel de mielada 0,127 (USDA, 1962) Estos datos indican una posible relación entre lactona, acidez libre y pH, es lógico plantearlo ya que la posición del equilibrio entre el ácido glucónico y la δ-gluconolactona depende del pH del medio.

Este método fue adoptado como método oficial para la determinación de la acidez en la miel por la A.O.A.C. en 1977 (A.O.A.C. 962.19, 1995)
El Reglamento Técnico MERCOSUR lo adopta como método de referencia pero sólo establece un límite máximo de 50 miliequivalentes de ácido / kilogramo de miel para la acidez libre.
La normativa del Codex vigente sobre miel adopta este método para el análisis de la acidez libre (*J. Assoc. Public Analysts (1992) 28 (4) 171-175 / MAFF validated method V19)*
La Norma Codex actual encuadra este parámetro como un factor de calidad adicional y establece su límite en 50 miliequivalentes de ácido / kilogramo de miel. El estándar anterior a la última revisión establecía un límite de 40 miliequivalentes de ácido / kilogramo de miel pero este fue modificado debido a que existen mieles que naturalmente poseen una cantidad mayor de ácidos.

- MATERIA MINERAL

Cenizas

Este dato es útil para evaluar la genuinidad de la miel o detectar contaminaciones químicas, orienta sobre su origen ya que las mieles florales poseen contenidos muy bajos de cenizas mientras que las mieles de mielada presentan mayor cantidad de minerales.
En el caso particular de mieles adulteradas con melaza se obtienen valores altos de cenizas ya que la melaza posee normalmente 10 gramos% de sales.
Actualmente esta determinación está siendo desplazada por la medición de la conductividad eléctrica, método indirecto para la determinación del contenido total de minerales en los alimentos. En el caso particular de la miel es ventajoso porque este alimento normalmente contiene valores muy bajos de minerales. Por otra parte la determinación directa obliga a

incinerar la muestra lo que conduce a un ensayo que requiere mucho tiempo y si no se realiza cuidadosamente se corre el riesgo de perder parte de la muestra ya que al quemarse genera mucha espuma.

En la Norma Codex revisada se reemplazó este parámetro por la determinación de la conductividad eléctrica para el análisis del contenido de minerales.

La determinación de las cenizas solubles e insolubles en agua constituyen un dato interesante, el residuo insoluble es un índice del contenido de impurezas (arena, polvo, etcétera) En general la relación cenizas solubles / insolubles es constante, cualquier alteración de su valor es una llamada de atención sobre un posible fraude.

Otro dato que se mantiene relativamente constante es la alcalinidad de las cenizas solubles, disponiéndose así de un parámetro adicional que ayuda a evaluar una posible adulteración o alteración. En general la alcalinidad de las cenizas se atribuye a la presencia de sales de ácidos orgánicos que al quemarse se convierten en carbonatos.

Las cenizas totales se determinan pesando el residuo inorgánico que queda después de carbonizar la muestra a 600 °C (1112 °F), los resultados se expresan en gramos de cenizas totales por 100 gramos de miel. Es conveniente secar lentamente la muestra y carbonizarla usando una lámpara de infrarrojo, evitando así la formación de espuma y la consecuente perdida de material antes de llevarla a la mufla (A.O.A.C. 920.181A, 1995)

El porcentaje de cenizas totales se calcula con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas totales} = \frac{m_c \times 100}{m_m}$$

m_c masa de residuo luego de carbonizar la muestra, en gramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

Las cenizas insolubles se determinan por calcinación del residuo que se obtiene después de disolver las cenizas totales en agua y filtrarlas a través de papel libre de cenizas. El contenido de cenizas insolubles se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas Insolubles} = \frac{m_c \times 100}{m_m}$$

m_c masa de residuo luego de carbonizar el papel de filtro conteniendo el insoluble, en gramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

Por diferencia entre cenizas totales y cenizas insolubles se halla el valor de las cenizas solubles. Los resultados se expresan en gramos / 100 gramos de miel (A.O.A.C. 900.02D, 1980)

Si se titula el filtrado anterior con HCl 0,1 N, usando naranja de metilo como indicador, se puede conocer la alcalinidad de las cenizas solubles (A.O.A.C. 900.02E, 1980)

El resultado se expresa en ml de ácido 1 N / 100 gramos de muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Alcalinidad} = \frac{V \times 100}{m_m}$$

V volumen de HCl 1 N gastado en la titulación, en ml.

m_m masa de muestra, en gramos.

La legislación actual sólo establece un límite para las cenizas totales. La reglamentación MERCOSUR exige, para la miel floral un contenido máximo de cenizas de 0,6 g% y para la miel de mielada y sus mezclas con miel de flores hasta 1,2 g%.

Conductividad Eléctrica

La medición de la conductividad eléctrica permite determinar la procedencia botánica de la miel, particularmente caracterizar mieles monoflorales y distinguir miel de flores de miel de mielada ya que esta última presenta mayor conductividad. En muchos países se determina en controles de rutina para la determinación del contenido de minerales en lugar de la cuantificación de las cenizas.
La medición de esta propiedad puede ayudar a comprobar si la miel proviene de abejas alimentadas con edulcorantes artificiales.

La conductividad eléctrica (γ) se define como la conductividad de 1 ml de una solución de 20 gramos de miel, en base seca, en 100 ml de agua, medida a 20 ºC (68 °F) La distancia entre los electrodos planos de 1 cm^2 será de 1 cm.

$$\gamma = K \times G = mS.cm^{-1}$$

K constante de la celda, en cm^{-1}.

G conductancia eléctrica, en mS.

Las unidades en las cuales se expresa la conductividad eléctrica (conductancia específica) pueden ser: $mS.cm^{-1}$, $\mu S.cm^{-1}$ o $S.cm^{-1}$.

La conductividad (conductancia específica) de una solución depende de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del soluto. De esto se desprende que la conductancia específica de una solución es un índice de la concentración de iones presentes y del contenido de minerales. En los alimentos azucarados la determinación conductimétrica está afectada por la presencia de no electrolitos, de acuerdo con la clase de alimento existe un factor de corrección experimental.

Una solución de miel es capaz de conducir la corriente eléctrica cuando es sometida a la acción de un campo eléctrico pues contiene electrolitos tales como minerales, aminoácidos y ácidos orgánicos.

En general, cuanto mayor sea el contenido de cenizas mayor será la conductividad eléctrica de la miel, se ha demostrado que existe una relación lineal entre el contenido de cenizas y la conductancia específica.
Esa dependencia está dada por la siguiente fórmula:

$$\gamma = 0{,}14 + 1{,}74 \times C$$

γ conductancia específica, en $mS.cm^{-1}$.

C contenido de cenizas, en gramos / 100 gramos de miel.

La acidez de la muestra es otro factor que influye en el resultado de la determinación. Debido a que las sales de ácidos débiles se disocian parcialmente existen en solución otros iones, distintos de los minerales, capaces de conducir la corriente eléctrica. Para evitar esta interferencia la conductividad se mide en un medio acidificado, el ensayo requiere dos mediciones de la conductividad, antes y después del agregado del ácido. En jarabes y mieles una segunda determinación conductimétrica en medio alcalino proporciona valores más precisos (Pomeranz, 1980)

A continuación se presentan los datos obtenidos a partir de la medición de la conductividad eléctrica, a 20 °C, en mieles de diferentes orígenes.

Tabla N° 20: Conductividad Eléctrica de Mieles Florales Argentinas

Muestra	Agua (g/100g)	Cenizas (g/100g)	Cond. Eléctrica ($mS.cm^{-1}$)
1	15,9	0,07	0,149
2	16,0	0,09	0,180
3	15,1	0,05	0,134
4	17,2	0,08	0,228
5	16,0	0,09	0,156
6	16,1	0,11	0,180

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo comprobar, en algunos casos, que a medida que aumenta el contenido de cenizas de la muestra la conductividad eléctrica es mayor.
Las muestras 2 y 6 con diferente contenido de cenizas presentaron la misma conductividad eléctrica y las muestras 2 y 5 con igual contenido de materia mineral presentaron diferente conductividad eléctrica.
Este fenómeno podría explicarse teniendo en cuenta que no fueron realizados los ensayos adicionales para evitar una posible interferencia debido a diferencias entre el contenido de ácidos o el origen de la miel.
No se encontró correlación lineal entre el contenido de cenizas y la conductividad eléctrica de la miel.

Recientemente fueron publicados los resultados de la medición de la conductividad eléctrica de mieles realizada por la IHC (International Honey Commission), sobre la base de los datos obtenidos la Comisión propuso que la miel de flores y sus mezclas con miel de mielada deberían presentar una conductividad eléctrica de no más de 0,8 $mS.cm^{-1}$ y la miel de mielada no menos de 0,8 $mS.cm^{-1}$ a excepción de los géneros *Arbutus, Banksia, Erica, Leptospermum, Melaleuca, Eucalyptus y Tilia,* solas o en mezclas.

El Prof. Dr. H. Horn reportó valores de hasta 1600 μS/cm para miel de mielada y valores comprendidos entre 180 y 1200 μS/cm para mieles florales (Horn, 1996)

El ensayo consiste en medir la conductancia de una solución de miel anhidra de 20 g%, a 20 ± 0,5 °C (68 ± 0,5 °F) introduciendo los electrodos, previamente conectados a un medidor de conductividad, y separados entre sí por una distancia de 1 cm. Para evitar errores debido a fenómenos de polarización la medición debe realizarse en el menor tiempo posible. Los reactivos utilizados deben ser de pureza analítica y el agua recién destilada o de pureza adecuada.

Para poder realizar los cálculos es necesario conocer la constante de la celda (K), esta se determina midiendo, a 20 ºC (68 °F), la conductancia eléctrica de una solución de cloruro de potasio 0,1 M. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula:

$$K = 11,691 \times 1/G = cm\text{-}1$$

G conductancia eléctrica de la solución de KCl, en mS.

11,691 $mS.cm^{-1}$ suma de la conductividad eléctrica del agua destilada y de una solución de cloruro de potasio 0,1 M, a 20 ºC (68 °F)

Paralelamente se determina el contenido de agua de la muestra, es necesario conocer este parámetro porque la conductividad eléctrica está definida sobre la base de sustancia seca.

Es una medición rápida y sencilla, el instrumento de medición no es caro. El método es apropiado para medir la conductividad eléctrica del alimento en el rango de 0,1-3 $mS.cm^{-1}$ (Bogdanov, 1997)

La Norma DIN 10753 contempla este método para la medición de la conductividad eléctrica de la miel. La determinación de la constante de la celda se realiza empleando una solución de KCl 0,01 M con una conductividad teórica, a 20 ºC (68 °F), de 1,278 mS/cm.

- SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA

Gravimetría

Este parámetro es un índice que permite constatar si la miel fue obtenida aplicando buenas prácticas de manufactura. La determinación del contenido de sustancias insolubles en agua es importante para detectar impurezas tales como granos de arena, restos de cera, polvo y otros sólidos insolubles.

Este análisis antiguamente tenía mayor importancia porque la miel era extraída por prensado de los panales. En la actualidad prácticamente la totalidad de la miel se extrae por

centrifugación, y en este caso, salvo que no se respeten las normas mínimas de higiene durante la obtención y el procesamiento del producto, las impurezas son muy bajas.

Por esta razón los valores máximos aceptados en la Norma Codex para la Miel y en el Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel difieren según el proceso de extracción, la miel prensada puede contener hasta 0,5 g% de sólidos insolubles en agua mientras que en las restantes su contenido no puede superar 0,1 g%.

La investigación del contenido de sustancias insolubles en agua se realiza mediante un método gravimétrico (CAC, 1990)

Se pesan 20 gramos de muestra, se disuelven en una cantidad adecuada de agua destilada a 80 °C (176 °F) y se filtra a través de un vidrio sinterizado (poro 15 a 40μ) previamente tarado. Se lava a fondo con agua destilada caliente hasta eliminar los azúcares (ensayo de Felhing-Mohr-Bertrand negativo)

El reactivo para este ensayo consiste en una solución cúprica (20 gramos de $CuSO_4.5H_2O$ diluidos a 500 ml con agua destilada) y una solución alcalina (100 gramos de $C_4H_4NaKO_6.4H_2O$ y 75 gramos de NaOH diluidos a 500 ml con agua destilada)

El ensayo se realiza con 5 ml del líquido de lavado, se agregan 5 ml de la solución cúprica seguido de 5 ml de la solución alcalina. Si al cabo de hervir 5 minutos aparece un precipitado rojo de óxido cuproso el resultado es positivo.

El crisol se seca durante 1 hora a 135 °C (275 ºF) Los resultados se expresan en gramos de sólidos insolubles en agua / 100 gramos de miel aplicando la fórmula siguiente:

$$g\% \text{ de sólidos insolubles} = \frac{m_R \times 100}{m_m}$$

m_R masa del residuo, en gramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

La Comisión Internacional de la Miel afirma que este método no determina la cera, el mayor aporte al residuo insoluble y que debería modificarse la técnica de filtración para lograr retenerla y cuantificarla.

Es el método de referencia adoptado internacionalmente para la determinación de este índice de pureza.

- MATERIA NITROGENADA

Aminoácidos: Prolina

La prolina es un aminoácido, predominante en la miel, que proviene de las abejas. Interesa cuantificarla como índice de genuinidad, es un indicador útil para saber como transformaron las abejas el material que recolectaron.

No es sensible al calor como ocurre con las enzimas, pero hay que tener presente que el contenido de este aminoácido puede ser muy variable entre mieles de distintos orígenes y como consecuencia la utilidad de este dato es relativa. En general se considera que, si su concentración es menor de 200 mg/kg. el producto no es genuino.

La determinación se realiza mediante un método espectrofotométrico que mide la absorbancia del compuesto coloreado que forma la prolina con ninhidrina, esta reacción solamente tiene lugar con aminoácidos NH_2-ε libre. La interferencia de otros aminoácidos es despreciable (≤ 5%) (White, 1979)
La absorbancia de la solución está sujeta a fuertes fluctuaciones por lo tanto es de suma importancia que se respeten estrictamente todos los tiempos establecidos en el método.

Se pesan 2,5 gramos de miel y se llevan a 50 ml, se transfiere una porción de 0,5 ml a tres tubos de ensayo, luego de agregar 0,25 ml de ácido fórmico y 1,00 ml de solución de ninhidrina 3% en etilenglicol monometil éter, se incuban en baño maría durante 15 minutos, a continuación se enfrían a 20 °C (68 °F) Se agregan 5,00 ml de solución de isopropanol (1+1) y se lee la absorbancia a 520 nm contra un blanco preparado reemplazando la miel por agua. Se promedian los datos obtenidos correspondientes a los tres tubos.
La lectura se corrige por el color de la miel determinando la absorbancia de una solución de miel e isopropanol (1+1), este valor se resta del valor promedio de absorbancia de la muestra.
Simultáneamente se prepara una curva de calibración a partir de una solución tipo de prolina (50 μg/ml) La solución stock de partida (0,5 mg/ml) se prepara disolviendo 25 miligramos de prolina en 50 ml de agua destilada.
Por extrapolación se calcula la concentración de prolina en miligramos / kilogramo de miel teniendo en cuenta la concentración inicial de la solución de muestra. La fórmula que se utiliza es la siguiente:

$$\text{Prolina} = \frac{m_p \times 100 \times 1000}{m_m}$$

m_p masa de prolina calculada por extrapolación, en miligramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

100 factor de dilución.

Este método fue adoptado como método oficial para la determinación del contenido de prolina en la miel por A.O.A.C. en 1983 (A.O.A.C. 979.20, 1995)

En la Norma DIN 10754 se desarrolla un método basado en el mismo principio que el anterior pero con algunas diferencias.
En este caso no es necesario preparar una curva de calibración, el contenido de prolina en la muestra se calcula con respecto a una solución tipo del aminoácido cuya absorbancia se obtiene promediando la absorbancia resultante de tres determinaciones.

$$\text{Prolina} = \frac{A_m \times m_p \times 80}{A_p \times m_m}$$

A_m absorbancia de la muestra.

A_p absorbancia de la solución tipo de prolina.

m_p masa de prolina de la solución tipo diluida, en miligramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

80 factor de dilución.

No requiere una corrección debido al color de la miel y la absorbancia de la solución de muestra no se determina por triplicado. El agregado de isopropanol se realiza a mayor temperatura (70 °C (158 ºF)) y el color se desarrolla a temperatura ambiente.

Este parámetro no se ha tenido en cuenta, en la legislación internacional, como índice de calidad de este alimento.

Proteínas (Nitrógeno)

El contenido de nitrógeno de la miel proviene fundamentalmente del polen que contiene, también aportan nitrógeno los aminoácidos y las enzimas presentes. Su valor es muy bajo lo que obliga a utilizar micrométodos para su cuantificación. En general esta determinación no se incluye dentro de los análisis de rutina y la legislación tampoco contempla el contenido de proteínas como parámetro de calidad.

Método Micro-Kjeldhal

Consiste en una oxidación completa de la materia orgánica con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. Interesa determinar el contenido de nitrógeno de la miel proveniente de las proteínas, los aminoácidos y las enzimas, otros compuestos nitrogenados que pueden estar presentes tales como nitratos, nitritos, hidrazina (H_2N-NH_2) y azocompuestos (R-N=N-R) no interfieren porque se eliminan durante la digestión como HNO_2 y HNO_3. El resto de los compuestos orgánicos se transforman en CO_2 y H_2O, el nitrógeno forma NH_3 que queda atrapado como $(NH_4)_2SO_4$.
Luego de la digestión se destila el NH_3 liberado en presencia de álcali y se recoge sobre un ácido. Por valoración de la solución resultante se determina el porcentaje de nitrógeno.
Se pesan aproximadamente 300 mg de miel, se agrega una mezcla de K_2SO_4 y HgO como catalizador y 3 ml de H_2SO_4 (δ = 1,84) A partir del momento en el cual comienza a hervir el ácido se digiere durante 1 hora. Después de la digestión se destila por arrastre con vapor recogiendo el destilado sobre 5 ml de solución saturada de ácido bórico, el destilado se titula con HCl 0,01 N usando un indicador mixto (rojo de metilo, azul de metileno y verde de bromocresol) En medio ácido el color es naranja y en el punto final color azul sin tinte rojo (White, 1962)

Este método fue adoptado en 1983 por la A.O.A.C. para determinar el contenido de nitrógeno en la miel (A.O.A.C., 962.18, 1995)

El ácido bórico se puede reemplazar por H_2SO_4 0,01 N. Si se opta por esta alternativa el destilado se recibe sobre 25,0 ml de H_2SO_4 0,01 N y el exceso de ácido se valora por retorno con NaOH 0,01 N usando rojo de metilo como indicador. En este caso el color del indicador en medio ácido es rojo y en el punto final es color amarillo.

En ambos casos debe realizarse simultáneamente un blanco de reactivos.

El porcentaje de nitrógeno se expresa en miligramos / 100 gramos de miel y se calcula con las siguientes fórmulas de acuerdo con el método elegido:

a) Si se utilizó el primer procedimiento

$$mg\%\ N = \frac{(V_m - V_b) \times 0{,}01 \times 14{,}007 \times 100}{m_m}$$

V_m volumen de HCl 0,01 N gastados en la titulación de la muestra, en ml.

V_b volumen de HCl 0,01 N gastados en la titulación del blanco, en ml.

m_m masa de muestra, en gramos.

b) Si se utilizó el segundo procedimiento

$$mg\%\ N = \frac{(V_b - V_m) \times 0{,}01 \times 14{,}007 \times 100}{m_m}$$

V_b volumen de NaOH 0,01 N gastados en la titulación del blanco, en ml.

V_m volumen de NaOH 0,01 N gastados en la titulación de la muestra, en ml.

m_m masa de muestra, en gramos.

Si se desea expresar el porcentaje de nitrógeno en miligramos de proteína por 100 gramos de muestra el resultado se multiplica por 6,25. Se utiliza este valor ya que las proteínas de la miel contienen un promedio de 16% de nitrógeno.

Método de Biuret

El ensayo de Biuret es una medición espectrofotométrica del complejo azul-violeta que se forma entre los enlaces peptídicos y el Cu^{++} en medio alcalino. El resultado positivo depende del grupo peptídico -HN.CO.NH- y como consecuencia todas las proteínas forman el complejo coloreado. También pueden detectarse otros compuestos que contengan grupos similares, en presencia de glicerol (CH_2OH-$CHOH$-CH_2OH) no es posible realizar este ensayo (A.O.A.C. 27.11, 1945)

Se pesa una masa de muestra aproximadamente igual a 25 gramos de miel y se lleva a 100 ml, se toma 1 ml (1 a 10 mg/ml de proteínas) y se agregan 4 ml del reactivo de Biuret. Luego de 30 minutos a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 540 nm contra un blanco de reactivos.

El reactivo se prepara en el momento de usar mezclando una solución alcalina de tartrato (40 gramos de NaOH y 50g de $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$ llevados a 1litro con agua destilada) y una solución de 15 g/l de $CuSO_4.5H_2O$ (A.O.A.C. 960.04, 1990)

Se prepara una curva de calibración partiendo de una solución de albúmina de 1 mg/ml. Se calcula por extrapolación de la curva la masa de albúmina en miligramos y se divide por 6,38 para expresarla como masa de nitrógeno.

Los resultados se expresan en miligramos de nitrógeno / 100 gramos de miel, el cálculo se realiza con la ayuda de la siguiente fórmula:

$$mgN\% = \frac{m_N \times 100 \times 100}{m_m}$$

m_N masa de nitrógeno calculada por extrapolación, en miligramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

100 factor de dilución.

Si se desea conocer el porcentaje de proteínas se multiplica el valor encontrado por 6,25 y se expresa en las mismas unidades.

Método de Lowry (Williamson, 2000)

Es más sensible que el método anterior, es una determinación espectrofotométrica. Se utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteau el cual se prepara en el momento de usar mezclando solución de Na_2CO_3 en NaOH y solución de $CuSO_4$ en $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$.

Después de agregar la solución alcalina se deja durante 10 minutos a temperatura ambiente, se agrega el reactivo y luego de 30 minutos se lee la absorbancia a 660 nm.
La concentración de proteínas se obtiene por extrapolación de una curva de calibración.

- **Ácido Úrico**

La investigación de la presencia de ácido úrico tiene por objeto confirmar que la miel es de mielada. Normalmente se utilizan métodos colorimétricos para detectar este compuesto pero en el caso particular de la miel son inaplicables dada la alta concentración de azúcares y el color del alimento.

Cromatografía en Capa Fina (Cowan, 1964)

La muestra se prepara disolviendo 10 gramos de miel en 50 ml de agua y pasándola a través de una columna rellena con resina Amberlite IRA-400 (OH) con el objeto de eliminar interferencias producidas por compuestos neutros presentes. La columna está preparada con una resina de intercambio aniónico constituida por macromoléculas fuertemente alcalinas.
El ácido úrico se eluye con HCl y se analiza por Cromatografía en Capa Fina.

Las condiciones de la cromatografía son las que a continuación se detallan:

- Soporte: la placa cromatográfica puede ser de celulosa o gel de sílica, puede prepararse en el laboratorio o utilizarse las comerciales, cromatofolios. Otra alternativa es la Cromatografía en Papel. Se siembran cuatro papeles o cuatro placas con la muestra preparada como se explicó anteriormente y el patrón de ácido úrico.

- Solvente: se utilizan mezclas de n-butanol, ácido acético y agua. El solvente de corrida debe prepararse en el momento de usar, la cromatografía es ascendente.

- Revelador: luz ultravioleta, reacción con nitrato de plata y azul de bromofenol, ensayo de Folin y ensayo de acetato de mercurio y difenilcarbazona.

- Volumen de muestra: se aplican 2 μl de muestra y de estándar.

Se recomienda utilizar cuatro reveladores diferentes porque pueden obtenerse resultados positivos en algunos casos y negativos en otros. Si con todos los métodos de revelado el resultado es negativo puede concluirse que la miel es de flores, un resultado positivo en alguno de los ensayos es indicativo de miel de mielada. Si se presenta este caso, antes de arribar a una conclusión definitiva debe realizarse un ensayo confirmatorio.

El revelado consiste en lo siguiente: en el primer caso se observa el cromatograma bajo una lámpara de luz ultravioleta y se comparan las manchas oscuras. En el segundo caso se prepara una solución de $AgNO_3$ 0,5% en alcohol etílico y otra de azul de bromofenol 0,2% más 0,15% de $AgNO_3$ en alcohol etílico / acetato de etilo (1:1) Se aplica la primera solución y se seca a 100 ºC (212 ºF) durante 5 minutos, luego la segunda y después de un secado de 10 minutos se analizan las manchas (Kirchner, 1978)

El reactivo de Folin se prepara disolviendo 0,2 gramos de β-naftoquinona-4-sulfonato de sodio en 100 ml de solución de Na_2CO_3 5%. Antes de ser usado debe dejarse en reposo de 10 a 18 minutos. Se aplica sobre la placa por aspersión luego de colocar una solución al 12% de NaCN (Stahl, 1965)

El reactivo de mercurio se prepara disolviendo 14 gramos de acetato de mercurio en 250 ml de alcohol metílico, 2,5 ml de agua y 1 ml de ácido acético glacial. Se aplica sobre la placa por aspersión y a continuación se coloca una solución 0,1% de difenilcarbazona en alcohol etílico 95%. Se observan manchas violetas sobre un fondo rosado (Randerath, 1974)

Actividad Diastásica (α-amilasa)

La α-amilasa, conocida como diastasa, no es importante desde el punto de vista nutricional por esta razón la determinación de la actividad enzimática se realiza como un parámetro de calidad del producto.

Mieles sobrecalentadas o almacenadas durante largos períodos en condiciones no apropiadas presentan valores bajos de actividad enzimática, de esto se desprende la importancia de esta determinación. La utilidad de este ensayo como una medida de la calidad de la miel se cuestiona dada la extrema variación natural que presenta (White, Nov/1992)

La actividad de la diastasa debe cuantificarse para corroborar la calidad de la miel de acuerdo con las exigencias de la legislación vigente y para ello se cuenta con distintos métodos.

Es posible realizar un ensayo cualitativo que permite comprobar si el alimento posee actividad diastásica.

Para ello se toman 10 ml de una solución acuosa de miel preparada mezclando 1 parte de miel en 2 partes de agua destilada y se transfieren a un tubo de ensayo. Luego de agregar 1 ml de solución de almidón soluble (1g%) se incuba durante 1 hora a 45 ºC (113 ºF), se agrega 1 ml de solución de yodo (1g de I_2 - 2g de KI y agua destilada hasta completar 300 ml) y se compara la coloración de la mezcla frente a un blanco preparado de la misma manera pero sin calentar.
Si la muestra posee actividad diastásica presentará una coloración verde-oliva o castaño mientras que, en ausencia de enzima (miel adulterada o sobrecalentada) aparecerá coloración azul debido a que el almidón no pudo ser hidrolizado por la ausencia de la enzima (A.O.A.C. 34.106, 1945)

En 1914 Gothe propuso un método para medir la cantidad de diastasa en miel como un índice de calidad.
Era un método colorimétrico basado en la degradación de una solución de almidón por la acción de la amilasa presente en una solución de miel. La reacción debía realizarse bajo condiciones estandarizadas porque el punto final era un valor que se establecía arbitrariamente. Los resultados se expresaban en unidades de Gothe.
Este método fue utilizado durante muchos años para medir la actividad diastásica de la miel pero tenía varias limitaciones. Era una determinación con una serie de pasos, no proporcionaba una escala continua de valores de diastasa y la reproducibilidad de los resultados era baja.
Fue modificado y tomado como base para otros métodos que se desarrollaron posteriormente.

Entre los métodos cuantitativos para la determinación de la actividad de esta enzima pueden utilizarse indistintamente los métodos de Schade y de Phadebas.
La A.O.A.C. adoptó en 1977 como método oficial el método de Schade y otros (1958) modificado por White y otros (1959) y por Hardon (1961) Fue desarrollado en 1910 por Auzinger, hecho que demuestra la larga data de esta determinación (A.O.A.C., 958.09, 1995)
La legislación MERCOSUR lo adopta como método de referencia al igual que la Norma Codex sobre miel.

El valor mínimo establecido a nivel mundial para este parámetro es de 8 unidades Schade exceptuando las mieles que naturalmente poseen un contenido enzimático bajo, como la miel de citrus en cuyo caso se acepta un mínimo de 3 unidades Schade. En la Norma Codex revisada se adoptó este parámetro como un factor de calidad adicional.

Método de Schade

Este método (White, 1959) consiste en incubar una solución de miel, fuente de α-amilasa, en presencia de almidón como sustrato y en condiciones perfectamente estandarizadas. El punto final se establece en forma arbitraria y se determina espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de una solución de yodo que reacciona con el almidón remanente. A lo largo del tiempo la absorbancia va disminuyendo como consecuencia de la pérdida de almidón debido a la actividad de la enzima.
El método no proporciona valores absolutos porque la determinación del valor de diastasa es empírico ya que el punto final está definido arbitrariamente.

Los resultados se expresan como los mililitros de solución 1% de almidón que son hidrolizados por la enzima contenida en 1 gramo de miel, en 1 hora a 40 °C. Este índice de diastasa corresponde al índice de la escala de Gothe.

Se prepara una solución de miel de 20 g%, sin calentar, en buffer acetato, pH 5,3 y se lleva a volumen en un matraz que contiene solución de cloruro de sodio 0,5 M. No debe agregarse el cloruro de sodio antes que la miel haya sido disuelta en el buffer porque la actividad diastásica se pierde rápidamente a valores de pH inferiores a 3,9 – 4,0 en presencia de cloruro de sodio.

Antes de comenzar el ensayo es necesario determinar la dilución a la cual la muestra, a tiempo cero, entra dentro de un rango medible en el espectrofotómetro. Este procedimiento se conoce como "determinación del índice de azul del almidón" o "estandarización".

Para conocer el índice de azul del almidón se agregan 5 ml de una solución de almidón de 2 g% a 10 ml de solución de yodo diluida con la cual se va a determinar la actividad enzimática. Luego de diluir con agua destilada se lee la absorbancia a 660 nm. Se ensayan distintas diluciones hasta que la lectura sea igual a 0,760 ± 0,02. El valor del volumen de dilución depende del almidón utilizado por lo tanto es necesario repetir la estandarización cada vez que se cambie de almidón.

Luego de incubar separadamente 10 ml de muestra y 5 ml de la solución de almidón (sustrato de la amilasa) a 40 ± 2 °C (104 ± 2 °F) durante 15 minutos, se mezclan dando lugar a la hidrólisis enzimática, a los 5 minutos se toma una alícuota de 1 ml de la mezcla de reacción y rápidamente se agrega a 10,00 ml de solución diluida de I_2 (0,0007 N) después de adicionar la cantidad de agua destilada necesaria para alcanzar el volumen de dilución hallado en la estandarización se mide la absorbancia a 660 nm.

El I_2 produce una coloración azul con el remanente de almidón no hidrolizado. Se asume que la hidrólisis finaliza cuando la mezcla miel-almidón entra en contacto con el I_2 (Schade, 1958)

Se toman alícuotas de 1 ml, a intervalos regulares de tiempo, hasta alcanzar un valor de absorbancia menor de 0,235. Se grafican los valores de absorbancia vs. tiempo obteniéndose una recta a partir de la cual se determina por extrapolación el tiempo necesario para que la mezcla de reacción alcance un valor de absorbancia de 0,235.

En el método original de Schade la concentración de la solución de yodo era menor, fue modificada para que los valores obtenidos estuviesen correlacionados con los encontrados por el método de Gothe.

El tiempo necesario para alcanzar el punto final, bajo condiciones estándar es inversamente proporcional a la concentración de enzima por eso la disminución del color que ocurre a través del tiempo es una medida de la actividad de la enzima de la muestra, se expresa como “número de diastasa, ND”.

Un analista experimentado puede estimar, luego de la primera lectura espectrofotométrica, cual será el tiempo aproximado que se requerirá para alcanzar el punto final y cuales serán los intervalos de tiempo adecuados para tomar las muestras. Por ejemplo, si luego de 5 minutos de incubación de la mezcla miel-almidón la lectura es cercana a 0,235 la muestra posee alta actividad enzimática, frente a esta situación se recomienda repetir el ensayo tomando alícuotas cada minuto a partir del momento de la mezcla. En caso contrario, si la absorbancia es cercana a 0,760 la miel posee baja concentración de enzima lo que permitirá tomar alícuotas a intervalos de tiempo mucho mayores. Con los datos de absorbancia medidos a los 5 y 10

minutos de incubación es posible predecir aproximadamente el tiempo al cual se alcanzará el punto final, se recomienda tomar la muestra a ese tiempo.

La actividad diastásica, número de diastasa en unidades Schade, se define como la actividad enzimática de 1 gramo de miel que puede hidrolizar 0,01 gramos de almidón en 1 hora a 40 °C (104 ºF) Los resultados se expresan en unidades / gramo de miel. Mientras que en la mezcla de reacción 0,1 gramos de almidón son convertidos por 2,0 gramos de miel, las unidades / gramo de miel equivalen a 300 dividido el tiempo hallado experimentalmente (Schade, 1958)

$$\text{Unidades / gramo} = \frac{1{,}0 \times m_a \times 60}{2{,}0 \times m \times t} = \frac{300}{t}$$

m_a masa de almidón que es convertida por 2,0 gramos de miel igual a 0,1 gramos, en gramos.

m masa de almidón que es convertida por 1,0 gramo de miel igual a 0,01 gramos, en gramos.

t tiempo requerido para alcanzar una absorbancia igual a 0,235, en minutos.

60 factor de conversión de horas a minutos.

Este método es más objetivo, reproducible y preciso que el de Gothe modificado ya que proporciona una escala continua de valores de actividad diastásica siendo de gran utilidad en análisis de rutina. Es más rápido porque utiliza una única dilución de la muestra, otros métodos emplean una serie de diluciones y requieren de un ensayo preliminar para determinar el rango de trabajo apropiado lo que demanda más tiempo.
Debe tenerse en cuenta que la concentración de azúcares influye sobre la actividad diastásica, por esta razón es recomendable trabajar bajo condiciones de concentración de azúcares constante, esta condición no es aplicable en métodos tales como el de Gothe.

El método para la determinación de este parámetro de acuerdo con la Norma DIN 10751 posee algunas diferencias con respecto al anterior:

- Los valores de absorbancia se corrigen por el blanco de reactivos (tratado de igual forma que la muestra pero sin agregar el almidón) El método de Schade considera que la contribución al color del I_2 y de la miel es despreciable a las diluciones de trabajo.
- El ND se determina sobre la base del cálculo del tiempo requerido para alcanzar una absorbancia igual a 0,301.
- La concentración de la solución de yodo es diferente.

En la legislación MERCOSUR e internacionalmente se acepta un ND mínimo igual a 8, en general los valores son mayores y muy dependientes del origen de la miel. En el momento de evaluar los resultados debe tenerse en cuenta que existen mieles monoflorales que poseen, naturalmente, valores muy bajos de actividad diastásica como ocurre con la miel de *Citrus spp.*, Para contemplar casos como este se estableció un límite igual a 3.

En la Tabla Nº 14 del capítulo III se presentan los valores de actividad diastásica encontrados en mieles argentinas. El valor promedio de 72 determinaciones fue igual a 11,4 unidades /

gramo y el valor máximo encontrado igual a 18,5 unidades / gramo siendo muy superior al valor mínimo establecido en la legislación.
En mieles provenientes de Brasil también se han encontrado valores altos de actividad diastásica.

Método Phadebas

Este método se basa en la determinación espectrofotométrica a 620 nm de los productos de hidrólisis, teñidos de color azul, resultantes de la acción de la α-amilasa sobre un tipo de almidón entrecruzado soluble. La absorbancia de la solución es directamente proporcional a la actividad diastásica de la muestra (Bogdanov, 1997)

Se prepara una solución de miel de 1 g%, sin calentar, en buffer acetato 0,1 M, pH 5,2. El procedimiento debe completarse dentro de la hora. Se incuban 5,0 ml de la solución de muestra y 5,0 ml del buffer (blanco) separadamente a 40 °C (104 ºF) Con la ayuda de una pinza se agrega a cada uno una pastilla Phadebas y luego de disolverlas totalmente se incuban nuevamente a 40 °C (104 ºF), exactamente a los 15 minutos se interrumpe la reacción por agregado de 1 ml de solución de NaOH 0,5 M, luego de filtrar se lee la absorbancia a 620 nm contra el blanco.
Si la absorbancia es superior a 1,0 debe diluirse la muestra con agua destilada.

El número de diastasa (ND) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$ND = 28,2 \times A_{620} + 2,64$$

A_{620} absorbancia de la muestra medida contra el blanco.

28,2 y 2,64 pendiente y ordenada al origen determinadas experimentalmente.

La correlación entre los resultados obtenidos mediante este método y el método de Schade es muy buena.

El método Phadebas fue adoptado en la Norma Codex Revisada para la Miel como alternativo para la determinación de la actividad diastásica.

Actividad de Invertasa (α-Glucosidasa, Sucrasa)

Esta determinación tiene por finalidad la detección del tratamiento de pasteurización en la miel. También podría determinarse su actividad como un índice de calidad ya que su concentración disminuye con el almacenamiento y el sobrecalentamiento.
La actividad de esta enzima es más sensible que la diastasa a la acción del calor y al efecto del almacenamiento, al igual que ella presenta una gran variación natural.

La unidad de invertasa se define como el número de micromoles de sustrato hidrolizados por minuto y expresados por kilogramo de miel. La actividad de la enzima también puede expresarse como el número de invertasa.

Para miel fresca, sin calentar, se ha sugerido que el número de invertasa (NI) debe ser mayor de 10 y para aquellas mieles que naturalmente poseen un bajo contenido de enzima mayor de 4 (Duisberg, 1996)

Esta enzima es responsable de la producción de oligosacáridos, su actividad se valora a través de la producción de p-nitrofenol proveniente de su acción sobre un sustrato apropiado, p-nitrofenil-α-D-glucopiranósido (α-PNPG), en condiciones óptimas de pH y temperatura.

Para su valoración se prepara una solución de miel, sin calentar, a partir de 5 gramos de muestra en buffer fosfato 0,1 M, pH 6,0 y se guarda 1 día en la heladera. Se incuba el sustrato (solución de α-PNPG 0,02 M en buffer fosfato 0,1 M) a 40 ºC (104 ºF) durante 5 minutos en dos tubos de ensayo con tapón, al cabo de los cuales se agrega la solución en ensayo y en uno de ellos (blanco) buffer Tris - (hidroximetil) – aminometano 3M, pH 9,5 que modifica el pH de la solución inhibiendo la acción de la enzima. Se incuba nuevamente a 40 ºC (104 ºF) durante 20 minutos y a continuación se detiene la reacción por agregado del buffer Tris- (hidroximetil) – aminometano y se mide la absorbancia de la muestra y del blanco frente a agua destilada a 400 nm. Se recomienda realizar la determinación por duplicado (Siegenthaler, 1977)

El blanco debe prepararse para cada muestra. La cantidad de p-nitrofenol producida corresponde exactamente a la cantidad de sustrato utilizado.

La actividad de invertasa se calcula a partir de la absorbancia medida, en unidades Siegenthaler (μmol de p-NPG / minuto) utilizando la siguiente fórmula.

$$1\ U / kg = \frac{1\ \mu mol\ p\text{-}NPG}{minutos \times kg\ miel}$$

$$U / kg = 6 \times 0{,}05 \times 0{,}05298 \times 10^4 \times A_{400} =$$

$$= A_{400} \times 158{,}94$$

$$A_{400} = A_M - A_B$$

6 volumen de muestra utilizado.

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

0,05298 factor de conversión de μg de p-nitrofenol en μM/ml.

10^4 factor de conversión de 0,1 gramos de miel a kilogramos.

A_M absorbancia de la muestra.

A_B absorbancia del blanco.

La actividad enzimática también puede expresarse en unidades Gontarski. Esta unidad se define como los gramos de sacarosa hidrolizada en 1 hora por la enzima contenida en 100 gramos de miel bajo las condiciones del ensayo.

La relación entre ambas unidades está dada por la siguiente fórmula:

$$US = 11,9 + 3,6 \times SZ\ Gontarski$$

US unidades Siegenthaler.

SZ masa de sacarosa hidrolizada en 1 hora por 100 gramos de miel, en gramos.

Si el NI se determina simultáneamente por este método y por el método polarimétrico es posible establecer la siguiente relación entre el NI y la A_{400}.

$$NI = 21,64 \times A_{400}$$

21,64 pendiente de la recta.

Actividad de Glucosa-Oxidasa

Al igual que la determinación de la actividad de la invertasa, la valoración de la actividad de la glucosa-oxidasa permite comprobar si la miel fue pasteurizada.

En solución acuosa y en presencia de oxígeno la glucosa se transforma en ácido glucónico y agua oxigenada por acción enzimática.

La glucosa-oxidasa es la enzima responsable de la producción de agua oxigenada, su actividad se determina en función de la cantidad de peróxido de hidrógeno acumulado, el cual se valora por medio de la enzima peroxidasa utilizando o-dianisidina como indicador redox. Por acción de la peroxidasa el peróxido de hidrógeno se descompone en agua y oxígeno, el que produce una variación en el potencial redox de la solución, como consecuencia el indicador se oxida pasando a su forma coloreada, violeta.

Se parte de aproximadamente 10 gramos de miel y se disuelve, sin calentar, en buffer fosfato 0,01 M, pH 6,5 la cual se incuba durante 1 hora a 37 ºC (98,6 ºF) protegiéndola de la luz y con agitación. Una vez finalizada la incubación se toma una porción y se vierte sobre una solución de o-dianisidina, se recomienda trabajar por duplicado. Paralelamente se realiza un ensayo en blanco reemplazando la o-dianisidina por agua destilada. Al cabo de 10 minutos, a partir del momento del agregado de una solución de peroxidasa, se lee la absorbancia de la solución a 450 nm.

Debe realizarse, en paralelo, una curva de calibración con soluciones estándar de agua oxigenada de concentraciones comprendidas entre 23,1 mg% y 3,3 mg% preparadas a partir de una solución de 33 g%. Por extrapolación de esta curva se calcula la concentración de peróxido de hidrógeno y a partir de él la actividad de la enzima (White, 1963)

El resultado se expresa en microgramos de peróxido de hidrógeno acumulado por hora y por gramo de miel.

$$\mu g\ H_2O_2 / gramo = \frac{m_p \times 25}{m \times t}$$

m_p masa de H_2O_2 obtenida a partir de la curva de calibración, en microgramos.

25 factor de dilución.

m masa de miel, en gramos.

t tiempo de incubación, l hora.

La legislación actual no contempla límites para la actividad de la esta enzima ni de la invertasa.

- **HIDROXIMETILFURFURAL**

El contenido de HMF, junto con otros parámetros físico-químicos ayuda a concluir si una miel ha sido mal procesada (sobrecalentada) o adulterada.

El Reglamento Técnico MERCOSUR para la Miel actualizado (Resolución GMC 89/99) acepta un máximo de 60 mg/kg de HMF.
La Norma Codex Revisada para la Miel considera el contenido de HMF como un factor adicional de composición y calidad y establece un límite de 40 mg/kg para el producto luego de su procesamiento y/o mezclado. En el caso de mieles provenientes de países o regiones de clima tropical el contenido de HMF puede llegar a 80 mg/kg.

A lo largo del tiempo han sido desarrollados diversos métodos cualitativos que permiten detectan la presencia de hidroximetilfurfural, con el objeto de diferenciar mieles genuinas de mieles alteradas. Los pioneros en este tema fueron Fiehé en 1908 y Feder en 1911 quienes buscaban métodos visuales que permitieran diferenciar miel genuina de miel artificial. Durante mucho tiempo algunas mieles fueron clasificadas como adulteradas porque presentaban resultado positivo frente a estos ensayos, cuando en realidad eran mieles calentadas con alto contenido de HMF.
Con el tiempo algunos investigadores propusieron modificaciones que tendían a aumentar la confiabilidad de estos métodos pero, actualmente los únicos que aún se utilizan son los citados anteriormente y que se describen a continuación. Son útiles para orientar sobre el contenido de HMF del producto y es posible, en una primera aproximación, comprobar si el contenido de HMF de la muestra sobrepasa los límites permitidos.

Métodos Cualitativos

- **Método de Fiehé**

Es una determinación colorimétrica visual del complejo coloreado que forma el HMF con el resorcinol en medio clorhídrico (Gautier, 1961)

Para llevar a cabo el ensayo se transfieren 10 ml de una solución de miel de 50 g% a un tubo con tapa y se agregan 5 ml de éter etílico (libre de peróxidos) se agita y deja en reposo hasta que ambas fases se separen. Se toman 2 ml de la fase orgánica y se colocan en un tubo de

ensayo, se agregan 2 gotas de solución de resorcinol (1 gramo en 100 ml de HCl d=1,19) recién preparada.
Luego de agitar enérgicamente se observa el color, en presencia de HMF la solución se torna color rojo cereza dentro del minuto. Coloraciones amarillas o salmón no deben tenerse en cuenta. Es aconsejable realizar paralelamente un blanco de reactivos.

Las concentraciones mínimas de HMF que pueden detectarse oscilan entre 7 y 9 mg/kg (Schade, 1958) Esta reacción da resultado positivo en aquellos casos en los cuales el producto está adulterado con jarabe de azúcar invertido o con jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis ácida (CAC/RS, 1969)
Los resultados dependen de la experiencia y prudencia del analista.
Gothe sugirió que este ensayo debería usarse juntamente con el ensayo de diastasa para juzgar si una miel de baja actividad diastásica podía ser considerada alterada.

- **Método de Feder**

La anilina en medio clorhídrico da una coloración roja en presencia de furfural o de derivados tales como HMF.

El ensayo consiste en mezclar 5 gramos de miel con 2,5 ml del reactivo de Feder (10 ml de anilina redestilada en 3 ml de HCl 25%) en una cápsula de porcelana. Si la muestra contiene HMF aparece inmediatamente una coloración roja que persiste por 15 minutos. Coloraciones amarillas o salmón no deben tenerse en cuenta al igual que la aparición de un color rosado que persista sólo de 1 a 2 minutos. Es aconsejable realizar un blanco de reactivos (Gautier, 1961)

Métodos Cuantitativos

El analista dispone de diferentes métodos para la cuantificación del HMF. En algunos casos la fructosa que, invariablemente está presente y es extraída juntamente con el HMF representa una importante interferencia porque forma cromógenos con resorcinol, anilina y p-toluidina-ácido barbitúrico, reactivos utilizados en las distintas determinaciones. Para sortear este inconveniente Dhar y Roy propusieron realizar una separación y clean-up del HMF por adsorción en columna.

El método consiste en pasar 2 gramos de miel, disueltos en agua destilada, a través de una columna de carbón activado y eluir los azúcares adsorbidos con 100 ml de agua destilada.
El HMF que queda retenido en la columna se eluye con 150 ml de acetona (libre de aldehídos) y luego de evaporar el solvente se disuelve en agua destilada y se determina por cualquiera de los métodos disponibles (Dhar, 1972)

- **Método de Winkler** (Winkler, 1955)

Se basa en la medición espectrofotométrica del complejo coloreado que forma el HMF con el ácido barbitúrico y la o-toluidina.

Se parte de 10 gramos de muestra, se disuelve en 20 ml de agua, sin calentar, si presenta turbidez se clarifica con solución Carrez I (15 gramos de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ en 100 ml de agua

destilada) y solución Carrez II (30 gramos de $Zn(OAc)_2.2H_2O$ en 100 ml de agua destilada) antes de llevar a volumen (50ml)
Luego de filtrar se coloca una alícuota de la solución de la muestra y de solución de o-toluidina en isopropanol en dos tubos de ensayo, en uno de ellos se agrega agua destilada (referencia) y en el otro una solución de ácido barbitúrico. Luego de 3 a 4 minutos se mide la absorbancia a 550 nm contra la solución de referencia.

Los resultados se expresan en mg de HMF / kilogramo de miel con la ayuda de la fórmula siguiente:

$$HMF = \frac{1920\ A_{550}}{m}$$

m masa de muestra, en gramos.

A_{550} absorbancia de la muestra medida contra la referencia.

1920 factor que contempla la dilución y el valor de la extinción molecular del HMF.

Frente a otros métodos esta determinación presenta una serie de desventajas:

- Requiere p-toluidina, reactivo cancerígeno, tóxico por inhalación, absorción cutánea e ingestión, es peligroso por su efecto acumulativo.
- El desarrollo del color que se obtiene es inestable y depende de la temperatura (White, 1979)
- Si se analizan soluciones no clarificadas los resultados son altos (Schade, 1958)
- La fructosa interfiere pues forma cromógenos, lo que conduce a obtener resultados más altos.
- En presencia de SO_2 libre se obtienen valores bajos porque se forman compuestos de adición con los grupos SH^-. A valores mayores de 10 mg/l la interferencia es seria (Dhar, 1972)

- **Método de White**

Consiste en una medición espectrofotométrica al UV de una solución acuosa clarificada de miel contra una solución de referencia de la misma muestra en la cual se ha destruido, por agregado de bisulfito de sodio, el cromóforo de HMF que absorbe a 284 nm (White, 1979)

No es posible determinar el HMF midiendo directamente la absorbancia de una solución acuosa de miel porque existen sustancias propias de la miel y generadas durante el calentamiento que interfieren en el análisis.

La banda de absorción del HMF está comprendida entre 250 y 330 nm con su máximo en 284 nm.

Esta determinación posee la precisión de los métodos ópticos y la exactitud de las determinaciones químicas, sin sus deficiencias. Se trabaja con una solución de miel, no es necesario extraer el HMF con solvente como ocurre con otros métodos.

Se prepara una solución partiendo de 5 gramos de miel, clarificada por agregado de 0,5 ml de solución Carrez I (15 gramos de $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ en 100 ml de agua destilada) y 0,5 ml de solución Carrez II (30 gramos de $Zn(OAc)_2.2H_2O$ en 100 ml de agua destilada) y llevada a 50 ml con agua.
Se toman 5,0 ml de la solución de la muestra previamente filtrada en dos tubos de ensayo, en uno de ellos se agregan 5,0 ml de agua destilada (muestra) y en el otro 5,0 ml de una solución de bisulfito de sodio 0,2 g% (referencia) Se mide la absorbancia de la muestra contra la solución de referencia a 284 nm y a 336 nm.

Si la concentración de HMF es alta el valor de la absorbancia medida será mayor de 0,6; en este caso se recomienda diluir la muestra con agua destilada y la solución de referencia en la misma proporción con una solución de bisulfito de sodio 0,1 g%. Debe tenerse en cuenta esta dilución en el momento de realizar los cálculos.

Se asume que el $NaHSO_3$ elimina completamente el compuesto que absorbe a 284 nm aunque en la práctica no es estrictamente así, queda aproximadamente un 5,7% sin destruir. Además la absorbancia de las soluciones acuosas de $NaHSO_3$ al 0,1% es despreciable a 336 nm pero a 284 nm es de aproximadamente 0,014.

El contenido de HMF se calcula en miligramos / 1000 gramos de miel de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$HMF = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149{,}7 \times m_N \times V_N}{m \times V_m}$$

$$HMF = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149{,}7 \times 5}{m}$$

A_{336} absorbancia no específica de la muestra medida contra la referencia.

A_{284} absorbancia de la muestra medida contra la referencia.

m masa de muestra, en gramos.

m_N masa nominal de muestra, igual a 5 gramos

V_N volumen nominal de la solución de medición, igual a 10 ml.

V_m volumen de la solución de medición, en mililitros.

El factor 149,7 fue calculado sobre la base de la siguiente fórmula:

$$149{,}7 = \frac{126 \text{ g/mol} \times 1000 \text{ mg/kg} \times 1000 \text{ g de miel}}{16830 \text{ l/mol} \times 10 \text{ cl/l} \times m_m}$$

126 Peso Molecular del HMF.

16830 Absortividad Molar del HMF a 284 nm.

m_m masa nominal de muestra, igual a 5 gramos.

La recuperación es de 95 a 100%.

Este método fue adoptado en 1983 por la A.O.A.C. como método oficial para la determinación del contenido de HMF en la miel (A.O.A.C. 980.23, 1995)
El Reglamento Técnico MERCOSUR para la Miel lo adopta como método de referencia.
La Norma Codex Revisada para la Miel acepta este método para la determinación del contenido de HMF en la miel.

- **Método de Schade**

Es una modificación del ensayo de Fiehé. El HMF se extrae con éter, en mortero. Se evapora el solvente y el residuo se disuelve en agua.
Se mide el complejo coloreado que se forma por reacción del HMF con resorcinol en medio clorhídrico determinando la absorbancia a 490 nm. Debe realizarse una curva de calibración con un estándar de HMF, la ley de Beer se cumple al menos hasta concentraciones de HMF de 175 μg/ml (Schade, 1958)

Este método no es el más recomendable porque:

- Los resultados son variables debido a que la extracción con éter no es completa, ejerce una gran influencia el contenido de agua de la muestra, cuanto mayor es el contenido de agua de la miel más se dificulta la extracción (Dhar, 1972)
- Interfiere la fructosa.
- Al manipular el HMF se debe poner especial atención, evitar el contacto con los ojos y con la piel y protegerlo de la luz y el aire debido a su inestabilidad.

- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

Mediante este método es posible cuantificar el HMF contenido en una solución acuosa clarificada de miel (Codex, 2000)
Se prepara una solución acuosa de miel de 2 g% con excepción de aquellos casos en los cuales el contenido de HMF sea muy alto, de presentarse esta situación la muestra debe diluirse. Antes de su inyección en el equipo se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 a 0,45 μ de diámetro de poro.

Las condiciones, bajo las cuales se recomienda trabajar son las siguientes:

- Columna: las características de esta columna fueron explicadas en la sección correspondiente a la determinación de carbohidratos por Cromatografía Líquida. En el caso particular del HMF el sustituyente en la columna es un grupo C_{18}.

- Solvente: mezcla de agua / metanol (90:10)

- Detector: ultravioleta, la lectura se realiza a 285 nm.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra. En caso contrario el contenido de HMF se calcula comparando el área o la altura del pico de la muestra con la correspondiente área o la altura del patrón y el cálculo se realiza como se explicó en la sección correspondiente a la determinación de carbohidratos por Cromatografía Líquida teniendo en cuenta la dilución realizada.

- Otros parámetros:
  a) El flujo de trabajo recomendado es de 1 ml/min.
  b) La temperatura óptima de trabajo varía entre 25 y 30 °C (77 y 86 ºF)
  c) Se trabaja con patrón externo. La curva de calibración se prepara con soluciones acuosas estándar de 1, 2, 5 y 10 μg/ml.
  d) El volumen de inyección es de 20 μl.

Los resultados se expresan en miligramos de HMF / 1000 gramos de miel.

Las soluciones estándar se preparan a partir de una solución madre preparada disolviendo en agua 100,0 miligramos de HMF y diluida a 1 litro. Debe prepararse en el momento de uso y el estándar conservarlo al abrigo de la humedad ya que es extremadamente higroscópico.

Para conocer exactamente la concentración de las soluciones estándar se determina la absorbancia de cada una de ellas con un espectrofotómetro UV, a 285 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los cálculos se realizan con la siguiente fórmula y se expresan en miligramos / litro.

$$HMF = \frac{A_{285} \times 1000}{133,57}$$

A_{285} absorbancia de la solución estándar.

El factor 133,57 l/g fue calculado sobre la base de la siguiente fórmula:

$$133,57 = \frac{\text{Absortividad Molar}}{\text{PM HMF}} = \frac{16830 \text{ l/mol}}{126 \text{g/mol}}$$

A concentraciones de HMF cercanas a 5 mg/kg los valores son comparables con los obtenidos utilizando el método de White pero menores que los obtenidos por el método de Winkler. A niveles comprendidos entre 20 mg/kg y 40 mg/kg los datos obtenidos mediante el método de White y el de Winkler no difieren significativamente entre sí.

El furfural que acompaña a este compuesto se puede separar y cuantificar por este método a pesar de encontrarse en cantidades mucho menores, en las condiciones cromatográficas anteriormente expuestas eluye aproximadamente 3 minutos después del HMF.
Si se desea cuantificar este compuesto en la preparación de la solución madre se agregan 100,0 miligramos de furfural.

El coeficiente de correlación encontrado fue de 0,9998 para el HMF y el porcentaje de recuperación de 95 a 100%.

Este método también fue adoptado para la determinación del contenido de HMF en miel por el Codex Alimentarius en la última revisión de la Norma para la Miel, está basado en el método desarrollado por Jeuring y Kuppers (Jeuring, 1980)

- **INHIBINA**

La técnica para la determinación de la inhibina es un método microbiológico. Es una modificación del procedimiento propuesto por Dold y Witzenhausen (Schade, 1958)

Se preparan 5 placas de Petri de agar nutritivo con cantidades crecientes de miel, desde 4,5 g% hasta 21,3 g%, partiendo de una solución de muestra inicial de 25 g%, preparada en condiciones estériles.
Se preparan las mezclas de agar-miel agregando las respectivas diluciones de la muestra, precalentadas a no más de 40 °C (104 ºF), al medio de cultivo fundido y enfriado a 50 °C (122 ºF) Las placas se numeran como la inversa de la dilución de muestra que contienen y se inoculan en el centro con *Staphylococcus aureus*, a continuación se incuban a 20 °C (68 ºF) durante 20-24 horas.

El valor de inhibina se determina a partir de la placa con la menor concentración de miel que inhibe el crecimiento bacteriano. Se le asigna arbitrariamente el valor de la concentración de miel. Si la inhibición no es completa y sólo se observan trazas de crecimiento el valor de inhibina se estima como menor que el valor de la placa que muestra ese crecimiento leve.

- **FLAVONOIDES**

El método para la determinación de estos compuestos es cualitativo (Stahl, 1965), consiste en separar los diferentes flavonoides mediante soluciones alcohólicas de metanol o etanol y posterior purificación para eliminar sustancias que interfieren, como derivados cumarínicos.

Los pasos de purificación consisten en una primera extracción con una mezcla de solventes donde se eliminan los di y triglicósidos en la fase acuosa.

En la fase orgánica se extraen monoglicósidos y agliconas que también interfieren lo que obliga a aplicar un paso posterior de purificación, este puede consistir en reacciones de precipitación con acetato de plomo básico o neutro o Cromatografía en Columna de poliacrilamida.

Se recomienda la Cromatografía en Columna porque las *flavonas* pueden separarse de las *flavononas*, como así también fenoles de sus derivados. Los grupos amido de la poliamida son capaces de retener los grupos hidroxifenólicos debido a que forman uniones hidrógeno con esos grupos. Retiene compuestos de acuerdo con el número de grupos OH^- pero los o-difenoles son absorbidos como monofenoles. Si se elige el solvente adecuado que reemplace los grupos retenidos se pueden eluir los compuestos.

El orden creciente de efecto eluyente es: agua - alcohol - metanol - acetona - soluciones alcalinas diluidas - formamida - dimetilformamida.

Cromatografía en Capa Fina

Se extrae durante 24 horas 1 gramo de miel con 10 ml de alcohol metílico, luego de evaporar el solvente hasta casi sequedad se diluye el residuo con agua y a continuación se extraen los flavonoides con una mezcla de acetato de etilo / metanol (95:5)

A los fines comparativos se recomienda trabajar paralelamente con una miel testigo.

Las condiciones cromatográficas son las que a continuación se detallan:

- Soporte: placa de gel de sílica preparadas en el laboratorio o comerciales, cromatofolios.
- Solvente: puede utilizarse mezcla de benceno / alcohol etílico (92:8) o benceno / acetato de etilo (75:25)
- Revelador: se observan las manchas con luz ultravioleta de onda corta, se marcan los contornos con un lápiz y la placa se somete a la acción de vapores de amoníaco o solución de KOH 1% en etanol (Stahl, 1965)
- Volumen de muestra: se aplican 2 μl de muestra y de estándar.

Se comparan los resultados con la miel utilizada como referencia, se observan manchas amarillas de *flavonas, flavonoles* y *flavonol-glicósidos*, las *flavonas* son incoloras pero si se observan a la luz UV son amarillas.

- **COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES**

El análisis de estos compuestos se lleva a cabo utilizando una técnica que permite capturar los productos volátiles en una resina adsorbente y posteriormente se analizan por Cromatografía Gas-Líquido con desorción térmica y detector de masa (TD-GC-MS), la utilización de la Espectrometría de Masa facilita la identificación de los distintos compuestos (Santforn, 1999)

Se parte de una masa de miel comprendida entre 5 y 7 gramos y se calienta a 60 ºC (140 ºF)

Existen otros métodos menos sensibles como la Cromatografía Gas-Líquido con “headspace” estático.

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. Official and Tentative Methods of Analysis, 6th Ed (1945) Qualitative Tests for Proteins - Official Biuret Test. *Washington, DC. Sec. 27.11. Chap. 27, pp. 405.*

A.O.A.C. Official and Tentative Methods of Analysis, 6th Ed (1945) Diastase - Tentative. *Washington, DC. Sec. 34.106. Chap. 34, pp. 585.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 10th Ed (1965) *Washington, DC. Sec. 43.005. Chap.43.*

A.O.A.C. Dextrin (approximate) - Procedure. 13th Ed (1980) *Washington, DC. Sec. 31.122, Chap.31, pp. 522.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13th Ed (1980) Official Method 900.02D. Soluble and Insoluble Ash. *Washington, DC. Sec. 31.015, pp. 508.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13th Ed (1980) Official Method 900.02E. Alkalinity of Soluble Ash. *Washington, DC. Sec. 31.016, pp. 508.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 960.04. Biuret in Fertilizers. Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap. 2, pp. 22-23.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 920.180. Honey (Liquid, Strained, or Comb) Preparation Sample. *Washington, DC. Sec. 44.4.01, Chap. 44, pp. 20.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 920.181A. Ash of Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.05. A. Chap. 44, pp. 21.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 920.182. Polarization (Direct) of Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.08, Chap. 44, pp. 22.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 920.183a. Sugar (Reducing) in Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.09, Chap. 44, pp. 22.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 920.183b. Sugar (Reducing) in Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.00, Chap. 44, pp. 22.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 950.25. Methyl Anthranilate in Nonalcoholic Beverages. Colorimetric Method. *Washington, DC. Sec. 29.1.20. Chap. 29, pp. 5-6.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 954.11. Separation of Sugars in Honey. Charcoal Column Chromatographic Method I. *Washington, DC. Sec. 44.4.11. Chap. 44, pp. 22-24.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 958.09. Diastatic Activity of Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.19. Chap. 44, pp. 30.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 959.11. Glucose in Sugars and Syrups. Shaffer-Somogyi Micro Method. *Washington, DC. Sec. 44.1.23. Chap. 44, pp. 10.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 962.18. Nitrogen in Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.06. Chap. 44, pp. 21.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 962.19. Acidity (Free, Lactone, and Total) of Honey. Titrimetric Method. *Washington, DC. Sec. 44.4.20. Chap. 44, pp. 31.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 969.38A. Moisture in Honey. Direct Drying. *Washington, DC. Sec. 44.4.04. A. Chap. 44, pp. 20-21.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 969.38B. Moisture in Honey. By Means of Refractometer. *Washington, DC. Sec. 44.4.04. B. Chap. 44, pp. 21.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 977.20. Separation of Sugars in Honey. Liquid Chromatographic Method. *Washington, DC. Sec. 44.4.13. Chap. 44, pp. 25.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 979.20. Proline in Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.07. Chap. 44, pp. 21.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 979.21. Separation of Sugars in Honey. Charcoal Column Chromatographic Method II. *Washington, DC. Sec. 44.4.12. Chap. 44, pp. 24-25.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 980.23. Hydroxymethylfurfural in Honey. Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Sec. 44.4.15. Chap. 44, pp. 26.*

A.P.H.A. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd Ed (1984) *Washington, DC. Acrivia. Zaragoza.* Method 17.52, *pp. 134.*

A.P.H.A. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd Ed (1984) *Washington, DC. Acrivia. Zaragoza.* Method 26.12, *pp. 107-112.*

Bogdanov, S., Martin, P. and Lüllmann, C. Harmonized Methods of the European Honey Commission (1997) *Apidologie Extra issue, pp. 1-59.*

C.A.A. Código Alimentario Argentino. Ley Nº 18.284 y su Decreto Reglamentario Nº 2.126/71 (1998) Consulta del 1 de febrero, 2004, *http://www.anmat.gov.ar/codigoa.htm.*

CCA. Comisión del Codex. Alimentarius. Comité sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras. Norma sobre el Examen Microscópico de la Miel (1968) *Codex/Analys/68/10.*

CAC/RS. Codex. Alimentarius Commission. Recommended European Regional Standard for Honey (1969) *12.*

CAC. Comisión del Codex. Alimentarius. Normas del Codex para los Azúcares (Miel) Determinación Gravimétrica del Contenido de Sólidos Insolubles en Agua (1990) *CAC/VOL.II - 1ª ed. Suplemento II.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Recommended Methods of Analysis and Sampling. *Codex Stan 234-1999.*

Codex. Alimentarius Draft Revised for Honey. *CX5/10.2, CL 2000/5-S. April 2000.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Revised Codex Standard for Honey. *Codex Stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev. 2 (2001)*

Conrad, E. and Palmer, J. Rapid Analysis of Carbohydrates by HPLC (October 1976) *Food Technol., pp. 84-89.*

Cowan, A. C. and Mitchell, T. J. An Examination of the Occurrence of Honeydew in Honey, Part III (March 1964) *Analyst, Vol. 89, pp. 223-226.*

Dhar, A. K. and Roy, B. R. Determination of 5-Hydroxymethyl 2-furaldehyde in Honey (December 1972) *Analyst. Vol. 97, pp. 981-985*.

DIN 10751. Deutsches Institut Für Normung. Untersuchung von Honig. Bestimmung der diastase-aktivität (Juli 1992)

DIN 10753. Deutsches Institut Für Normung. Untersuchung von Honig. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit. (Juli 1991)

DIN 10754. Deutsches Institut Für Normung. Untersuchung von Honig. Bestimmung des prolingehaltes von Honig (März 1993)

DIN 10758. Deutsches Institut Für Normung. Untersuchung von Honig. Bestimmung des Gehaltes an den Sacchariden Fructose, Glucose, Sacharose, Turanose und Maltose - HPLC -Verfahren (April 1995)

Duisberg, H. und Hadorn, H. Welche Anforderungen sind an Handelshonige zu stellen (1996) *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 57, pp. 386-407.*

FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 14/8. Food Analysis: Quality, Adulteration and Tests of Identity (*1986) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, pp. 114-117.*

Gautier, MM. J. A., Renault, J. et Julia-Alvarez, Mlle. M. Première partie: Etude Critique des Réactions de Fiehe et de Feder (1961) *Ann. Fals. Exp. Chim., pp. 177-193.*

Hart, F. L. and Johnstone Fisher, H. Análisis Moderno de los Alimentos (1977) *Acribia, Zaragoza. Cap.11, pp. 293-294.*

Horn, H. Intensive Practical Course of Honey Analysis (1996) *Landesanslalt für Bienenkunde. Universität Hohenheim. Stuttgart. Germany.*

ICMSF. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de Análisis Microbiológico (1978) *Volumen I. Método 4. 2da Ed.*

IHC. Harmonized Methods of the International Honey Commission. Introduction and General Comments on the Methods. (2002) Consulta del 6 de julio, 2003, *http://www.apis.admin.ch/english/host/pdf/honey/IHCmethods_e.pdf.*

Jeuring, H.J. and Kuppers, F. J. High Performance Liquid Chromatography of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Spirits and Honey (1980) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.63, N°6, pp. 1215-1218.*

Kirchner, J. G. Techniques of Chemistry. Thin-Layer Chromatography (1978) *John Wiley & sons, Inc., New York. Second Edition. Vol XIV, pp. 240.*

Lindsay, Ch. W. Calculation of Juice Content in a Diluted Fruit Juice Beverage. Technical Communications (1993) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.76, N°2, pp. 424-430.*

Louveaux, J., Maurízio, A. and Vorwhol, G. Methods of Melissopalynology. *International Commission for Bee Botany of IUBS (1978), pp. 139-157.*

Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos Químicos e Físicos para Analíse de Alimentos (1976) *2a ed. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, pp. 125-131.*

Manuel Suisse des Denrées Alimentaires. Substances Aromatizantes. Composés Naturels Divers (Identification et Dosage) (1978) *Office Fedéral des Imprimés et du Matériel, Berne. Cinquiènie édition. Volume deuxième, Chapitrie 43, pp. 249-253.*

Montes, A. L. Bromatología. (1981) *2da ed. EUDEBA, Buenos Aires. Tomo II. Cap. VI, pp. 314-316.*

Pearson, D. The Chemical Analysis of Foods (1976) *7th Ed. Chemical Publishing Co., Inc., New York, pp. 137-142.*

Persano Oddo, L., Piazza, M.G. and Accorti, M. Diagnosis of unifloral Honeys. 1. Present Knowledge and Problems (1988) *Apicultura, 4, pp. 1-11*.

Pomeranz Meloan. Food Analysis Theory & Practice (1980) Revised Edition. *The Avi Publishing Company, Inc. Westport. Chapter 34, pp. 553-554.*

Randerath, K. Enciclopedia de la Química Industrial. Cromatografía de Capa Fina (1974) *Ediciones Urmo. Bilbao, Tomo 8, pp. 169.*

Resolución GMC 15/94 (Resolución MSyAS 01, 11/01/95). Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel.

Resolución SAGyP Nº 1051, 2/12/94 modificada Resolución SAGyP Nº 274, 6/11/95. Clasificación de la Miel sobre la Base de su Origen Botánico.

Resolución SAGyP Nº 111, 01/03/96. Habilitación, Inscripción y Funcionamiento de los Laboratorios Certificadores del Origen Botánico de la Miel.

Santforn, V. O. and Manura, J.J. Flavor and Aroma in Natural Bee Honey (1999) Consulta del 3 de febrero, 2004, *http://www.sisweb.com/referenc/applnote/app-25-a.htm.*

Schade, J. E., Marsh, G. L. and Eckert, J. E. Diastase Activity and Hidroxi-methyl-furfural in Honey and their Usefulness in Detecting Heat Alteration (1958) *Food Res. 23, pp. 446-463.*

Serra Bjonvehi, J. Determinación de Antranilato de Metilo en la Miel de Cítricos *(Citrus sp)* del Levante Español, y su Influencia en la Actividad Diastásica de la Miel (1988) *Alimentaria, 11, pp. 37-40.*

Siegenthaler, U. Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der α-Glucosidase (Saccharase) im Honig (1977) *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 68, pp. 251-258*.

Snowdon, J. A and Cliver, D. O. Review Article. Microorganisms in Honey (1996) *International Journal of Food Microbiology 31, pp. 1-26.*

Stahl, E., Bolliger, H. R., Brenner, M., Gänshirt, H., Mangold, H. K., Seiler, H., and Waldi, D. Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook (1965) *Academic Press Inc., Publishers. New York, pp. 371-380, 495.*

Thean, J. E. and Funderburk, W.C. Jr. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Sucrose in Honey (1977) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.60, N°4, pp. 838-841.*

USDA. Composition of American Honeys (1962) *U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC, Technical Bulletin 1261.*

White, W. J., Jr., Petty, J. and Hager, R. B. The Composition of Honey. II. Lactone Content (1958) *Journal of Official Association Agricultural Chemists. Vol.41, N°1, pp. 194-197.*

White, J. W., Jr. Report of the Analysis of Honey (1959) *Journal of Association Official Agricultural Chemists Vol.42, N°2, pp. 341-348.*

White, J. W., Jr. and Subers, M. H. Accuracy of Sugar Analyses of Honey by the Selective Adsorption Method (1960) *Journal of Association Official Agricultural Chemists Vol.43, N°4, pp. 774-777.*

White, W. J., Jr. Determination of Acidity, Nitrogen and Ash in Honey (1962) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.45, N°3, pp. 548-551.*

White, J. W. and Subers, M. Studies on Honey Inhibine. 2. A. Chemical Assay (1963) *J. Apic. Res. 2 (2), pp. 93-100.*

White, W. J., Jr. Dextrose Determination in Honey: A Rapid Photometric Determination (1964) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.47, N°3, pp. 488-491.*

White, J. W., Jr, Kushnir, I. and Subers, M. H. Effect of Storange and Processing Temperatures on Honey Quality (1964) *Food Technol. 18, pp. 555-558.*

White, W. J., Jr. Methyl Antranilate Content of Citrus Honey (1965) *Journal of Food Science Vol.31, N°7, pp. 162-164.*

White, W. J., Jr. Moisture in Honey: Review of Chemical and Physical Methods (1969) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.52, N°4, pp. 729-737.*

White, J. W., Jr. Specific Determination of Sucrose in Honey (1977) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.60, N°3, pp. 669-672.*

White, W. J., Jr. Methods for Determining Carbohydrates, Hydroxymethylfurfural and Proline in Honey: Collaborative Study (1979) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.62, N°3, pp. 515-526.*

Williamson, J. Protein Determination. Lowry Procedure.(2000) Biology 371. Independent Research. Week 5. Consulta del 5 de febrero, 2004, *http://www.bio.davidson.edu/people/jowilliamson/Techniques/Protocolweek5.html.*

Winkler, O. Beitrag zum Na und zur Bestimmung von Oxymethyfurfural an Honig und Kunsthonig. (1955) *Lebensm. Unters Forsch., 102, pp. 160-167*.

Winton, A. L, Ph.D. and Winton, K. B.,Ph.D. The Structure and Composition of Foods (1939) *John Wiley & sons, Inc., New York. Vol IV, pp. 45-66.*

CAPÍTULO V

ALTERACIONES Y ADULTERACIONES DE LA MIEL

√ Diferentes Adulteraciones y Alteraciones

√ Métodos de Detección

√ Análisis de los Resultados

ALIMENTO ALTERADO Y ADULTERADO

Como ya se expuso en capítulos anteriores es necesario realizar una batería de análisis para poder afirmar que la muestra analizada es una miel alterada y/o adulterada o que se trata de un producto genuino que presenta sus características físico-químicas intactas y cumple con la legislación vigente en el país de origen o para el comercio internacional. Un resultado considerado aisladamente no es indicativo ni concluyente de que el producto sea genuino.

La legislación de la República Argentina define como **alimento alterado** *"el que por causas naturales de índole física, química y/o biológica o derivadas de tratamientos tecnológicos inadecuados y/o deficientes, aisladas o combinadas, ha sufrido deterioro en sus características organolépticas, en su composición intrínseca y/o en su valor nutritivo"*, artículo 6° inciso 5 del Código Alimentario Argentino.

Un **alimento adulterado** es "*el que ha sido privado, en forma parcial o total, de sus elementos útiles característicos, reemplazándolos o no por otros inertes u extraños; que ha sido adicionado de aditivos no autorizados o sometidos a tratamientos de cualquier naturaleza para disimular u ocultar alteraciones, deficiente calidad de materias primas o defectos de elaboración"*, artículo 6° inciso 7 del Código Alimentario Argentino.

En el caso particular de la miel la alteración más común es aquella derivada de tratamientos tecnológicos inadecuados como por ejemplo sobrecalentamiento. Como consecuencia de ello sufre un deterioro en sus características organolépticas, en su composición intrínseca y en su valor nutritivo. Una miel adulterada es aquella que fue adicionada de jarabes sintéticos y como consecuencia posee maltodextrinas ajenas a su composición normal o que fue sometida a tratamientos térmicos con el fin de ocultar un incipiente proceso de fermentación (deficiente calidad de la materia prima)

El analista dispone de una serie de métodos cuyos resultados pueden alertarlo sobre una posible adulteración. Si se analizan cuidadosamente los resultados de determinaciones tales como:

- Viscosidad
- Rotación Específica
- Mutarrotación
- Contenido de glucosa y fructosa
- Contenido de dextrinas totales
- Cenizas, cenizas solubles / insolubles y alcalinidad de cenizas

Podrá corroborarse que el producto está adulterado ya que un resultado positivo, de aquellos métodos diseñados especialmente para la detección de adulterantes, debe necesariamente coincidir con una alteración de su composición físico-química.

ALTERACIONES

Por negligencia se obtiene una miel alterada, en general debido a un sobrecalentamiento en el proceso de obtención, almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura no óptimas u acopio durante largos períodos.

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto se pierden sustancias características del flavor, la miel se oscurece, se destruyen enzimas, disminuye la concentración de inhibina y aumenta el contenido de hidroximetilfurfural.

Por absorción de agua puede crearse un medio favorable para la proliferación de levaduras y un consecuente aumento de la acidez.

Las posibles causas de alteraciones pueden resumirse de la siguiente forma:

- **Excesivo calentamiento**: cuanto más drástico es el tratamiento térmico al que se somete el producto, mayor es la cantidad de HMF formada.

El HMF se forma por deshidratación de las hexosas por acción del calor, es inestable y se descompone en ácido levulínico o se polimeriza formando caramelo. Este proceso se acelera por la presencia de minerales, ocurre a temperaturas mayores de 70 ºC (158 ºF) y está favorecido a pH entre 3 y 5.

El fenómeno de pardeo (caramelización) que sufre la miel cuando es sometida a altas temperaturas explica el aumento de color que se observa en mieles sobrecalentadas acompañado de un aumento en el contenido de HMF.

La actividad enzimática puede llegar a disminuir, según el grado de calentamiento, a tal punto que no se detecte actividad.

- **Almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura no óptimas**: si el producto se almacena en condiciones tales que pueda hidratarse, el contenido de hidroximetilfurfural aumenta notablemente siendo el efecto aún más pronunciado si se lo calienta o se lo mantiene a temperaturas altas durante el almacenamiento, puede alcanzar valores entre 10 y 20 mg/100g.

Al aumentar la temperatura de almacenamiento el grado de inactivación de la diastasa es mayor y como consecuencia se observa disminución de la actividad diastásica del producto.

- **Acopio durante largos períodos**: si el alimento se almacena en buenas condiciones de temperatura y humedad por períodos prolongados el contenido de hidroximetilfurfural aumenta marcadamente y la actividad enzimática disminuye aunque en forma poco significativa.

- **Fermentación**: en un proceso de fermentación los azúcares susceptibles de ser fermentados, tales como glucosa, fructosa y manosa son transformados en alcohol etílico y CO_2, estos compuestos representan el 95% del total de productos de la fermentación. El etanol en presencia de oxígeno es oxidado a ácido acético y agua por acción de levaduras y bacterias. Otros metabolitos en cantidades mucho menores son: glicerol, ácido succínico y butano 2,3 - diol.

Si tuvo lugar un proceso de fermentación el alimento presenta espuma o pequeñas burbujas en la superficie y pierde su aroma y olor característicos ya que presenta fuerte olor a alcohol y acidez alta. En algunos casos el desprendimiento de gas es tan pronunciado que el producto se derrama del recipiente que lo contiene.

Para evitar que se comercialice miel fermentada o en vías de fermentación en el Reglamento Técnico de Identidad y Calidad de Miel (Resolución GMC 15/94) se especifica que la miel no debe tener indicios de fermentación ni ser efervescente.

Si la miel está fermentada en el análisis microscópico se observan gran cantidad de levaduras.

La magnitud del proceso de fermentación depende de la carga inicial de microorganismos osmofílicos capaces de fermentar los azúcares, del tiempo y temperatura de almacenamiento y del grado de humedad inicial (White, 1975)

En algunos países la miel posee alto contenido de humedad, se recolecta inmadura y se somete a un tratamiento térmico con el fin de disminuir el contenido de agua y las levaduras que proliferaron en ella y evitar así este fenómeno.
El producto no presenta signos visibles de fermentación, el contenido de agua y de levaduras es normal pero el tenor de glicerol sobrepasa los niveles normales.

- **Hidratación**: dado que la miel es muy higroscópica puede absorber agua con mucha facilidad, esto puede ocurrir en cualquiera de las etapas que constituyen la cadena de producción, desde la cosecha hasta el envasado.
En este caso el valor del contenido de humedad es alto al igual que la acidez si el medio se torna favorable para el desarrollo de levaduras y hongos.

ADULTERACIONES

Los avances tecnológicos han permitido obtener edulcorantes nutritivos sintéticos altamente refinados y de bajo costo, algunos de ellos con una composición de hidratos de carbono cualitativa y cuantitativa muy semejante a la de la miel, al igual que su pH. En algunos casos la relación entre la glucosa y la fructosa de estos jarabes es tal que, cuando se mezcla con la miel las cantidades relativas de estos azúcares se mantienen dentro del rango de composición normal (Kushnir, 1979)
La composición química de la miel es mucho más compleja que la de estos productos pero, siendo su producción limitada dado que se trata de un producto natural, es comúnmente mezclada con ellos porque además de aumentar su volumen disminuye su costo.
Estos productos son los predilectos para adulterar la miel porque, debido a sus características físico-químicas su detección es difícil y su presencia no modifica notablemente los caracteres organolépticos del producto.

Las adulteraciones de la miel, en una primera instancia podrían dividirse en dos: el agregado de productos con alta concentración de azúcares y la adición de agua.
El agregado de agua es una adulteración poco común. Es fácil de detectar y el producto pierde su capacidad de conservación pues al disminuir la concentración de glúcidos proliferan las levaduras de carácter osmofílico, que normalmente la contaminan y fermenta con mucha facilidad.
Los productos ricos en azúcares comúnmente utilizados para adulterar la miel son los jarabes obtenidos por hidrólisis del almidón de maíz y productos provenientes de la industrialización de la caña de azúcar como la sacarosa y la melaza.

- **Jarabe de Glucosa (JG)**: se obtiene por hidrólisis convencional del almidón de maíz. Está constituido fundamentalmente por dextrinas. La composición media característica de este

jarabe es de 47 a 60 g% de dextrinas, 25 a 35 g% de maltosa, 10 a 20 g% de glucosa y 0,3 a 0,7 g% de cenizas. En general sus cenizas están constituidas por cloruros y sulfatos, poseen alto contenido de HMF.

- **Jarabe de Azúcar Invertido**: su composición química es semejante a la de la miel en lo referente a los hidratos de carbono. Su origen puede ser la caña de azúcar o la remolacha azucarera. Posee un contenido de cenizas mayor que otros jarabes, se caracterizan por poseer alto contenido de HMF.

- **Jarabe de Maíz de Alta Fructosa (JMAF)**: se obtiene industrialmente por conversión enzimática del almidón de maíz. De acuerdo con las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la hidrólisis los productos obtenidos se diferencian entre sí por su composición en hidratos de carbono. La composición media de algunos de ellos es: 20 – 55 g% de fructosa, 40 – 45 g% de glucosa, 0 – 20 g% de maltosa y 4 – 16 g% de azúcares superiores.
Dependiendo de la fuente comercial y del proceso de refinación utilizado para su obtención el JMAF puede contener sólo trazas de polisacáridos, lo que dificulta su detección.

- **Sacarosa**: es un producto derivado de la industrialización de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera.

- **Melaza**: la composición media de la melaza es de 50 g% de azúcar, 20 g% de materia orgánica, 20 g% de agua y 10 g% de cenizas.

- **Alimentación Artificial**: la alimentación artificial de las abejas es una práctica cada vez más difundida que no siempre está plenamente justificada. En determinados períodos del año como por ejemplo durante el invierno y en zonas que se tornan totalmente inaccesibles en esa época es necesario recurrir a la alimentación artificial con jarabes nutritivos para evitar que la colmena quede sin alimento y corra el riesgo de morir. Algunos expertos sostienen que mediante este tipo de práctica se evitan problemas de índole sanitaria como la transmisión de esporas del agente causal de la loque americana.
Es innegable que el apicultor puede dejar suficiente cantidad de miel para abastecer a las abejas hasta que comience el flujo de néctar pero la apicultura se ha convertido en una práctica suficientemente rentable como para que se extraiga hasta la última gota de miel dejando a la abeja sin su alimento, que de hecho fabrica para ella, y no se disponga de otra opción que la alimentación artificial.
Este es un tema muy controvertido, la discusión sobre si quedan residuos de este tipo de alimentación es motivo de muchas disquisiciones pero la realidad es que la abeja se autoabastece y esto es algo que debe respetarse si se desea obtener un producto genuino. Una justificación basada en un fundamento meramente económico no es suficientemente valedera como para poner en peligro la genuinidad de la miel pues pueden quedar residuos de compuestos ajenos a su composición normal y como consecuencia el producto estará adulterado.

La alimentación puede llevarse a cabo con sacarosa o con jarabes derivados del maíz y la finalidad será diferente de acuerdo con la época del año durante la cual se practique, puede realizarse para mantenimiento de la colmena durante el invierno o para estimulación en primavera y/o verano (Pujola, 1993)

En el caso particular de la alimentación con sacarosa no se han reportado problemas apreciables analíticamente porque el residuo que puede quedar se hidroliza durante la maduración y almacenamiento del producto. Los valores de glucosa y fructosa normales no se ven afectados en magnitudes que puedan ser detectadas mediante un análisis químico.
El problema reside en la utilización de jarabes de maíz con alto porcentaje de dextrinas; en miel proveniente de abejas alimentadas con jarabe de maíz de alta fructosa se han encontrado residuos de maltodextrinas cuando no se respetaron las recomendaciones de las buenas prácticas de manufactura (Fattori, 2002)

La principal cuestión reside en clarificar si esta situación puede ser considerada una adulteración, si los residuos que quedan en el producto pueden considerarse ajenos a su composición normal ya que no fueron agregados intencionalmente. La respuesta es sí, las maltodextrinas provienen del maíz y no del néctar, materia prima utilizada por la abeja para la elaboración de la miel y no forma parte de su composición normal. Si el lector se remite a la legislación sobre miel puede observar que esta es por demás clara cuando especifica que la miel para consumo humano deberá cumplir los requisitos que establece la legislación vigente, la cual no contempla la presencia de dextrinas provenientes del maíz entre los requisitos físico-químicos.
No es casual que la alimentación artificial haya sido incluida dentro del título adulteraciones.

Esta cuestión puede ser analizada desde otro punto de vista, si se tiene en cuenta la definición de alimento alterado establecida en la legislación argentina, una miel que contenga residuos de maltodextrinas podría catalogarse como alterada. Esta situación no sería totalmente errónea ya que, como se expresó anteriormente no existe intención por parte del apicultor de adulterar el producto. Independientemente del nombre que se le adjudique al estado del alimento lo que es importante tener en cuenta es que de un modo u otro la miel no es genuina.

Para aquellos casos en los cuales debe recurrirse indefectiblemente a este tipo de alimentación pueden tomarse una serie de precauciones tendientes a evitar que el alimento quede almacenado en los panales y como consecuencia se mezcle con la miel. Por ejemplo, en épocas de producción de néctar la composición del jarabe debe ser lo más parecido posible a la composición de este y debe suministrarse en dosis muy pequeñas (Pujola, 1993)
Se recomienda suspender este tipo de alimentación antes de la colocación de las alzas mielarias destinadas a la cosecha del producto (SAGPyA, 1998)

MÉTODOS DE DETECCIÓN

ALTERACIONES

Como se explicó anteriormente existen una serie de métodos que permiten comprobar si el producto está alterado. A continuación se enumeran las determinaciones que deben realizarse para corroborar la existencia de una alteración.
Sólo se tratan en detalle aquellos métodos que no fueron analizados en el capítulo IV porque son específicos para detectar una alteración del producto.

- Contenido de hidroximetilfurfural
- Actividad de las diversas enzimas presentes normalmente en la miel

- Contenido de inhibina
- Humedad
- Acidez
- Contenido de Glicerol

- **Glicerol**

El glicerol, metabolito de la fermentación alcohólica, se encuentra normalmente en la miel en cantidades imperceptibles, menores a 50 mg/kg. A medida que aumenta su concentración se van modificando los caracteres organolépticos y a concentraciones mayores de 300 mg/kg es perceptible a la degustación.

Mediante este análisis es posible probar que una miel está fermentada, en vías de fermentación o que un proceso de fermentación temprano fue interrumpido por tratamiento térmico.

Existen distintos métodos químicos para la determinación del glicerol. Estos métodos se basan en la oxidación del glicerol a formaldehído y ácido fórmico por la acción de un agente oxidante como por ejemplo el ácido peryódico o su sal. El contenido de glicerol se calcula sobre la base de la cantidad de ácido fórmico liberado, por titulación o midiendo el ácido periódico remanente (A.O.A.C. 948.13, 1995)
Los métodos oxidativos utilizan solventes orgánicos para extraer el glicerol y agentes oxidantes tales como dicromato de potasio en medio ácido o permanganato de potasio en medio alcalino (A.O.A.C. 930.18, 1995)
Azúcares reductores tales como glucosa, fructosa interfieren en esta determinación al igual que los ácidos orgánicos de modo que ambos deben ser removidos antes de iniciar el ensayo, la muestra de análisis debe contener cantidades de glicerol del orden de 0,25 gramos. Ambas condiciones convierten a estos métodos en inaplicables para la miel.
Para la detección y cuantificación del glicerol en la miel debe necesariamente recurrirse a métodos enzimáticos o cromatográficos.

Método Enzimático y Espectrofotométrico

Este método (Becker, 2004) involucra una serie de reacciones enzimáticas, el producto final se determina por espectrofotometría al UV.
Las etapas involucradas en el ensayo se indican a continuación:

La gliceroquinasa transforma el glicerol en glicerol-3-fosfato, en presencia de adenosintrifosfato (ATP) que es reducido a adenosindifosfato (ADP)

$$\text{GLICEROL} + \text{ATP} \rightarrow \text{GLICEROL-3 -FOSFATO} + \text{ADP}$$

La piruvatoquinasa, en presencia de fosfoenolpiruvato y ADP, regenera el ATP y produce piruvato que es transformado en lactato por acción de una lactato dehidrogenasa en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH)

$$\text{FOSFOENOLPIRUVATO} + \text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{PIRUVATO}$$

$$PIRUVATO + NADH \rightarrow LACTATO + NAD$$

El NAD (nicotinamida adenina dinucleótido oxidado) generado es proporcional a la cantidad inicial de glicerol, se cuantifica midiendo la absorbancia a 340 nm.

Se prepara una solución acuosa que posea un contenido de glicerol de aproximadamente 5 mg% (aproximadamente 15 gramos de miel), se agregan 2 ml de solución de $Na_2WO_4.2H_2O$ 10% y se lleva a 100 ml con agua destilada. Antes de tomar una alícuota para llevar a cabo la reacción se filtra a través de papel de filtro de filtración rápida.

Una simple fórmula matemática permite convertir la densidad óptica medida en cantidad de miligramos de glicerol por kilogramo de miel.

El contenido de glicerol no debe superar los 50 mg/kg., si es mayor a 300 mg/kg. la miel se considera fermentada.

Es posible trabajar con un Kit comercial o preparar los reactivos en el laboratorio. En este último caso serán necesarias todas las enzimas y sustratos involucrados en las reacciones anteriormente expuestas.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Se prepara una solución acuosa que posea un contenido de glicerol de aproximadamente 5 mg% y se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 a 0,45 μ de diámetro de poro.

Las condiciones cromatográficas sugeridas son las que se detallan a continuación (A.O.A.C. 991.46, 1995):

- Columna: de intercambio iónico (forma iónica H^+)
- Solvente: agua.
- Detector: índice de refracción.
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra. En caso de no disponer de un integrador se pueden comparar las alturas o las áreas de los picos de las muestras con la altura o el área del pico correspondiente a un estándar de glicerol y calcular su concentración con la siguiente fórmula:

$$\text{Glicerol} = \frac{C_P \times A_M}{A_P \times m_m}$$

C_P concentración de la solución estándar, en miligramos por 1000 gramos de miel.

A_M altura o área del pico correspondiente a la muestra.

A_P altura o área del pico correspondiente al estándar.

m_m masa de muestra, en gramos.

- Otros parámetros:
  e) Se trabaja con flujos comprendidos entre 0,5 y 5 ml/min.
  f) La temperatura óptima de trabajo es de 65 °C (149 °F)
  g) Se preparan soluciones patrón de glicerol de 1 mg%, 5 mg% y 10 mg% a partir de glicerina 87% disuelta en agua.
  h) El volumen de inyección recomendado es de 20 μl.
  i) En estas condiciones el glicerol eluye a aproximadamente 12 minutos.

Los resultados se expresan en miligramos de glicerol / 1000 gramos de miel.

ADULTERACIONES

A continuación se analizan los diferentes métodos aplicables a la detección, y en algunos casos a la cuantificación, de edulcorantes nutritivos agregados a la miel con el propósito de adulteración.

Antes de iniciar los ensayos para investigar la presencia de adulterantes se recomienda verificar el origen de la miel. La miel de mielada da positivo algunas de los análisis que se describen a continuación.

Es conveniente realizar las determinaciones en el orden especificado a continuación y utilizar solamente aquellas necesarias para alcanzar el objetivo propuesto: confirmar la presencia de un adulterante (FAO, 1986)

- Análisis de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$: si los valores obtenidos son menos negativos que -23,5°/∞ es necesario confirmar la presencia de jarabe de maíz mediante la Cromatografía en Capa Fina.

- Cromatografía en capa fina: un resultado positivo es concluyente.

- Contenido de HMF: si los valores obtenidos superan los límites aceptables debe confirmarse mediante el análisis de los carbohidratos.

- Análisis de la distribución de los carbohidratos. Este estudio puede realizarse aplicando métodos tales como Cromatografía en Columna, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Cromatografía Gas-Líquido o Polarimetría. Todos ellos fueron discutidos detalladamente en el capítulo IV.

- Análisis de los constituyentes nitrogenados. Se puede determinar el contenido de prolina y de proteínas, debe tenerse en cuenta que siendo los valores normales en miel muy bajos sólo puede confirmarse la presencia de una adulteración muy grosera.

Los métodos de análisis han sido agrupados de acuerdo con el adulterante cuya presencia permiten confirmar.

- **Investigación de Maltodextrinas**

El analista dispone de varios métodos rápidos que permiten orientarlo sobre una posible adulteración con jarabe. Entre esta metodología se pueden citar: las reacciones de Fiehé y de Lund, el ensayo de Lugol y la observación de fluorescencia.

Un resultado negativo no es concluyente, siempre debe realizarse un ensayo confirmatorio.

Fluorescencia

La miel naturalmente presenta fluorescencia cuando se la expone a la acción de la luz ultravioleta. Si se mezcla con cantidades crecientes de jarabe derivado del maíz u otro edulcorante nutritivo se puede observar una disminución de la fluorescencia a medida que aumenta el porcentaje de adulteración.

El método basado en esta propiedad es una determinación cualitativa, puede orientar al analista sobre una posible adulteración luego de comparar la fluorescencia de la muestra frente a la fluorescencia de una miel genuina utilizada como patrón. La ausencia de fluorescencia o la disminución frente a la miel de referencia no es un resultado concluyente, debe recurrirse a otros métodos para poder asegurar que existe una adulteración.

En la mayoría de los laboratorios la detección de adulterantes en la miel se realiza por otros métodos pero, esta alternativa no deja de ser interesante ya que es un método fácil de llevar a cabo, rápido, que no requiere personal especializado y es económico (Orbán, 1928)
Quienes comercializan este alimento podrían diferenciar sus lotes, tambor por tambor, entre miel genuina y miel dudosa, enviando a continuación a analizar aquellas mieles en las cuales se sospeche una adulteración.

El método consiste en comparar bajo la luz ultravioleta una gota de muestra con una gota de miel genuina colocadas sobre un cartón negro mate. Si el producto está cristalizado debe fluidificarse.

Reacción de Fiehé

Este ensayo ya fue explicado en detalle en el capítulo IV. Es una determinación que permite corroborar la presencia de HMF. Esta reacción da resultado positivo en aquellos casos en los cuales el producto está adulterado con jarabe de azúcar invertido o con jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis ácida porque en estos casos el contenido de HMF es muy alto (CAC, 1969)

Es importante recalcar que este ensayo puede dar resultado positivo sin que ello implique una adulteración ya que mieles severamente calentadas también presentan resultado positivo.

Reacción de Lund

Esta reacción se basa en la precipitación de las proteínas con ácido tánico.

Se pesan 2 gramos de miel y se disuelven en 20 ml de agua destilada. Se transfieren a una probeta de 50 ml con tapa, se agrega 5 ml de solución de ácido tánico 0,5% y agua destilada hasta completar 40 ml. Se deja en reposo toda la noche.

Si la miel es genuina se forma un precipitado de 0,6 a 3 ml. Si el precipitado es despreciable o no se observa precipitación es probable que se trate de una miel adulterada (Lutz, 1976)

Ensayo de Lugol

El ensayo detecta la presencia de maltodextrinas, las que reaccionan con el reactivo de Lugol dando una coloración roja o violácea dependiendo de la calidad y cantidad de las dextrinas presentes en la miel.
Algunos jarabes de glucosa de alta conversión y ciertos jarabes de maltosa no dan la reacción con yodo (White, 1959)

El reactivo se prepara disolviendo 1 gramo de yodo y 3 gramos de yodato de potasio en 50 ml de agua destilada.
Se disuelven 10 ml de miel en 10 ml de agua destilada y se agrega 1 ml de solución de Lugol. Se recomienda realizar un ensayo paralelo con una muestra de miel pura (Lutz, 1976)

Cromatografía en Capa Fina

Por medio de este ensayo se detectan adulteraciones con jarabes de glucosa, de azúcar invertido y otros que deriven de almidones distintos del maíz. Algunos jarabes de maíz de alta fructosa dan positivo este ensayo.

Un resultado positivo indica que la miel está adulterada con 5 – 7% de JMAF o alrededor de 1 – 2% de JG. Este ensayo es menos sensible en los casos en los cuales el fraude haya sido cometido utilizando jarabes de maíz de alta fructosa de segunda y tercera generación (FAO, 1986)

Cabe aclarar que se trata de una determinación cualitativa, mediante este método es posible comprobar la presencia de dextrinas ajenas a la composición de una miel genuina.
El método se basa en la precipitación de dextrinas y polisacáridos y posterior análisis del precipitado por Cromatografía en Capa Fina (TLC)
Las dextrinas, que normalmente están presentes en la miel, difieren de las que provienen de la hidrólisis del almidón por esta razón se las puede diferenciar por TLC. Sus R_f son mayores y las manchas de diferente color.

Para llevar a cabo la determinación se diluye 1 gramo de muestra en un volumen igual de agua destilada, se toman 0,5 ml y luego del agregado de 4 ml de alcohol absoluto se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se disuelve en 0,5 ml de agua destilada y reprecipita con otros 4 ml de alcohol.
El precipitado disuelto en 0,1 ml de agua destilada se siembra en la placa cromatográfica.
Paralelamente se aplica el mismo tratamiento a una muestra de miel genuina y a una muestra de miel adulterada con jarabe, que serán utilizadas como blanco y testigo respectivamente.
Las condiciones en las cuales se realiza la cromatografía son las siguientes:

- Soporte: la placa cromatográfica es de gel de sílica, puede prepararse en el laboratorio o utilizarse las comerciales, cromatofolios.

Una opción de este método es la Cromatografía Ascendente o Descendente en papel, en general se recomienda la Cromatografía en Capa Fina porque es mayor la resolución y el tiempo de corrida es mucho menor.

- Solvente: n-butanol / ácido acético / agua en la proporción (2:1:1)

En caso de optar por la Cromatografía en Papel el solvente es una mezcla de n-propanol / acetato de etilo / agua (7:1:2)

- El solvente de corrida debe prepararse en el momento de usar.

- Revelador: se prepara disolviendo 1 ml de anilina recién destilada y 1 g de cloruro de difenilamonio o de difenilamina en 50 ml de acetona, se agrega 5 ml de ácido fosfórico al 85%. El revelador así preparado puede conservarse entre 0 y 4 °C (32 y 39,2 ºF)

- Volumen de muestra: se aplican 2 μl de cada una de las muestras preparadas como se indicó anteriormente.

Después de finalizada la corrida cromatográfica, se seca la placa o el papel y se revela. Para visualizar las manchas se calienta en estufa durante 5-8 minutos entre 85 y 95 °C (185 y 203 ºF) Si el período de calentamiento es muy prolongado el color de las manchas varía, es importante tener esto en cuenta ya que puede conducir a una interpretación errónea de los resultados. Debido a un sobrecalentamiento las manchas pertenecientes a las dextrinas provenientes del maíz presentan la misma coloración que las manchas relativas a las dextrinas propias de la miel de flores y de la miel de mielada.

La miel pura da una o dos manchas grandes de color azul-gris o azul-castaño, no contiene carbohidratos con $R_f < 0,35$. La presencia de maltodextrinas se evidencia por una serie de manchas, de color azul, que se extienden desde el origen (Kushnir, 1979)

Se demostró que es posible detectar la presencia de 0,5 g% de jarabe de glucosa sembrando 3 μl de muestra preparada como se indicó anteriormente y 2 g% de jarabe de maíz de alta fructosa de conversión enzimática. Si se siembran 4μl de muestra preparada a partir de 2 gramos de miel es posible detectar la presencia de 10 g% de jarabe de maíz de alta fructosa de segunda generación (Fattori, 2002)

Algunas mezclas conteniendo miel de mielada poseen dextrinas y otras sustancias propias de este tipo de miel que interfieren en esta determinación, dando manchas o bandas (streaks) en la zona correspondiente a las maltodextrinas.
En este caso el resultado no es concluyente y es necesario realizar un ensayo confirmatorio, para minimizar interferencias causadas por dextrinas y otros materiales presentes en la miel de mielada la muestra debe pasarse a través de una columna de carbón y celite antes de su análisis por Cromatografía en Capa Fina (Kushnir, 1979)

Este método fue adoptado en 1960 por la A.O.A.C como método oficial para la detección de jarabe de glucosa en la miel (A.O.A.C. 959.12, 1995)

El Codex Alimentarius aceptaba esta determinación para la detección de jarabe de glucosa en miel, pero en la última revisión de la Norma para la miel se retiró.

Espectroscopia infrarroja (Sivakesava, 2001)

La espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier (FTIR) es una herramienta ampliamente utilizada que ofrece una interesante alternativa para análisis cualitativo. Es un método rápido y no destructivo mediante el cual es posible identificar los compuestos sobre la base de su estructura y composición molecular. Se ha aplicado para clasificar el café de acuerdo con su origen geográfico, para determinar la autenticidad de aceites vegetales, puré de frambuesa y salsa de soja entre muchas otras aplicaciones.

La espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier en conjunción con análisis estadístico multivalente puede utilizarse para detectar la presencia de caña de azúcar en la miel. Es posible cuantificar el porcentaje de adulterante calibrando el aparato con mieles adulteradas con cantidades conocidas de azúcar de caña o jarabe de azúcar invertido.

Mediante esta determinación podría llegar a establecerse el origen geográfico y, en algunos casos el botánico, de la miel en base a los picos característicos.

El método es relativamente simple y no es necesaria una preparación previa de la muestra. La miel se calienta en un baño de agua a 50 ºC (122 ºF) durante 10 minutos o hasta disolver todos los cristales de azúcar y una vez que alcanza la temperatura ambiente se practica el análisis.

- **Investigación de Azúcares C-4**

Análisis de la Relación Isotópica $^{13}C/^{12}C$ por Espectrometría de Masa.

La mayoría de los elementos poseen isótopos estables, la relación entre ellos varía de acuerdo con el elemento, aunque esas diferencias naturales son pequeñas pueden medirse.

La utilización del CO_2 atmosférico es diferente según se trate de plantas que utilizan el Ciclo de Calvin (ciclo de 3 carbonos) o el Ciclo de Hatch-Slack (ciclo de 4 carbonos) En el primer caso los valores de $\delta^{13}C$ oscilan entre -22 y -33°/∞ mientras que en el segundo están comprendidos entre -10 y -20°/∞ Como resultado de ello la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ es diferente y puede medirse. Los valores son negativos porque poseen menor cantidad de ^{13}C que el patrón de Pee Dee Belenmite (PDB) al que se le adjudica arbitrariamente el valor 0.

Los productos que provienen de plantas C-3 como por ejemplo la miel, el azúcar de remolacha y el jugo de naranja presentan valores más bajos (más negativos) que aquellos provenientes de plantas C-4 como el jarabe de maíz de alta fructosa y el azúcar de caña (Doner, 1992) Si se mezclan unos con otros se obtienen valores intermedios, esta propiedad es la que utiliza el método para detectar en la miel el agregado de jarabes provenientes del maíz.

El análisis de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ de la miel permite detectar la presencia de azúcares ajenos a la miel procedentes de plantas que utilizan el Ciclo de 4 Carbonos para la fijación del CO_2 como el maíz y la caña de azúcar dado que la miel deriva del néctar de plantas que utilizan el Ciclo de 3 Carbonos en el proceso de la fotosíntesis (White, 1992)

Para llevar a cabo este análisis se cuenta con dos métodos alternativos (A.O.A.C. 978.17, 1995):

Método Discontinuo (Batchwise)

Se requieren de 20 a 50 mg de miel. La muestra se quema completamente hasta CO_2 y H_2O en presencia de CuO convenientemente purificado, como catalizador. El CO_2 generado se condensa en una trampa con N_2 líquido, se purifica y se mide la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ en un Espectrómetro de Masa.

La combustión de la muestra puede realizarse en un horno tubular con recirculación de gases (Sistema de Craig) o en ampollas de cuarzo o de borosilicato. En este último caso el CuO puede reemplazarse por pentóxido de vanadio, demanda mayor cantidad de tiempo pero es más económico. La temperatura depende del método de combustión elegido.

El aparato se calibra periódicamente con distintos patrones cuya elección también dependerá del método aplicado para quemar la muestra.

Las sustancias que se utilizan como patrón son:

- PDB: es CO_2 producido por una formación Pee Dee de un Belenmite. Es patrón para el Sistema de Craig.
- Sacarosa.
- Grafito.
- Foil de polietileno.

El $\delta^{13}C$ se calcula en ‰ mediante la fórmula:

$$\delta^{13}C = \left(\frac{^{13}C/^{12}C_m}{^{13}C/^{12}C_s} - 1 \right) \times 1000$$

$^{13}C/^{12}C_m$ relación isotópica medida en la muestra.

$^{13}C/^{12}C_s$ relación isotópica medida en el estándar.

El dato obtenido debe referirse al patrón utilizado realizando el cálculo que corresponda según cada caso.

Método de Flujo Continuo

En este procedimiento las etapas de combustión, purificación y análisis están totalmente automatizadas y controladas por un software. Los resultados se obtienen directamente, no es necesario realizar los cálculos.

Al igual que en el método discontinuo debe realizarse una calibración periódica utilizando los mismos patrones.

Se trabaja con 3 mg de miel la cual se calienta a 1000 ºC (1832 ºF) en un tubo de oxidación, usando Cr_2O_3 como catalizador.

En promedio el valor encontrado de $\delta^{13}C$ para la miel pura fue – 25,4 ‰, el del jarabe de maíz – 9,7 ‰ (White, 1978) y el de la caña de azúcar - 11 ‰.

Aquellas muestras con valores de $\delta^{13}C$ menos negativos que –21,4°/∞ (19,9°/∞ para la miel de citrus) podrán considerarse adulteradas con cantidades significativas de azúcares provenientes de maíz y/o caña.
Si los valores encontrados son menos negativos que –23,4°/∞ (21,9°/∞ para la miel de citrus) solamente podrá asegurarse la presencia de una adulteración después de confirmar el resultado.
La confirmación puede realizarse aplicando el método del patrón interno o comprobando que existe una desviación del patrón normal que presenta la miel cuando es analizada por Cromatografía en Capa Fina.

El método discontinuo fue adoptado en 1979 por la A.O.A.C. como método oficial para la investigación de maíz y productos de la caña de azúcar. El método de flujo continuo fue adoptado en 1993.

Método del Patrón Interno (A.O.A.C. 991.41, 1995)

En este caso se mide el $\delta^{13}C$ de la proteína aislada de la miel, como patrón interno, para compararlo con el $\delta^{13}C$ de la miel original.
Una diferencia de -1.00°/∞ entre los valores de $\delta^{13}C$ de la proteína y de la miel es suficiente para comprobar la presencia de una cantidad significativa de azúcares ajenos a la miel.
El método se aplica en casos en los cuales se hayan obtenido valores comprendidos entre –23,4 y –21,5°/∞ (para miel de Citrus entre –21,9 y –20,0°/∞) en el análisis de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ por Espectrometría de Masa aunque también es aplicable a mieles con cualquier valor de $\delta^{13}C$.

Para obtener las proteínas debe pasarse la muestra a través de un tamiz de 100-150 mesh (0,147 - 0,104 mm) con el fin de eliminar toda materia insoluble en agua que pueda contaminar el precipitado de proteínas. La precipitación se realiza con ácido túngstico, el precipitado se separa por centrifugación luego de incubar a 80 ºC (176 ºF) hasta formación del flóculo y a continuación se eliminan los carbohidratos que impurifican el precipitado con cinco ciclos de lavado y centrifugación.
El residuo resultante debe secarse como mínimo 3 horas a 75 °C (167 ºF) y al vacío.
Es un método muy laborioso para ser aplicado en un análisis de rutina porque requiere muchos lavados para asegurar la eliminación completa de levaduras y otros elementos que contaminan significativamente el precipitado. Si no se eliminan completamente todas las impurezas puede arribarse a resultados erróneos (White, 1992)

Alternativamente es posible dializar la muestra en tubos de celulosa (retiene proteínas de PM mayor de 12.000) y centrifugar la miel antes de precipitar la proteína con ácido túngstico. En este método el precipitado se lava y centrifuga una sola vez, simplificando el procedimiento y obteniéndose resultados equivalentes al método anterior.

A continuación se procede de la misma manera que para la miel de partida. La combustión de la proteína debe realizarse aplicando el mismo método que fuera utilizado para la miel. El contenido aparente de azúcares de C-4 se calcula con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ C-4 azúcares} = \frac{[\delta^{13}C_P - \delta^{13}C_H]}{[\delta^{13}C_P - (-9{,}7)]} \times 100$$

$\delta^{13}C_P$ relación isotópica medida en la proteína, en °/∞.

$\delta^{13}C_H$ relación isotópica medida en la miel, en °/∞.

- 9,7 °/∞ valor promedio de la relación isotópica del jarabe de maíz.

Si se confirmó que la miel está adulterada con productos derivados de la caña de azúcar en lugar de - 9,7 °/∞ se debe utilizar - 11 °/∞.

En caso de obtener valores negativos estos serán considerados como 0%.

Es posible concluir que la miel contiene cantidades significativas de azúcar de C-4 (primariamente maíz o caña) sólo si los valores hallados superan el 7% porque para contenidos menores de azúcar de C-4 la desviación estándar es muy grande.
El valor de $\delta^{13}C$ depende de las condiciones climáticas, del suelo y del origen geográfico.
Existen mieles (por ejemplo de acacias) que naturalmente poseen valores de $\delta^{13}C$ mayores que - 25,4 °/∞ (más negativos) y como consecuencia mieles falsificadas pueden llegar a pasar el ensayo normal de $\delta^{13}C$.
En mieles argentinas genuinas se encontraron valores de $\delta^{13}C$ de hasta - 26,2 °/∞, más negativos que el valor - 25,4 °/∞ (Fattori, 2002)

El método fue adoptado en 1991 por la A.O.A.C. como método oficial para la investigación de azúcares proveniente de plantas C-4 en la miel.
El Codex Alimentarius actualmente acepta este método para la determinación de azúcares agregados a la miel (genuinidad).

- **Investigación de Jarabe de Maíz de Alta Fructosa**

Cromatografía en Capa Fina (A.O.A.C. 979.22, 1995)

Para investigar la presencia de JMAF la muestra se pasa a través de una columna de carbón y celite previo al análisis por Cromatografía en Capa Fina. La Cromatografía en Columna minimiza las interferencias causadas por dextrinas y otros materiales presentes en la miel de mielada.
El pretratamiento por pasaje a través de la columna permite concentrar los oligosacáridos (cuya concentración en la mayoría de los casos es muy baja) presentes en el JMAF y detectar su presencia en el producto.
Este método es apropiado para descubrir adulteraciones con JMAF de segunda y tercera generación, puede detectarse desde 10% de jarabe.

La muestra se prepara disolviendo 1 gramo de miel en 10 ml de agua, se pasa a través de la columna. Luego del agregado de la solución en estudio se lava la columna con 300 ml de alcohol 7%, el volumen eluido se descarta y a continuación se agregan 100 ml de alcohol 50%. Se recoge el líquido en un cristalizador tarado, se evapora el solvente y se pesa la fracción de carbohidratos aislados. El residuo se disuelve en 0,1 ml de agua destilada.

La muestra así obtenida, junto con una de miel genuina y otra de miel adulterada con JMAF, tratadas de la misma manera, se siembran en la placa cromatográfica. A partir de este punto la técnica es la misma que la utilizada para la investigación de JG.

Un resultado positivo estaría indicando la presencia de jarabe de glucosa o JMAF, incluyendo jarabe de alta fructosa derivado de otro almidón diferente del maíz o la presencia de miel de mielada.
Para descartar la presencia de este tipo de miel debe realizarse un ensayo confirmatorio.

Cuando el peso de la fracción de carbohidratos aislados es menor o igual a 15 mg (1,5%) la presencia de adulterantes es concluyente y no es necesario realizar otro ensayo confirmatorio. Si la masa supera los 15 mg debe repetirse el tratamiento previo de la siguiente manera: se prepara la muestra como se describió anteriormente y se pasa por la columna, a continuación se lava la columna con 100 ml de alcohol 25% (contiene los oligosacáridos de la miel de mielada) que se descartan y se pasa el etanol 50%. A partir de este punto se sigue el método como se explicó anteriormente, teniendo la precaución de disolver completamente el residuo porque está constituido sólo por trazas de polisacáridos.
Si en la Cromatografía en Capa Fina se observa la presencia de manchas azules o serie de manchas que se extienden desde el origen se puede concluir que esas dextrinas provienen únicamente de un adulterante (Kushnir, 1979)

El método fue adoptado por la A.O.A.C. en 1983 como método oficial para la detección de JMAF en la miel (A.O.A.C., 979.22)
El Codex Alimentarius aceptaba este método para la detección de JMAF en miel, en la Norma Revisada para la miel se retiró.

Cromatografía Gas-Líquido

El método permite detectar la presencia de JMAF en la miel sobre la base de la determinación de la razón isomaltosa / maltosa. Esta relación de carbohidratos es notoriamente diferente entre la miel y el JMAF, en la miel la cantidad de maltosa es mayor que la de isomaltosa mientras que en JMAF es a la inversa.
Los carbohidratos que van a ser analizados se derivatizan directamente con trimetilsilano, agregando colestano como patrón interno. Mediante la determinación cromatográfica se cuantifican la maltosa (incluyendo otros disacáridos en concentraciones menores) y la isomaltosa y se analiza la relación isomaltosa / maltosa.

Se preparan los derivados a partir de 60 mg de miel. La muestra se disuelve en 1,00 ml de piridina conteniendo 1,00 mg de colestano, a continuación se agrega 0,90 ml de hexametildisilazano y 0,10 ml de ácido trifluoroacético y se deja 15 minutos. Los derivados son estables durante varias semanas.

Las condiciones recomendadas de trabajo son las siguientes (Doner, 1979):

- Columna: empacada con 3% OV-17.

- Gas carrier: helio.

- Detector: de ionización de llama, temperatura de trabajo de 300 °C (572 ºF).

- Otros parámetros:
  c) Se trabaja con un flujo de helio de 50 ml/min, 10 ml/min de hidrógeno y 400 ml/min de aire.
  d) La temperatura en el puerto de inyección es de 300 °C (572 ºF). La temperatura de la columna es de 240 °C (464 ºF) programada a 2 °C/min.
  e) Se inyectan en la columna 5,0 μl de muestra derivatizada.
  f) Los tiempos de retención encontrados en las condiciones de trabajo fueron:
     Sacarosa: 8,4 minutos.
     α-maltosa: 9,3 minutos.
     β-maltosa: 10,0 minutos.
     α-isomaltosa: 13,9 minutos.
     β-isomaltosa: 14,9 minutos.
     Colestano: 16,2 minutos.

Los niveles de maltosa e isomaltosa se calculan utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ azúcar} = \frac{m_c \times h_a \times 100}{K \times h_c \times m_m}$$

m_c masa de colestano en la muestra, en miligramos.

m_m masa de muestra, en miligramos.

h_a altura del pico de azúcar.

h_c altura del pico de colestano.

K factor de respuesta relativo.

El factor de respuesta se calcula ensayando una solución estándar de azúcar aplicando las mismas condiciones cromatográficas que para la muestra, con la siguiente fórmula:

$$K = \frac{m_c \times h_a}{m_a \times h_c}$$

m_c masa de colestano, en miligramos.

m_a masa de azúcar, en miligramos.

h_a altura del pico de azúcar.

h_c altura del pico de colestano.

Los cálculos se realizan a partir de las alturas de los picos de los β-anómeros de maltosa e isomaltosa. En la muestra derivatizada los α y β anómeros de ambos azúcares están en equilibrio pero se elige solamente la forma β porque es la que está en mayor cantidad.

Una relación isomaltosa / maltosa mayor que 0,51 indica presencia de JMAF.

- **Investigación de Sacarosa**

Análisis Microscópico (Kerkvliet, 2000)

El análisis microscópico es un buen método de "screening" para detectar adulteraciones con caña de azúcar y jarabe de azúcar invertido obtenido por hidrólisis ácida como así también mieles provenientes de abejas alimentadas con azúcar (Kerkvliet, 1995)
Es un método accesible porque en un análisis microscópico de rutina pueden identificarse células parenquimáticas, anillos simples de los vasos de conducción y células epidérmicas originarias de la caña de azúcar.

La muestra se prepara siguiendo el mismo procedimiento que para el análisis de polen, sin acetólisis. No debe aplicarse esta técnica porque se destruye la pared de las células de caña de azúcar, cuyo principal constituyente es la celulosa.
Se parte de 10 gramos de miel y una vez preparados los "slides" se secan a 40 ºC (104 ºF) y se cubren con glicerina coloreada con fucsina básica. Se trabaja con dos volúmenes de suspensión de miel diferentes dependiendo del número de elementos histológicos presentes.

Se cuentan las células parenquimáticas, los anillos simples de los vasos de conducción y las células epidérmicas características de la caña de azúcar con un microscopio provisto con luz polarizada.

La presencia de grandes cantidades de elementos histológicos de caña de azúcar en miel coincide con contenidos anormales de sacarosa y/o hidroximetilfurfural, los cuales indican adulteración.
Si se encuentran más de 150 células parenquimáticas y/o 10 anillos en 10 gramos de muestra puede concluirse que la muestra fue adulterada con azúcares C-4. En este caso los resultados son coincidentes con los obtenidos mediante el análisis de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$. Recuentos menores indican una posible adulteración por debajo del límite de detección del método isotópico.
Las mieles provenientes de abejas que libaron parcialmente la savia de la caña de azúcar no presentan elementos histológicos de ese vegetal.
El método isotópico permite comprobar que la miel fue adulterada con azúcares C-4 pero no es posible conocer el origen. Por ejemplo no es factible diferenciar hidratos de carbono de maíz de aquellos provenientes de caña de azúcar. Con el método microscópico es posible demostrar que se utilizó jarabe proveniente de caña de azúcar.
Los autores sugieren que el método microscópico es más sensible que el análisis de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$. De acuerdo con los resultados obtenidos si se cuentan 30 células parenquimáticas y esclereidas por 10 gramos de miel podría detectarse una adulteración del

1% (m/m) mientras que con el método isotópico solamente puede asegurarse una concentración de adulterante mayor a 7%.

- Investigación de Melaza

La presencia de melaza en la miel puede confirmarse analizando el contenido de cenizas de la muestra, si existe adulteración los valores serán anormalmente altos.

Un ensayo más específico que detecta bajas proporciones de melaza consiste en tomar 1 ml de una solución de miel al 20% y agregar 5 ml de metanol, agitar y dejar en reposo 3 minutos al cabo de los cuales se observa la presencia de flóculos o hebras en suspensión si contiene melaza, enturbiamiento u opalescencia no es reacción positiva.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Una vez realizados los análisis pertinentes podrá concluirse si existe una alteración, si el producto está adulterado o si se trata de una miel genuina.

Debe tenerse en cuenta que un sólo parámetro fuera de los límites aceptados no es concluyente de una alteración o adulteración, deben necesariamente realizarse los ensayos confirmatorios.

El análisis de los resultados puede abordarse desde dos puntos de vista diferentes. El primero de ellos, teniendo en cuenta las diferentes situaciones que pueden presentarse y analizando que parámetros se encontrarían afectados, el segundo partiendo de uno o más datos fuera de los valores normales, de los establecidos en la legislación vigente o de los universalmente aceptados para este alimento y concluir si existe adulteración o alteración.

PRIMER ENFOQUE

ALTERACIONES

Excesivo calentamiento, almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura no óptimas y acopio durante largos períodos

Si la miel es sometida a una o varias de las condiciones anteriormente expuestas se generan alteraciones que son muy comunes en el procesamiento de la miel. Se pueden detectar determinando los siguientes parámetros:

- El contenido de hidroximetilfurfural.
- La concentración de inhibina.

- La actividad diastásica.
- El contenido de agua.

Del análisis de los datos obtenidos puede inferirse si la miel fue sobrecalentada. Debe tenerse en cuenta que si se obtienen bajas actividades de diastasa, altas concentraciones de hidroximetilfurfural y valores altos de inhibina no puede, en una primera instancia, ser considerada miel sobrecalentada**.** Es necesario realizar análisis adicionales antes de arribar a una conclusión definitiva.

La miel puede generar suficiente cantidad de hidroximetilfurfural por excesivo calentamiento o debido a condiciones impropias de procesamiento y/o almacenamiento como para dar levemente positivo el ensayo con resorcinol. En cambio, una miel adulterada con jarabe en algunos casos da resultados francamente positivos. A pesar de esto es altamente recomendable cuantificar el HMF.

La determinación de la actividad diastásica no es muy útil dado que es difícil fijar un valor para poder considerar a la miel "calentada" porque es un parámetro muy variable entre las mieles de distintos orígenes. El método tiene baja sensibilidad y la diastasa es más resistente al calor que otras enzimas tales como la invertasa y la glucosa-oxidasa.

Fermentación

Los parámetros que resultan apropiados para confirmar esta alteración son:

- La acidez total.
- El contenido de glicerol.

En este caso no necesariamente deben observarse signos evidentes de fermentación y acidez alta pues puede ser un proceso de fermentación temprana, el contenido de glicerol estará aumentado.

Hidratación

La presencia de hidratación se confirma determinando:

- El contenido de humedad.

Este dato debe manejarse con cuidado porque pueden obtenerse altos contenidos de agua si la miel fue cosechada verde, antes que el panal fuese operculado, o si fue mal almacenada y absorbió humedad del ambiente. Es importante que el analista tenga presente que la miel es muy higroscópica y puede haber absorbido agua incluso durante su análisis.

ADULTERACIONES

Agregado de Edulcorantes Nutritivos

En general, cualquiera sea el edulcorante utilizado, los parámetros que van a encontrarse alterados son los siguientes:

- La composición cualitativa y cuantitativa de los azúcares.

El estudio de la distribución de los carbohidratos es un dato que puede ayudar a confirmar la presencia de la mayoría de los adulterantes anteriormente expuestos.

Mieles adulteradas con distintos jarabes de maíz y derivados de otros cereales pueden detectarse determinando la relación isomaltosa / maltosa por Cromatografía Gas-Líquido y en estudios más sofisticados como Espectrometría de Masa $^{13}C/^{12}C$.

Puede determinarse el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa por el método Polarimétrico o por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en este último caso podrá disponerse de un perfil de carbohidratos más completo.
Se recomienda hallar la relación fructosa / glucosa, en una miel genuina debe ser mayor o igual a 1,00.

Las proporciones de monosacáridos, disacáridos y azúcares superiores son características de la miel; valores de monosacáridos fuera del rango de 60-79%, de disacáridos más allá de 4-12% y contenidos de azúcares superiores mayores de 3,8% son indicativos de una adulteración. Dos o más valores fuera de esos rangos son concluyentes.
Si la concentración de glucosa excede el 40% puede concluirse que la miel no es genuina.

Existen mieles que naturalmente poseen valores de glucosa que superan los valores que normalmente se encuentran en miel (alrededor de 40%) como por ejemplo la miel de algodón y manzanita, entre otras. En este caso debe confirmarse con un análisis del polen si se trata de estas mieles, si se encuentra entre 38 y 40% de alguno de esos pólenes la miel podría ser genuina.

- El contenido de cenizas

En presencia de melaza el contenido de cenizas generalmente supera los valores normales.
La alcalinidad de las cenizas es relativamente constante en la miel al igual que la relación entre las cenizas solubles e insolubles.

Los valores normales de estos parámetros necesariamente se encontrarán alterados.

- El contenido de prolina

La prolina es un aminoácido propio de la miel y no forma parte de la composición normal de los jarabes. Independientemente del adulterante agregado el contenido de prolina será bajo.

- La actividad enzimática

La actividad de todas las enzimas de la miel estará disminuida.
Se encontrarán valores bajos de actividad de diastasa, de invertasa y de glucosa-oxidasa. En el caso de la diastasa pueden encontrarse valores normales dependiendo del grado de adulteración y del valor de actividad diastásica de la miel de partida ya que en muchos casos es marcadamente superior a 8 y disminuye sin llegar a alcanzar el valor mínimo que exige la legislación.

Es fundamental recordar que una disminución de la actividad de las enzimas puede deberse exclusivamente a un sobrecalentamiento. Una vez más se remarca la importancia de realizar varias determinaciones antes de arribar a una conclusión definitiva.

- El contenido de hidroximetilfurfural.

En particular, de acuerdo con el tipo de adulterante agregado, podrán observarse valores del contenido de HMF mayores a los que normalmente se encuentran en la miel.
Una adulteración con un jarabe de maíz obtenido por hidrólisis ácida es coincidente con un contenido de HMF muy alto. Muchas mieles adulteradas presentan valores normales de este parámetro.
Entre ambos extremos pueden hallarse mieles adulteradas con valores intermedios del contenido de HMF, en estos casos no es posible saber sin la ayuda de ensayos adicionales si el producto sobrepasa los límites aceptados por la legislación porque fue sobrecalentamiento o adulterado.

En particular, de acuerdo con el tipo de edulcorante nutritivo agregado, podrán observarse los siguientes resultados.

Jarabe de Glucosa

El agregado de jarabe de glucosa, obtenido por hidrólisis ácida o enzimática, a la miel es una de las adulteraciones más comunes. La investigación de maltodextrinas por Cromatografía en Capa Fina da positiva. Sus caracteres sensoriales están alterados.
Los parámetros que pueden encontrarse alterados como consecuencia de esta adulteración son:

- La viscosidad.

En algunos casos, dependiendo fundamentalmente de la cantidad de jarabe agregado, este parámetro presenta un cambio muy marcado. Cabe destacar que esta característica sensorial

no es la única afectada, en general los caracteres organolépticos del alimento se encuentran alterados.

- El contenido de hidroximetilfurfural.

Si los valores están comprendidos entre 10 y 20 mg% se puede sospechar que existe una adulteración. Cantidades mayores o iguales a 20 mg% indican probable utilización de jarabe proveniente de la hidrólisis ácida del almidón (FAO, 1986)

- El contenido de dextrinas totales.

Los valores son altos.

- Rotación óptica.

La miel se torna dextrorrotatoria. La desviación polarimétrica directa y luego de la inversión medidas a 20 °C (68 ºF) y a 87 °C (188,6 ºF) presentan valores altos.
La polarización constante directa alcanza valores más positivos que - 2°S. En este caso debe tenerse en cuenta que la miel de mielada puede presentar valores similares por lo tanto, es necesario realizar el ensayo para descartar que se trate de este tipo de miel.

- El contenido de cenizas.

El contenido de cenizas no se ve afectado pero la relación cenizas solubles / insolubles presenta valores anormales.

Jarabe de Azúcar Invertido

La detección del agregado de jarabe de azúcar invertido de caña o remolacha ofrece muchas dificultades debido a que su composición cualitativa y cuantitativa es semejante a la de la miel.

- El contenido de hidroximetilfurfural.

El contenido de HMF puede ser alto (no es un dato concluyente)

- Rotación óptica.

La polarización constante directa alcanza valores más positivos que - 2°S.

- El contenido de cenizas.

El contenido de cenizas es alto.

Jarabe de Maíz de Alta Fructosa

Se detecta mediante la investigación de maltodextrinas por Cromatografía en Capa Fina. Debe tenerse presente que en el mercado existen jarabes de maíz de alta fructosa que poseen muy bajo contenido de maltodextrinas, para que el resultado sea confiable debe pasarse previamente la muestra por una columna de carbón y celite.

- El contenido de dextrinas totales.

Podrían llegar a encontrarse valores altos de dextrinas (en la mayoría de las adulteraciones con JMAF el contenido de dextrinas es normal)

- La rotación óptica.

La desviación polarimétrica directa a 20°C (68ºF) y a 87°C (188,6ºF) es menos pronunciada que en el caso de la adulteración con jarabe de glucosa, la desviación de la luz polarizada después de la inversión, medida a 87°C (188,6ºF), es prácticamente nula.
La polarización constante directa medida puede alcanzar valores más positivos que - 2°S.

- El contenido de cenizas.

La relación cenizas solubles / insolubles presenta valores anormales.
El contenido de sodio y potasio está alterado. La miel normalmente es rica en K mientras que el jarabe de maíz posee alta concentración de Na debido al proceso de intercambio al cual se somete para su purificación. El método no es suficientemente selectivo pero puede ayudar en la investigación (White, 1978)

Sacarosa

Es una adulteración poco común. Las características físico-químicas de una miel mezclada con sacarosa son las siguientes:

- El contenido de sacarosa.

El contenido de este glúcido es anormalmente alto. Debido al bajo contenido de agua de la miel las enzimas no pueden invertir la totalidad de la sacarosa y queda gran cantidad de este azúcar.

- La observación microscópica.

Se detectan elementos histológicos de la caña de azúcar.

- La rotación óptica.

La polarización constante directa alcanza valores más positivos que - 2°S.

- El contenido de anhídrido sulfuroso.

Podría detectarse la presencia de SO_2.

Melaza

Dado el alto contenido de cenizas de la melaza el dato más útil para detectar esta adulteración es el contenido de materia mineral.

- El contenido de hidroximetilfurfural.

En este caso también se obtienen valores altos de hidroximetilfurfural.

- El contenido de cenizas.

El contenido de cenizas es anormalmente alto.
La relación entre las cenizas solubles e insolubles y la alcalinidad de las cenizas, valores relativamente constantes en la miel, están alteradas.

- La conductividad eléctrica.

La conductividad eléctrica es alta dada la alta concentración de minerales.

Agregado de Agua

- El contenido de humedad.

El contenido de humedad presenta valores anormalmente altos. Este dato debe manejarse con mucho cuidado porque pueden observarse valores altos si la miel fue cosechada verde, antes de que el panal fuese operculado, o si fue mal almacenada y absorbió agua del ambiente.
Debe recordarse que el producto es muy higroscópico, absorbe agua con mucha facilidad incluso cuando se abre el recipiente para tomar la muestra de laboratorio.

- La composición cualitativa y cuantitativa de los azúcares.

El contenido de azúcares será bajo dependiendo de la cantidad de agua agregada, es necesario comprobar que no contenga azúcares ajenos a su composición mediante el ensayo de investigación de maltodextrinas por Cromatografía en Capa Fina.

- El contenido de prolina.

Dependiendo de la cantidad de agua agregada el contenido de prolina puede encontrarse disminuido.

- Actividad enzimática.

En la mayoría de los casos la actividad de todas las enzimas de la miel estará disminuida.

- Acidez.

La acidez puede llegar a presentar valores altos porque el medio se torna favorable para el desarrollo de las levaduras.

SEGUNDO ENFOQUE

Viscosidad

En algunos casos el cambio en la viscosidad de la miel es muy marcado, aunque en general todos los caracteres sensoriales del alimento se encuentran alterados:

- Adulteración, principalmente con jarabe de glucosa.

Observación Microscópica

Se encuentran elementos histológicos ajenos a la miel:

- Adulteración con sacarosa. Se observan elementos histológicos de caña de azúcar.
- Adulteración con jarabe de maíz. En aquellos casos en los cuales la adulteración es muy pronunciada pueden observarse amiloplastos de maíz.

Hidroximetilfurfural

- Si el contenido de HMF supera los 40 mg/kg puede deberse a las siguientes razones:
- Calentamiento excesivo.
- Almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura no óptimas.
- Acopio durante largos períodos.
- Adulteración con jarabe de glucosa o de azúcar invertido.

Debe tenerse en cuenta que en países o regiones de clima tropical se acepta hasta 80 mg/kg, en estos casos deberá verificarse el país de origen para demostrar a que temperatura ambiente fue expuesto el producto.

Inhibina

Si el contenido de agua oxigenada es bajo:

- Calentamiento excesivo.
- Almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura no óptimas.
- Acopio durante largos períodos.
- Agregado de agua.

Actividad Diastásica

Si el valor de la actividad diastásica es menor a 8 Unidades puede deberse a:

- Calentamiento excesivo.
- Almacenamiento en condiciones de humedad y temperatura no óptimas.
- Acopio durante largos períodos.
- Adulteración con jarabes de maíz o de otros cereales.
- Agregado de agua.

Actividad de Invertasa

Si la actividad de invertasa es baja:

- Proceso de fermentación temprana interrumpido por tratamiento térmico.
- Adulteración con jarabes.
- Agregado de agua.

Actividad de Glucosa-Oxidasa

Si la actividad de glucosa-oxidasa es baja:

- Proceso de fermentación temprana interrumpido por tratamiento térmico.
- Adulteración con jarabes.

- Agregado de agua.

Agua

Si el contenido de agua supera 20 gramos %:

- Mal manejo apícola.
- Almacenamiento en condiciones de humedad no óptima.
- Acopio durante largos períodos.
- Adulteración por agregado de agua.

Acidez Total

Si la acidez total supera los 50 miliequivalentes / kilogramo de miel:

- Proceso de fermentación.
- Mal manejo apícola (Varroasis)
- Agregado de agua. En este caso el aumento de la acidez es una consecuencia de la adulteración ya que el medio se torna más favorable para el desarrollo de las levaduras fermentadoras de azúcares.

Glicerol

Si el contenido de glicerol es mayor de 50 miligramos / kilogramo de miel:

- Inicio de fermentación.
- Proceso de fermentación temprana interrumpido por tratamiento térmico.
- Fermentación.

Azúcares

Si los valores de los monosacáridos se encuentran fuera del rango de 60 a 79 g% y los disacáridos más allá de 4 a 12 g%, la relación glucosa / fructosa alterada (normalmente está comprendida entre 1:1 y 1,5:1) y/o la relación isomaltosa / maltosa resulta mayor a 0,51 y/o las propiedades polarimétricas no son las esperables:

- Agregado de agua.

- Agregado de jarabes de maíz o de otros cereales.

- Agregado de cantidades significativas de azúcares provenientes de maíz y/o caña. La relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ se halla fuera de los valores normales (valores de $\delta^{13}C$ menos negativos que –21,4°/∞ (19,9°/∞ para la miel de citrus))

- Agregado de sacarosa. En este caso el valor que se encuentra francamente alterado es la concentración de los disacáridos.

- Fermentación. En este caso si hubiera una alteración de la composición de glúcidos los signos de fermentación serían muy notorios y no sería necesario un ensayo confirmatorio.

Si el contenido de dextrinas y azúcares superiores supera los 3,8 g% y el análisis por Cromatografía en Capa Fina presenta una serie de manchas, de color azul, que se extienden desde el origen:

- Agregado de jarabes de maíz o de otros cereales.

Cenizas

Si el contenido de cenizas es mayor a 0,5 o 1,2 gramos % (dependiendo del origen de la miel) y la relación entre las cenizas solubles / insolubles se presenta alterada:

- Malas prácticas de manufactura. En este caso el alto valor debería coincidir con un valor también elevado del contenido de sólidos insolubles en agua.

- Adulteración con melaza y/o jarabe de azúcar invertido. Además de lo anteriormente expuesto el valor de la alcalinidad de las cenizas no es el esperable.

- Adulteración con jarabe de glucosa o jarabe de maíz de alta fructosa. La relación entre las cenizas solubles e insolubles presenta valores anormales.

- Corrección de la acidez debido a un proceso de fermentación. En este caso el valor que se encuentra francamente alterado es la alcalinidad de las cenizas.

Conductividad Eléctrica

Si la conductividad eléctrica no está comprendida entre los valores normales (0,1 a 0,7 mS/cm para mieles florales) o mayor de 1 mS/cm para miel de mielada o de castaño:

- Malas prácticas de manufactura. En este caso el alto valor debería coincidir con un valor también elevado del contenido de sólidos insolubles en agua.

- Adulteración con melaza.

Prolina

Si el contenido de prolina es menor a 180 miligramos / kilogramo:

- Agregado de agua.
- Adulteración con edulcorantes nutritivos.

BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 930.18. Glycerol in Beer. Dichromate Oxidation Method. *Washington, DC. Sec. 27.1.17. Chap. 27, pp. 6.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 948.13. Glycerol in Eggs. Quantitative Method. *Washington, DC. Sec. 34.1.14. Chap. 34, pp. 6.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 959.12. Glucose (Commercial) in Honey. Qualitative Chromatographic Method. *Washington, DC. Sec. 44.4.14. Chap. 44, pp. 26.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 978.17. Corn and Cane Sugar Products in Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.17. Chap. 44, pp. 27.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 979.22. High Fructose Starch Syrup in Honey. Thin Layer Chromatographic Method. *Washington, DC. Sec. 44.4.16. Chap. 44, pp. 26-27.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 991.41. C-4 Plant Sugars in Honey. *Washington, DC. Sec. 44.4.18. Chap. 44, pp. 29.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 991.46. Glycerol in Wine and Grape Fruit. Liquid Chromatographic Method. *Washington, DC. Sec. 28.1.11. Chap. 28, pp. 3-4.*

Becker Dr. et Schweitzer, M. Fermentation des Miels. Intérêt du Dosage du Glycérol (Glycérine) Consulta del 21 de marzo, 2004. *http://www.beekeeping.com/abeille-defrance/articles/fermentation_miels.htm* .

C.A.C. Codex Alimentarius Commission. Recommended European Regional Standard for Honey (1969) *CAC/RS 12.*

C.A.A. Código Alimentario Argentino. Tomo I-a. Disposiciones Generales (1980) *De La Canal & Asociados S. R. L., Buenos Aires. Anexo I, Capítulo I, pp. 38 -38.1.*

Doner, L. W., White J. W. Jr. and Phillips J. G. Gas-Liquid Chromatographic Test for Honey Adulteration by High Fructose Corn Syrup (1979) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.62, N°1, pp. 186-189.*

Doner, L.W., Brause, A.R. and Petrus, D.R. δ^{18}O Measurements in Water for Detection of Sugar Beet-Derived Syrups in Frozen Concentrated Orange Juice: Collaborative Study (1992) *Journal of Official Association Agricultural Chemists. Vol.75, N° 6, pp. 1107-1111.*

FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 14/8. Food Analysis: Quality, Adulteration and Tests of Identity (*1986) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, pp. 114-117.*

Fattori, S. B., Gandía S. R. de y Laferriere M. E. Investigación de Dextrinas Ajenas a la Miel. Consulta del 6 de julio, 2002. *http://www.apiservices.com/articulos/dextrinas.htm.*

Kerkvliet, J,D., Shrestha, M., Tuladhar, K. and Manandhar, H. Microscopic Detection of Adulteration of Honey with Cane Sugar and Cane Sugar Products (1995) *Apidologie 26 (2), pp. 131-139.*

Kerkvliet, J,D and Harro, A. J. Meijer. Adulteration of Honey: Relation Between Microscopic Analysis and δ^{13}C Measurements (2000) *Apidologie 31, 717-726.*

Kushnir, I. Sensitive Thin Layer Chromatographic Detection of High Fructose Corn Syrup and Other Adulterants in Honey (1979) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.62, N°4, pp. 917-926.*

Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos Químicos e Físicos para Analíse de Alimentos (1976) *2ª ed. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, pp. 163-164.*

Orbán, G. und Stitz, J. Die Fluorescenz der Honige im ultravioletten Licht (Nov./Dez. 1928) *Zeitschr. f. Untersuchung der Lebensmittel. 56. Band., pp. 467-471*.

Pujola, D. V. M., Centelles, E. Alimentación Artificial. Influencia en la Composición de Azúcares de la Miel (1993) *Vida Apícola Nº 57, pp. 20-24.*

SAGPyA. Miel: Buenas Prácticas de Manufactura. Guía de Aplicación. Normas y Legislación Vigente (1998) *Buenos Aires. El Obrador Gráfica + Diseño S.R.L. pp. 19.*

Sivakesava, S. and Irudayaraj, J. Prediction of Inverted Cane Sugar Adulteration of Honey by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (2001) *Journal of Food Science Vol. 66, N°7, pp. 972-978.*

White, J. W., Jr. Report of the Analysis of Honey (1959) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.42, N°2, pp.341-348.*

White, J. W., Jr. Physical Characteristics of Honey. In: "Honey: A Comprehensive Survey" (1975) *ed. Crane E., pp. 157-200.*

White, W. J., Jr. and Doner L. W. Mass Spectrometric Detection of High-Fructose Corn Syrup in Honey by Use of $^{13}C/^{12}C$ Ratio: Collaborative Study (1978) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.61, N°3, pp. 746-750.*

White, J. Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method for Determination of C-4 Plant Sugars in Honey: Collaborative Study, and Evaluation of Improved Protein Preparation Procedure (1992) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.75, N° 3, pp. 543-548.*

CAPÍTULO VI

RESIDUOS Y CONTAMINANTES

√ **Pesticidas**

√ **Sulfonamidas**

√ **Antibióticos**

√ **Fenoles**

√ **Minerales**

RESIDUOS Y CONTAMINANTES

El análisis de los contaminantes y residuos presentes en un alimento es muy complejo, dada la gran diversidad de compuestos químicos que pueden encontrarse. Esta clase de análisis requiere de personal altamente especializado y de métodos instrumentales que permitan separar compuestos similares y cuantificar cantidades del orden de trazas.

Los contaminantes pueden introducirse en el alimento en cualquier punto de la cadena de producción, desde la recolección del néctar hasta el envasado del producto.
Desde el punto de vista de la salud pública los residuos y contaminantes deben mantenerse a niveles que aseguren la aptitud para el consumo del producto.

En este capítulo se presenta una síntesis de los posibles métodos y su aplicación para la determinación de los distintos residuos y contaminantes en la miel.

El Codex Alimentarius en su Volumen 1 (Codex, 1991) adopta las siguientes definiciones:

Contaminante*: cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de contaminación ambiental. Este término no abarca fragmentos de insectos, pelos de roedores y otras materias extrañas.*

Plaguicida*: cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas y animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger al producto contra el deterioro durante el almacenamiento o transporte. El término no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.*

Residuos de plaguicida*: cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción, y las impurezas consideradas de importancia toxicológica.*

La legislación alimentaria de la Unión Europea, en su Volumen 1 - Contaminantes, adopta la siguiente definición:

Residuo de Medicamento Veterinario: *todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate".*

Las tolerancias aceptadas para determinados contaminantes están incluidas en la legislación argentina, de la Unión Europea y en el Codex Alimentarius.
La Unión Europea no solamente legisla los límites máximos tolerables sino también los métodos de análisis y sus límites de detección.
El Codex Alimentarius (C.A.C., 1999) adopta métodos de análisis para los contaminantes y residuos de medicamentos veterinarios.

La miel es un alimento natural y como tal debe estar libre de contaminaciones pero la realidad indica todo lo contrario. La contaminación ambiental, la presencia de productos químicos en el entorno y el uso indebido de medicamentos para tratar las enfermedades de las abejas resultan perjudiciales para la apicultura. En ausencia de esos factores se obtendría un producto que muy bien podría ser encuadrado dentro del grupo de los alimentos orgánicos o ecológicos.

- RESIDUOS

Los distintos productos químicos que pueden contaminar la miel provienen de diferentes orígenes:

- Tratamiento y prevención de enfermedades de las abejas.
- Flores contaminadas que introducen residuos a través del néctar y el polen.
- Uso de plaguicidas para tratamiento fitosanitario de frutales y cultivos.
- Uso de formicidas y otros productos utilizados para ahuyentar a las abejas en el momento de la recolección de la miel.
- Desinfección de colmenas.
- Plantas y flores con principios activos tóxicos.

Con el fin de proteger a las abejas de enfermedades que en algunos casos producen la muerte de la colonia, los apicultores utilizan diferentes medicamentos. Si no se aplican correctamente y se siguen estrictamente las instrucciones que acompañan al producto la miel posee residuos de esos medicamentos.

En algunos casos son las mismas abejas las que introducen los contaminantes en la colmena ya que son incapaces de reconocer las flores contaminadas con pesticidas. Es así como, sin saberlo, transportan esos residuos a la miel a través del néctar o el polen contaminados (Ogata, 1973)

El uso de sustancias tales como benzaldehído y fenol para ahuyentar a las abejas es una importante fuente de contaminación. Se aconseja utilizar humo o combustibles orgánicos no polucionantes o medios físicos.
Los anhídridos butírico y propiónico son también usados para alejar temporalmente a las abejas de la colmena.

Los productos utilizados para la desinfección de las colmenas representan otra substancial fuente de contaminación. En la República Argentina el Anexo VIII de la Resolución 270/00 de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación referente a las normativas sobre producción apícola orgánica modificado por Resolución 451 del 17/8/2001 (modificatoria de la Resolución SENASA 1286/93) recomienda el uso de: cal y cal viva, hipoclorito de sodio, ácidos acético, fórmico, láctico y oxálico, alcohol, formaldehído y soda cáustica o la aplicación de un tratamiento térmico.

El nivel de residuos que puede encontrarse en la miel dependerá de la vía mediante la cual llegaron al alimento. Los residuos de medicamentos veterinarios son mayores que aquellos contaminantes transportados por la abeja a través del néctar, estos últimos se encuentran en el orden de trazas.

Existen mieles tóxicas que provienen de plantas con principios activos tóxicos, cuando las abejas liban el néctar de las flores transportan esas sustancias a la miel. Entre estas flores se pueden citar las pertenecientes a los géneros: *Kalmia, Rhododendron, Arbutus, Atropa* y algunas especies de los géneros: *Ericaceae* y *Euphorbiaceae.* Esos compuestos pertenecen al grupo de los alcaloides, en algunos casos con acción narcótica o convulsionante.
También existen mieles de mielada tóxicas tales como la miel del árbol *Coriaria arborea* oriundo de Nueva Zelanda (Horn, 1996)

Pesticidas

La detección y cuantificación de los pesticidas que contaminan la miel son críticas tanto para la salud pública como para el comercio internacional.

En la miel se han encontrado residuos de diferentes pesticidas órgano-clorados tales como Hexaclorobenceno, Dieldrin-Endrin, Aldrin, α-Hexaclorociclohexano, β-Hexaclorociclohexano y Mirex y órgano- fosforados que generalmente se utilizan para combatir las plagas de cultivos y frutales.

La varroasis es una enfermedad ampliamente difundida causada por un ácaro, *Varroa jacobsoni*. Afecta a la abeja *Apis mellifera* en todos los estadíos de su desarrollo causando graves pérdidas en la colmena. Los compuestos químicos más comúnmente usados para combatirla son: Amitraz, Bromopropilato, Cimiazol, Cumafos, Diclorobenceno, Flumetrina, Fluvalinato, Mercaptotion (Malation), Tetradifon, Clordimeform y los ácidos fórmico y oxálico. El Cumafos posee un alto nivel de residualidad y es sumamente tóxico, su uso no está aprobado para la apicultura.
La mayoría de estos productos son pesticidas, altamente tóxicos para el hombre y para la abeja, su uso entraña riesgo de contaminación de la miel y de la cera. Se han registrado casos de abuso de pesticidas con el propósito de luchar contra un determinado ácaro. La implicancia inmediata fue la muerte de toda la colonia con la consecuente pérdida para el apicultor.
En muchos casos se utilizan productos no registrados, de preparación casera, los que se aplican sin tener en cuenta instrucciones de uso y en la mayoría de los casos se superan las dosis apropiadas.

Los productos aprobados en la República Argentina para uso en apicultura son: Amitraz, Cimiazol, Clortetraciclinas, Diclorobenceno, Flumetrina, Fluvalinato, Fumagilina, Morestan y Oxitetraciclina.

El uso indiscriminado de medicamentos para combatir las distintas enfermedades de las abejas genera cepas resistentes, para eliminar los ácaros deben aplicarse dosis cada vez mayores y en el alimento quedan residuos tanto de los pesticidas como de sus metabolitos. Otra consecuencia adversa reside en el hecho de que predisponen a la abeja a una mayor parasitación.

Los medicamentos no deben aplicarse como tratamiento preventivo.

De lo anteriormente expuesto se deduce que en la mayoría de los casos, los residuos que quedan en el producto son consecuencia de un mal manejo apícola, porque no se respetan los períodos de carencia del medicamento o se aplican en presencia de alzas melarias.

El Anexo VIII de la Resolución 270/00 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la República Argentina recomienda el uso de ácido láctico, oxálico y fórmico, rotenona y aceites esenciales tales como timol, eucaliptol y mentol para el tratamiento específico de la varroasis (la Resolución 451/01 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación elimina la autorización de uso de la rotenona) sólo en aquellos casos en los cuales el nivel parasitario es alto. Los tratamientos deben llevarse a cabo cuando sea mínima la cantidad de cría operculada y lejos de la época de recolección del néctar ya que los residuos tóxicos prevalecen varias semanas en la colmena luego de la aplicación del tratamiento.

En aquellos casos en los cuales se emplea ácido fórmico u oxálico para el tratamiento de los ácaros productores de varroasis pueden quedar residuos en el producto, se encuentran niveles mayores de estos ácidos normalmente presentes en la miel. El análisis de estos compuestos puede llevarse a cabo mediante un ensayo enzimático combinado con una determinación espectrofotométrica al UV (Wehling, 2003)

El timol también es efectivo contra el ácaro y las abejas presentan una alta tolerancia a este compuesto (Bogdanov, 2004)
Se aplica al finalizar el verano y solamente se detectan sus residuos en la miel o en la cera luego de varios años de tratamiento. La presencia de timol en la miel puede afectar su flavor característico.
En Suiza se acepta hasta 0,8 miligramos de timol / kilogramo de miel porque esa concentración no altera las características sensoriales del alimento.
Es posible reducir el nivel de residuos que quedan en el producto aplicando el tratamiento en épocas en las no hay flujo de néctar pero la eficiencia ya no es tan buena.

El mentol ofrece una alternativa para el tratamiento de la enfermedad traqueal causada por el ácaro *Acarapis woodi.* Es efectivo a temperaturas mayores de 15 °C (59 ºF) y puede emplearse en lugar del Amitraz.

La determinación de ambos compuestos puede realizarse por Cromatografía Gas-Líquido, con un límite de detección para el timol de 0,02 mg/kg (Bogdanov, 2003)

A raíz del uso de plaguicidas para el tratamiento fitosanitario de frutales y cultivos las abejas introducen residuos en la miel a través del néctar y el polen. En este caso la gama de pesticidas que pueden encontrarse es muy extensa. En general podría afirmarse que cualquier pesticida órgano-clorado u órgano-fosforado utilizado en agricultura puede estar presente.

El Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel estable que los límites de pesticidas deberán cumplir con la Resolución GMC 62/92 sobre Residuos de Plaguicidas en los Productos Agrícolas.

La Resolución 125/98 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la República Argentina adopta un criterio integral respecto de los controles a realizarse para detectar la presencia de residuos de sustancias químicas sintéticas y naturales, el Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos (CREHA, 2003) autoriza la presencia de 20 μg/kg de Amitraz, de 5 μg/kg de Fluvanilato y de diversos pesticidas órgano-clorados y órgano-fosforados.

Entre los primeros puede detectarse hasta 4 μg/kg de Hexaclorobenceno, Dieldrin, Aldrin o α-Hexaclorociclohexano, 2 μg/kg de Mirex más β-Hexaclorociclohexano, 4 μg/kg de Heptacloro más Heptacloroepóxido, 6 μg/kg de γ-Hexaclorociclohexano, 4μg/kg de α y β-Clordano más Oxiclordano más Endrin, 4 μg/kg de α y β-Endosulfan más Endosulfan sulfato, 8 μg/kg de DDT y sus metabolitos y 30 μg/kg de Metoxicloro.

Entre los residuos de plaguicidas fosforados que pueden detectarse se encuentran: Diazinon, Bromofos, Etilbromofos, Clorfenvinfos, Fenitrotion, Etion y Fention hasta 10 μg/kg, Clorpirifos hasta 2 μg/kg y Cumafos hasta 20 μg/kg.

Cabe aclarar que los límites establecidos corresponden a los límites de detección de los métodos analíticos utilizados para su análisis.

El Codex Alimentarius exige que los límites máximos de residuos de pesticidas, medicamentos veterinarios y residuos extraños se ajusten a los límites establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius.

Las Directivas 86/363/CEE, 94/29/CEE y sus modificaciones posteriores fijan los contenidos máximos para los residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Mediante la Decisión 2003/485/CE, modificatoria de la Decisión 2000/159/CE, la Comunidad Económica Europea aprobó el Plan Anual de monitoreo y vigilancia para la detección y el control de residuos en los productos de origen animal exportados a ese destino entre los cuales se encuentra la miel.

En particular, el Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos establece límites de pesticidas para la miel y la cera. En el caso del Amitraz los límites son de 1,0 y 6,0 mg/kg respectivamente.

Alemania, en un Decreto Oficial de 25 de abril de 1988 fijó un límite de 0,1 mg/kg para el Bromopopilato y 0,01 mg/kg para el Cumafos.

Métodos de análisis

El método analítico que se elija para llevar a cabo el análisis dependerá del pesticida cuya presencia se desea investigar. Deben tenerse en cuenta la estructura química y los grupos funcionales, tanto del pesticida como de otros compuestos que puedan ser extraídos juntamente con la sustancia de interés, y que puedan interferir en la determinación posterior.

Independientemente del método elegido para la cuantificación de los pesticidas siempre es necesario realizar un paso previo de extracción y purificación, al igual que una separación adecuada que asegure un alto porcentaje de recuperación. La miel, como la mayoría de los alimentos, es una matriz compleja y eso debe tenerse muy en cuenta a la hora de elegir el procedimiento que se va a seguir para la preparación de la muestra previamente al análisis.
El grado de extracción del pesticida depende de la naturaleza de la muestra y de la facilidad de desorción de la columna utilizada y transferencia de los pesticidas (Jiménez, Bernal, Nozal y Toribio, 1998)

Este paso, fundamental para obtener resultados confiables, puede consistir desde una sencilla extracción con fase móvil o en fase sólida hasta la sofisticada técnica de utilización de fluidos supercríticos (dióxido de carbono de alta densidad)
En la bibliografía se reportan distintos métodos de extracción de residuos de plaguicidas.

Fluido supercrítico (Atienza et. al., 1993)

La extracción se lleva a cabo en un extractor de fluido supercrítico usando CO_2 como extractante. Antes de la extracción la muestra debe liofilizarse, se diluyen 10 partes de miel en 3 partes de agua, se mezcla con celulosa en polvo para facilitar la liofilización, se homogeneiza por agitación y se congela a - 40 °C (40 ºF) antes liofilizarla.
Para realizar la extracción se agrega una mezcla adecuada de solventes orgánicos a una porción de la muestra liofilizada.

Micro extracción en fase sólida (Jiménez, Bernal, Nozal y Martín, 1998)

Se utiliza polidimetilsiloxano de 100 μm. Se trabaja con 4 ml de una solución de miel 20%, en pequeños viales y en presencia de NaCl para facilitar la extracción.
Este método tiene la ventaja, frente a otros, que no utiliza solventes orgánicos y la operación es relativamente simple. La reproducibilidad es menor que en otros métodos tales como extracción con solvente o en fase sólida.
Sus autores la recomiendan como técnica semicuantitativa.

Extracción con solvente orgánico

Se realiza un “clean-up” en una columna de Florisil, con el fin de eliminar los pigmentos que interfieren. Se utiliza la mezcla de solventes orgánicos elegida de acuerdo con la naturaleza de los pesticidas que se desean analizar. Por ejemplo, los compuestos órgano-clorados se extraen con éter de petróleo y diclorometano (Amáncio Guerra Peixoto, 1986)

Extracción en fase sólida (Jiménez, Bernal, Nozal y Toribio, 1998)

Se emplea octadecilsilano como extractante y una mezcla de agua / metanol como diluyente.
El porcentaje de recuperación es muy bajo, alrededor del 10%.

Antes de la extracción la miel debe diluirse, en algunos casos la solución de muestra se prepara en presencia de cloruro de sodio para favorecer el procedimiento. La cantidad de muestra que se utilizará va a depender de los niveles de residuo buscados, en la mayoría de

los casos se trata de concentraciones del orden de los microgramos por kilogramo de muestra o menores.

La naturaleza del solvente de extracción se elegirá según el tipo de plaguicida que se desee estudiar y del método adoptado para llevar a cabo la determinación. Es de suma importancia que el solvente posea la polaridad adecuada porque de lo contrario podría mezclarse con la muestra (miel u otros productos de la colmena) o no extraer totalmente el plaguicida.
En general se utilizan mezclas de dos solventes, los más comúnmente usados son: n-hexano, acetona, éter de petróleo, éter etílico, acetato de etilo, benceno, isopropanol y acetonitrilo.

Otra consideración relevante es la calidad de los reactivos y patrones usados. Los solventes orgánicos y el agua deben ser de altísima pureza. Siempre deben chequearse bajo las condiciones del método que se va a aplicar.
Los patrones que se utilicen deben ser certificados para asegurar su absoluta pureza. Debe tenerse en cuenta que las sustancias patrón son inestables, su vida útil depende del solvente en el cual hayan sido disueltos y de las condiciones de almacenamiento.
Las gomas, el plástico y la lana de vidrio son potenciales fuentes de contaminación por lo tanto deben tomarse los recaudos necesarios para asegurar su pureza.
Las condiciones de transporte, conservación y almacenamiento de las muestras, previamente a su análisis, son críticas para lograr un análisis confiable.

La metodología más comúnmente utilizada para identificar y cuantificar estos residuos es la Cromatografía Gaseosa Capilar con detectores selectivos (captura electrónica, nitrógeno - fósforo (N-P) e ionización de llama)
En algunos casos el análisis se complementa con detector de masa para confirmar la identidad de picos desconocidos, el límite de detección está comprendido entre 1 y 10 μg/kg (Bogdanov, 2003)

La mayoría de los plaguicidas se descomponen rápidamente y lo que se encuentra en el análisis son sus productos de degradación (Bernal et. al., 1998)

Aplicando la Cromatografía Gas-Líquido se detecta y cuantifica el Fluvalinato, el Amitraz y el Bromopropilato.

Otro método alternativo para el análisis de algunos pesticidas, por ejemplo el Cimiazol también utilizado para combatir la *Varroa,* es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución utilizando un detector UV. El límite de detección para la determinación de los pesticidas sintéticos es mayor que el alcanzado con la Cromatografía Gas-Líquido, oscila entre 10 y 50 μg/kg (Bogdanov, 2003)

Ambos métodos cromatográficos pueden complementarse con la Cromatografía en Capa Fina. Se siembra la muestra y las porciones de los distintos pesticidas separados se raspan de la placa y se analizan separadamente.

Estos métodos pueden aplicarse a otros productos de la colmena. La principal diferencia con la miel reside en el método de extracción del pesticida ya que éste debe adecuarse a la naturaleza del producto. No es lo mismo analizar Fluvanilato en miel que en propóleos o en polen.

- **Investigación de Fluvanilato**

El Fluvanilato es un piretroide sintético con actividad acaricida. Es insoluble en agua y posee una gran tendencia a unirse a partículas sólidas. El acaricida, como compuesto, generalmente no se encuentra en la miel porque se degrada rápidamente debido al procedimiento fitosanitario usado para aplicar el medicamento, a la acidez propia de la miel y a la actividad diastásica. Son sus metabolitos los que pueden detectarse en el producto.

Usualmente el Fluvanilato en miel se determina mediante métodos que involucran una extracción del componente y subsiguiente purificación. El pesticida aislado se analiza por cromatografía.

Se pesan 150 gramos de miel y se extraen con benceno / isopropanol (7:3) El extracto se evapora en atmósfera de nitrógeno a 35 °C (95 ºF) y el residuo se disuelve en 0,5 ml de etanol.
La técnica de extracción con solventes orgánicos puede reemplazarse por la extracción con fluido supercrítico, se alcanza un mayor porcentaje de recuperación.

Las condiciones bajo las cuales se realiza la extracción, partiendo de la muestra preparada como se explicó anteriormente son las siguientes:

- Densidad de flujo: 0,45 g/ml.
- Presión: 138 bar.
- Temperatura en el cilindro de extracción: 70 °C (158 ºF)
- Flujo: 0,8 ml/min.
- Tiempo de extracción: 20 minutos.

Métodos de Análisis (Atienza, et. al., 1993)

Cromatografía en Capa Fina

Una de las técnicas alternativas es la Cromatografía en Capa Fina bidimensional, en placa de sílica gel, previa al análisis por Cromatografía Gas-Líquido o Cromatografía Líquida.
La Cromatografía en Capa Fina también puede utilizarse como paso de purificación.

Se eligen mezclas de polaridad media como solvente de elución. El Fluvanilato puede encontrarse en presencia de otros pesticidas tales como Amitraz, Cumafos, Bromopropilato o Clordimeform. Los solventes no polares no permiten eluir los compuestos, los muy polares arrastran a todos los componentes y no se logra una separación adecuada.
Se recomienda utilizar cloroformo / etanol (1:1) como primer solvente de elución y a continuación tolueno / tetracloruro de carbono (4:1) Las manchas se revelan a 254 nm, se raspan, se disuelven en metanol y se analizan separadamente por cromatografía.

Con este procedimiento se separó Fluvanilato de Bromopropilato y Cumafos y se analizó posteriormente por Cromatografía Gas-Líquido.

Cromatografía Gas-Líquido

El Fluvanilato se descompone a alta temperatura lo que obliga a identificar los compuestos de degradación en conjunción con Espectrometría de Masa (GC/MS) o Emisión Atómica (GC/AED)

Las condiciones de trabajo se detallan a continuación:

- Columna: capilar.
- Gas carrier: helio.
- Detector: de captura electrónica o N-P. Se trabaja a 300 °C (572 ºF)
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra, comparando las áreas de los picos en las muestras y en las soluciones patrón.
- Otros parámetros:
  g) Se trabaja con un flujo de 0,6 ml/min.
  h) La temperatura en el puerto de inyección es de 200 °C (392 ºF). La temperatura inicial de la columna se mantiene durante 5 minutos a 125 °C (257 ºF), se programa a 2,5 °C/min (36,5 °F/min) La temperatura final, de 270 °C (518 ºF), se mantiene constante durante 15 minutos.
  c) Las concentraciones de los diferentes metabolitos se calculan utilizando el método del patrón externo sobre la base de curvas de calibración preparadas con cada uno de los patrones de los metabolitos del Fluvanilato.
  i) El volumen de inyección es de 5µl.

Los resultados se expresan en microgramos de cada componente por 1000 gramos de miel.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Con este método se evita el problema de la descomposición del Fluvanilato por el calor pero se logra menor sensibilidad que con la Cromatografía Gas-Líquido.

Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

- Columna: C_{18}.
- Fase móvil: acetonitrilo / agua (80:20) conteniendo 14ml/l de ácido acético 0,01 M.
- Detector: UV. La longitud de onda de análisis es de 254 nm.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  j) Se trabaja con un flujo de 1,5 ml/min.
  k) Se trabaja con patrones externos; el aparato mide las alturas o las áreas de los picos correspondientes a cada uno de los constituyentes de la muestra referidas al valor correspondiente del patrón.
  l) El volumen de inyección es de 20μl.

Los resultados se expresan en miligramos por 1000 gramos de miel.

- Investigación de pesticidas órgano-clorados

La determinación de los plaguicidas órgano-clorados se realiza por Cromatografía Gas-Líquido, previa extracción y posterior purificación por columna de extracción en fase sólida.

Se parte de aproximadamente 25 gramos de miel disuelta en agua y se extrae con hexano, se seca con Na_2SO_4 y se evapora el solvente hasta 1 ml. Se pasa a través de una columna de Florisil (paso de purificación), los pesticidas se extraen con 15% de dietiléter en hexano.

La detección cromatográfica de estos contaminantes puede realizarse bajo las siguientes condiciones (Fernández Muiño, 1991):

- Columna: capilar, BP-1 o similar.

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: de captura electrónica ^{63}N. Se trabaja a 250 °C (482 ºF)

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra, comparando las áreas de los picos en las muestras y en las soluciones patrón.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 0,5 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 250 °C (482 ºF) La temperatura inicial de la columna se mantiene durante 1 minuto a 50 °C (122 ºF), se programa a 20 °C/min (68 °F/min) desde 60 °C (140 ºF) hasta los 175 °C (347 ºF) y luego a 3 °C/min (37,4 °F/min) hasta 240 °C (464 ºF)
  c) Las concentraciones de los diferentes pesticidas se calculan utilizando el método del patrón externo sobre la base de curvas de calibración preparadas con cada uno de los patrones de los pesticidas cuya presencia se desea comprobar.
  d) El volumen de inyección es de 1μl.

Los resultados se expresan en microgramos de cada componente por 1000 gramos de miel.

Utilizando esta técnica es posible separar y cuantificar Lindano (γ-Hexaclorociclohexano), Heptacloro, Aldrin, Heptacloroepóxido, Dieldrin, p,p'-DDT y Metoxicloro.

Otro método (Amáncio Guerra Peixoto, 1996) que demostró ser eficaz para el estudio de estos compuestos y que es capaz de retener los pigmentos que son coextraídos utiliza un "clean-up" con columna de Florisil y elución con hexano y benceno / hexano (70:30)

Se parte de 60 gramos de miel y se disuelve en 50 ml de agua y 100 ml de acetona.
La extracción de los compuestos órgano-clorados se realizada con éter de petróleo y a continuación diclorometano.

Las condiciones cromatográficas aplicadas son las siguientes:

- Columna: 1,5% OV-17 + 1,95% QF_1 o 1,5% DC-200 + 1,5% QF_1.

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: de captura electrónica con fuente radioactiva de tritio. Se trabaja a 220 °C (428 ºF)

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 30 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 230 °C (446 ºF) La temperatura de la columna debe ser constante, de 215 °C (419 ºF)
  c) Las concentraciones de los diferentes pesticidas se calculan utilizando el método del patrón externo sobre la base de curvas de calibración preparadas con cada uno de los patrones de los pesticidas cuya presencia se desea comprobar.

Los resultados se expresan en miligramos de cada componente por 1000 gramos de miel.

Fueron identificados y cuantificados: Aldrin, α, β, γ, y δ HCH, Heptacloroepóxido, isómeros y metabolitos de DDT, Dieldrin y Eldrin.

- Investigación de pesticidas órgano-fosforados

Los pesticidas órgano-fosforados son los más usados porque se degradan más fácilmente y como consecuencia producen menor efecto adverso en el ambiente.
Este grupo de pesticidas se determina por Cromatografía Gas-Líquido, previa extracción con solventes orgánicos y purificación del extracto mediante extracción en fase sólida.

La muestra se prepara disolviendo 25 gramos de miel en una mezcla de acetonitrilo / agua (2:1) y se extrae con éter de petróleo. Luego de purificarla a través de una columna de Florisil y concentrarla hasta 1 ml se analiza por Cromatografía Gas-Líquido.

Los pesticidas pueden ser analizados por Cromatografía Gas-Líquido en las siguientes condiciones (Fernández García, 1993)

- Columna: sílice con fase estacionaria de metilsilicona.

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: de ionización de llama alcalina (AFID)

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 36ml/min.
  b) La temperatura inicial fue de 60 °C (140 ºF) y la final de 240 °C (464 ºF), con una rampa de 30 °C/min (86 ºF/min)
  c) Las concentraciones de los diferentes pesticidas se calculan utilizando el método del patrón externo sobre la base de curvas de calibración preparadas con cada uno de los patrones de los pesticidas cuya presencia se desea comprobar.
  d) El volumen de inyección es de 2μl.

Los resultados se expresan en microgramos o nanogramos de cada componente por 1000 gramos de miel.

Con este método pueden analizarse pesticidas tales como: Cumafos y Mercaptotion, utilizados para combatir la varroa, juntamente con otros órgano-fosforados empleados para combatir plagas de cultivo y frutales tales como: Azinfos-metil, Etión, Disulfotón, Diclorvos, Demetón-S-metilsulfona, Diazinón, Dimetoato, Fenclorfos, Fosalon, Metamidofos, Mevinfos y Naled.

- **Investigación conjunta de pesticidas órgano-fosforados y órgano-clorados** (A.O.A.C. 970.52, 1995)

Con este método también pueden analizarse los químicos industriales policlorados y bifenilos.

La muestra se prepara disolviendo entre 20 y 50 gramos miel en una mezcla de acetonitrilo / agua (35:65)
Los pesticidas se re-extraen de la fase acetonitrílica con una mezcla de éter de petróleo y agua salina. La fase etérea se purifica a través de una columna de Florisil (60-80 mesh) y los distintos pesticidas se eluyen con mezclas de éter de petróleo / éter etílico en diferente proporción (6% - 15% y 50%)
En la primera fracción se extraen la mayoría de los pesticidas órgano-clorados (Aldrin, BHC, DDE, DDD (TDE), o,p' - DDT, p,p' - DDT, Heptacloro, Heptacloroepóxido, Metoxicloro, γ-Hexaclorociclohexano, Mirex y Etilano) y los órgano-fosforados Etion y Ronnel.
En la fracción intermedia se eluyen Dieldrin y Endrin y los órgano- fosforados Diazinon, Paration y Metilparation.
En la última fracción se extrae el Malation.

Los eluatos se analizan por Cromatografía Gas-Líquido o en Capa Fina, en este último caso la determinación es semi-cuantitativa.

Cromatografía Gas-Líquido

El análisis cromatográfico puede realizarse bajo las siguientes condiciones:

- Columna: vidrio empacada con OV-101 o 10% DC 200.
- Gas carrier: nitrógeno
- Detector: de captura electrónica ^{3}H. Se trabaja a 210 °C (410 ºF) como máximo.
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo mínimo de 120 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 225 °C (437 ºF) La temperatura de la columna debe ser constante, 200 °C (392 ºF)
  c) La concentración de cada uno de los residuos se calcula midiendo el área o la altura del pico correspondiente y comparándola con el área o la altura del pico obtenido partiendo de una cantidad conocida de un patrón preparado con material de referencia apropiado (0,1 – 0,5 ng/ml).
  d) El volumen de inyección está comprendido entre 3 y 8 μl.

Los resultados se expresan en microgramos o nanogramos de cada componente por 1000 gramos de miel.

Cromatografía en Capa Fina

Para llevar a cabo el análisis completo deben sembrarse tres placas: una para el estudio de los pesticidas órgano-clorados que eluyeron con la mezcla de 6%, otra para los pesticidas órgano-clorados que eluyeron con la mezcla de 15% y otra para el estudio de los pesticidas órgano-fosforados.

Las condiciones de la cromatografía son las que a continuación se detallan:

- Soporte: placa de Al_2O_3 G.
- Solvente:
  Pesticidas órgano-clorados: para la fracción de 6% n-heptano, para la fracción de 15% n-heptano con 2% de acetona.

  Pesticidas órgano-fosforados: metilciclohexano y 15 o 20% de *N,N* – dimetilformamida en éter.
- Revelador:
  Pesticidas órgano-clorados: nitrato de plata disuelto en agua y 2-fenoxietanol en acetona con una gota de agua oxigenada 30%. Luego de secar la placa durante 15 minutos se observan las manchas a la luz UV.

Pesticidas órgano-fosforados: tetrabromofenoftaleín etiléster en acetona, luego de este reactivo la placa presenta color azul. A continuación se revela con nitrato de plata en acetona observándose manchas azul-púrpura, para revelar los pesticidas tiofosfatos se utiliza una solución de ácido cítrico en acetona observándose manchas púrpura o azules sobre fondo amarillo.

- Volumen de estándares: se recomienda sembrar volúmenes menores de 10 μl. Las masas de estándares deben estar comprendidas en los siguientes intervalos.

Pesticidas órgano-clorados: 0,002 a 0,2 μg. Cantidades mayores de 0,2 μg son difíciles de cuantificar y menores de 0,005 μg difíciles de distinguir.

Pesticidas órgano-fosforados: 0,1 a 0,5 μg. Para investigar la presencia de Ronnel y Etion los estándares deben sembrarse separadamente porque no se separan en las condiciones cromatográficas dadas.

- Volumen de muestra: se recomienda sembrar volúmenes menores de 10 μl. Las masas de muestra deben estar comprendidas en los siguientes intervalos.

Pesticidas órgano-clorados: 0,005 a 0,1 μg.

Pesticidas órgano-fosforados: 0,1 a 0,5 μg.

- Investigación de Amitraz

El Amitraz es un insecticida / acaricida capaz de controlar dos parásitos que pueden infectar simultáneamente a una colonia de abejas, *Acarapis woodi* y *Varroa jacobsoni*.
El primero disminuye la producción y la supervivencia de las colmenas en épocas del año en las cuales no hay producción de miel, mientras que el segundo debilita y puede llegar a matar a toda la colonia.
Este compuesto se utiliza también para combatir pestes de árboles frutales.
Es soluble en agua (1 mg/l) soluble en la mayoría de los solventes orgánicos e inestable a pH ácido. Se descompone luego de largos períodos de almacenamiento en condiciones de humedad (Royal Society of Chemistry, 1987)

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

El análisis de este residuo se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución luego del correspondiente paso de extracción y ""clean-up"" de la muestra.
Pueden encontrarse los metabolitos juntamente con el pesticida.

Se parte de 20 gramos de miel y 2 gramos de Na_2HCO_3 en 60 ml de acetona. Luego de filtrar, se extrae el acaricida con una mezcla de n-hexano / acetato de etilo (8:2) en presencia de 1

gramo de NaCl, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4, se evapora a sequedad a 35-40 ºC (95-86 ºF) y el residuo se disuelve en 5 ml de la mezcla de extracción.

Se transfieren 2 ml a una columna de Florisil, la muestra se eluye con 10 ml de la mezcla de extracción y el eluido se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 2 ml de acetonitrilo y se somete al análisis cromatográfico bajo las siguientes condiciones (Su-Hsiang, 1999):

- Columna: de fase reversa C_{18}.
- Fase móvil: acetonitrilo / Agua (80:20)
- Detector: UV, la lectura se realiza a 313 nm.
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 0,9 ml/min.
  b) Se trabaja con un patrón externo preparado con Amitraz estándar disuelto en acetonitrilo. La concentración de trabajo es de 10 μg/ml.
  c) El volumen de inyección es de 20μl.
  d) El tiempo de retención del Amitraz bajo estas condiciones fue de 13 minutos.

Los resultados se expresan en miligramos por 1000 gramos de miel.

Cromatografía Gas-Líquido

Un método alternativo para la investigación de este contaminante es la Cromatografía Gas-Líquido con detector de masa en las siguientes condiciones (Su-Hsiang, 1999):

- Columna: capilar.
- Gas carrier: helio.
- Detector: de masa. La temperatura de trabajo es de 320 °C (608 ºF)
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  a) La temperatura en el puerto de inyección es de 250 °C (482 ºF) La temperatura de la columna se mantiene constante durante 2 minutos a 50 °C (122ºF) y luego se programa a 15 °C/min (59 °F/min) hasta 320 °C (608 ºF)
  b) El volumen de inyección es de 1μl.

- **Investigación de Bromopropilato**

El Bromopropilato se utiliza para el tratamiento de la varroa y otras parasitosis. La sustancia activa se vaporiza en la colmena actuando por contacto. El tratamiento se lleva a cabo al atardecer cuando todas las abejas están en el interior de la colmena. Como consecuencia de este proceso pueden quedar residuos en la miel tanto de Bromopropilato (BBP) como de su principal metabolito, 4,4' - Dibromobenzofenona (BP)

El Bromopropilato es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, su solubilidad en agua es de 5 mg/l.

Fue desarrollado un método que permite determinar ambos residuos. También es posible detectar y cuantificar un intermediario en la formación del BBP, el ácido 4,4' - Dibromobencílico (BBA)

La determinación se realiza por Cromatografía Gas-Líquido, previa extracción con n-hexano y posterior purificación por Cromatografía de Partición (Sílica gel)

Se extrae la miel de un panal por centrifugación y se toma una muestra de 500 gramos. Se disuelven 5 gramos de esa muestra en agua, si se desea determinar el BBA se agrega 1 ml de HCl.

Se pasa a través de una columna de partición y luego de 20 minutos se eluye el BP y el BBP con n-hexano. Se transfiere a una columna cromatográfica de sílica gel, se lava con n-hexano / diclorometano (8:2) y se descarta el eluido. El BBP se eluye con diclorometano y el BP con diclorometano / acetona (8:3)

Se evaporan ambas soluciones en baño de agua a 30-40 °C (86-104 ºF), los residuos se disuelven en n-hexano y se analizan por Cromatografía Gas-Líquido.

Si se desea determinar el BBA, este se eluye de la columna de partición con éter etílico y se sigue el mismo tratamiento descrito anteriormente. Para analizarlo por Cromatografía Gas-Líquido debe oxidarse a BBP. Se trata con $K_2Cr_2O_7$ / H_2SO_4 y se extrae el compuesto oxidado con diclorometano, se purifica a través de una columna de sílica gel, se eluye con n-hexano / diclorometano (6:4) y se continua con el mismo tratamiento anterior.

El análisis cromatográfico puede realizarse bajo las siguientes condiciones (Formica, 1984):

- Columna: vidrio empacada con OV-101 sobre Gas-Chrom Q.

- Gas carrier: argón / metano (95 + 5).

- Detector: de captura electrónica ^{63}N. Se trabaja a 300 °C (572 ºF)

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 36 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 250 °C (482 ºF) La temperatura de la columna debe ser constante, de 270 °C (518 ºF) para la determinación del BBP y 280 °C (536 ºF) para el BP.

c) Las concentraciones de ambos compuestos se calculan utilizando el método del patrón externo sobre la base de curvas de calibración preparadas con cada uno de los patrones de BBP y BP. Los patrones se preparan en n-hexano en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,01 μg/ml.
d) El volumen de inyección es de 5μl.
e) El límite de detección es de 0,05 ng para cada compuesto.

Los resultados se expresan en microgramos o nanogramos de cada componente por 1000 gramos de miel.

- **Investigación de Cimiazol**

La determinación de Cimiazol se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Cabras, 1993)

El pesticida se extrae con n-hexano de una solución alcalina de miel (pH 9), el medio alcalino reduce drásticamente la solubilidad en agua del compuesto. No se requiere un posterior "clean-up" del extracto de la muestra antes de realizar el análisis cromatográfico.

Se parte de una solución de 50 g% de miel preparada con NaOH 1M hasta pH 9. Se extraen 10 ml de esta solución con 10 ml de n-hexano, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno, el residuo se disuelve en 1 ml de acetonitrilo.

Las condiciones cromatográficas bajo las cuales se recomienda trabajar son las que a continuación se detallan:

- Columna: de fase reversa C_{18}.

- Fase móvil: acetonitrilo / HCl 0,001 N / NaCl (950ml:50ml:0,3g)

- Detector: ultravioleta, la lectura se realiza a 265 nm.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 0,8 ml/min
  b) Se trabaja con un patrón externo preparado con Cimiazol estándar disuelto en acetonitrilo en concentraciones que oscilan entre 0,01 y 1,00 mg/kg.
  c) El volumen de inyección es de 250μl.
  m) El tiempo de retención del Cimiazol trabajando en las condiciones anteriormente expuestas fue de 8,43 minutos.

Los resultados se expresan en miligramos por 1000 gramos de miel.

Sulfonamidas

Las sulfonamidas son utilizadas para la prevención y el tratamiento de la loque americana, la droga se administra disuelta en solución de sacarosa. La miel puede contener residuos de sulfonamidas, indeseables desde el punto de vista sanitario.

Existe una importante cantidad de sulfamidas tales como: Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfamerazina, Sulfametoxipiridazina, Sulfarilamida, Sulfadimidina, Sulfadoxina, Sulfamonometoxina, Sulfacloropiridazina, Sulfametoxazol, Sulfaquinoxalina, Sulfadimetoxina y Trimetoprima.

El Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos de la República Argentina (CREHA, 2003) establece un límite de 10 μg/kg para los residuos de las sulfamidas que a continuación de detallan:
Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfamerazina, Sulfametoxipiridazina, Sulfadimidina, Sulfametoxazol, Sulfaquinoxalina, Sulfadimetoxina.

Métodos de análisis

Las sulfonamidas se encuentran ligadas a los azúcares, se extraen de la miel mediante una hidrólisis ácida y a continuación se transforman en derivados fluorescentes y se analizan por Cromatografía Líquida con detector de arreglo de diodos o de fluorescencia, el límite de detección es de 5 μg/kg (Bogdanov, 2003)

Es posible llevar a cabo una extracción de las sulfonamidas con buffer acetato, purificación a través de una columna en fase sólida y Cromatografía Líquida en fase reversa con detector de fluorescencia y derivatización precolumna (Posyniak, 2003) Los límites de detección encontrados fueron de 0,1 μg/kg para sulfacetamida y 0,2 μg/kg para sulfatiazol y sulfametacina.

Los residuos de sulfonamidas en la miel también pueden determinarse mediante Espectrofotometría (Schwartz, 1986), Cromatografía en Capa Fina (Neidert, 1986), Enzimo-inmunoanálisis (Sheht, 1990) y Cromatografía Gas-Líquido (Harbin, 1999)

Horie y colaboradores desarrollaron un método que permite determinar simultáneamente diez sulfonamidas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Horie, 1992)

Las sulfonamidas se extraen con diclorometano luego de disolver la muestra en solución de cloruro de sodio al 30%, los extractos se someten a un "clean up" para su posterior estudio cromatográfico.

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la cromatografía son las siguientes:

- Columna: de fase reversa C_{18}.
- Fase móvil: fosfato diácido de sodio 0,05 M / acetonitrilo (2:1)

- Detector: UV con arreglo de diodos. La longitud de onda apropiada para la detección es de 275 nm.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  a) Las curvas de calibración se preparan soluciones estándar de las distintas sulfonamidas, en metanol, en concentraciones de 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 y 4,0 μg/ml.
  b) Se inyectan 10μl de cada patrón.
  c) El límite de detección es de 0,05 μg/g.

El método permite separar satisfactoriamente diez sulfonamidas en 17 minutos y en el orden que se detalla a continuación:

1. Sulfatiazol.
2. Sulfadiazina.
3. Sulfamerazina.
4. Sulfametoxipiridazina.
5. Sulfadimidina (Sulfametazina).
6. Sulfamonometoxina.
7. Sulfacloropiridazina.
8. Sulfametoxazol.
9. Sulfaquinoxalina.
10. Sulfadimetoxina.

Los resultados se expresan en microgramos por gramo de miel.

Antibióticos

Antibióticos, entre los cuales se encuentran las Tetraciclinas, Oxitetraciclina, Fumidil-β, Fumagilina, Terramicina, Penicilinas, Estreptomicina, Tilosina, Eritromicina y el Cloranfenicol, son utilizados como prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas de la abeja como por ejemplo loque americana, nosemosis y loque europea.

La loque americana es una enfermedad producida por *Bacillus larvae*
La nosemosis es una enfermedad invisible producida por *Nosema* quien infecta el intestino delgado de la abeja. Se combate con fumagilina.

Las drogas para el tratamiento son administradas en solución de sacarosa (utilizada para alimentar a las abejas) y en la miel pueden encontrarse residuos como consecuencia de esa alimentación, de hecho estos compuestos son los principales contaminantes.
Cuando se utilizan estos compuestos deben respetarse los períodos de espera para evitar que queden residuos de estos fármacos en la miel.

El Codex Alimentarius establece que los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios deberán ajustarse a los límites especificados por la Comisión del Codex Alimentarius.
La normativa de la Unión Europea estipula los límites para los antibióticos en alimentos en el Reglamento (CEE) 2377/90.
El Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos de la República Argentina (CREHA, 2003) establece límites para los residuos de los siguientes antibióticos:

- Tetraciclina, Oxitetraciclina o Clortetraciclina: 10 μg/kg.
- Tilosina: 10 μg/kg.
- Estreptomicina: 15 μg/kg.

La presencia de residuos de antibióticos en los alimentos entraña un serio problema de salud, el desarrollo de resistencia bacteriana frente al uso indiscriminado, sumado a la posibilidad de producir reacciones alérgicas en algunas personas o simplemente debido a su toxicidad, enfrenta a quienes son responsables de velar por la salud pública con una grave cuestión. De lo anteriormente expuesto se deduce la importancia de la detección y cuantificación de residuos de antimicrobianos.
El analista dispone de una serie de métodos para detectar y cuantificar estos residuos.

En la búsqueda de la posible presencia de antibióticos en la miel es importante contar con un método que permita diferenciar las muestras que no contienen antibióticos de aquellas que sí lo poseen.
Las muestras que den resultado positivo o dudoso deberán ser analizadas utilizando técnicas que permitan confirmar la presencia del residuo, identificarlo y cuantificarlo.
Los métodos más frecuentemente utilizados son los microbiológicos porque permiten detectar la presencia de antibióticos con estructuras químicas y propiedades físico-químicas totalmente diferentes. Están basados en la propiedad que poseen estos compuestos químicos de inhibir el crecimiento de microorganismos sensibles a ellos.

Otros métodos que pueden utilizarse para la investigación de la presencia y posterior cuantificación de estos residuos son los métodos físico-químicos e inmunológicos. Estos métodos son específicos para un determinado antibiótico pero tienen las desventajas, frente a los métodos microbiológicos, que son más largos y tediosos y no pueden utilizarse como técnica rápida de “screening”.

Métodos de análisis

Es importante recalcar que la gran mayoría de los antimicrobianos son inestables durante el almacenamiento, principalmente en las condiciones ambientales bajo las cuales se almacena el producto en sus diversas etapas de elaboración.
Las muestras para el análisis de antibióticos deben ser conservadas bajo refrigeración y dentro de lo posible congeladas, de este modo se podrá salvaguardar la concentración de antibióticos en la muestra de laboratorio aunque eso no asegura que el posterior resultado analítico sea un verdadero reflejo de la concentración real de antimicrobiano.
Las sulfonamidas en general son más estables frente al almacenamiento en condiciones no óptimas.

Método microbiológico

Es un método simple, rápido y exacto que permite detectar un amplio espectro de antibióticos, aún en muy baja concentración. Admite procesar simultáneamente una gran cantidad de muestras.

El objetivo del método consiste en detectar la presencia de antimicrobianos pertenecientes a los diferentes grupos de antibióticos: macrólidos, tetraciclinas y penicilinas y aminoglicósidos. Luego de este primer "screening" se investiga la presencia de un antibiótico en particular en aquellas muestras que presentaron resultado positivo y se cuantifica.

Se preparan tres placas conteniendo medios de cultivo apropiados para la investigación de antibacterianos. En cada una de ellas se siembra un microorganismo diferente los cuales se eligen de acuerdo con la sensibilidad o resistencia que presenten frente al grupo de antibióticos cuya presencia se desea investigar. Por ejemplo para la investigación de tetraciclinas se utiliza *Bacillus subtilis* (Khismatoullin, 2003)

La muestra se homogeneiza en un buffer apropiado y se centrifuga en caso necesario.

En cada una de las placas se colocan discos de papel embebidos en la muestra convenientemente procesada y se incuban a 30 °C (86 ºF) durante 18 horas.
Los discos de papel pueden reemplazarse por pequeños cilindros metálicos.
En las placas debe colocarse un disco de papel control impregnado con un antibiótico representativo de cada uno de los grupos que se van a investigar, en cada caso el diámetro del halo de inhibición deberá ser mayor o igual a 14 mm ± 1 mm.

Todas aquellas muestras que presenten un halo de inhibición cuyo diámetro sea mayor de 12 mm se consideran positivas.
Si las tres placas presentan como resultado halo de inhibición debe repetirse el análisis.
Es importante recalcar que la miel posee naturalmente una sustancia bactericida que inhibe el crecimiento microbiano. Teniendo en cuenta esta propiedad los resultados obtenidos deben interpretarse con sumo cuidado, en general la miel pura presenta halos de inhibición menores de 12 mm. Una alternativa para evitar este efecto consiste en calentar la muestra a 65 ºC (149 ºF) durante 15 minutos antes de comenzar el ensayo.

El diámetro del halo de inhibición puede relacionarse con la concentración del antibiótico mediante el empleo de curvas de calibración y así contar con un método semicuantitativo que permita conocer la cantidad aproximada de antibióticos en la muestra.
Puede confirmarse la presencia de un determinado antibiótico empleando un microorganismo que sea resistente a él.

ELISA (Enzimo-Inmuno Análisis) (Bogdanov, 2003)

Es un método semicuantitativo con un límite de detección comprendido entre 10 y 50 μg/kg., es también un método de "screening" apropiado para detectar la presencia de antimicrobianos, se basa en la combinación de los antibióticos con sus correspondientes anticuerpos.

El ensayo original fue perfeccionado para eliminar problemas de reactividad cruzada con otros antibióticos y actualmente se cuenta con el llamado "*Charm II Test*", un ensayo comercial que ha sido adaptado para el ensayo de miel y que permite investigar y cuantificar la presencia de diferentes tipos de antimicrobianos: sulfonamidas, tetraciclinas, β-lactámicos, macrólidos, anfenicoles y aminoglicósidos del tipo estreptomicina.

El método se basa en la unión específica de los antibióticos a sus receptores y la cuantificación de los mismos mediante la medición de la radioactividad H^3 o C^{14}. Un resultado positivo no es concluyente, debe confirmarse mediante otro método.

El "*Charm II Test*" es apropiado para el análisis de rutina de la miel siempre y cuando se tengan en cuenta las limitaciones del ensayo: la presencia de ácido p-amino benzoico naturalmente en la miel puede ocasionar "falsos positivos" cuando se analizan sulfonamidas y en algunos casos los resultados dependen del origen de la miel. La miel de mielada y de castaño conducen a un incremento de los "falsos positivos".

Tiras Reactivas

Un ensayo rápido que puede aplicarse para el análisis de muestras en el campo o en depósito es el "*Rapid One Step Assay (ROSA) test"* (Legg, 2003) modificado para su aplicación en muestras de miel.

La miel se diluye en una solución buffer y se incuba en presencia de una tira reactiva, al cabo de 8 minutos se lee el resultado visualmente o con un lector.

Con este ensayo es posible detectar la presencia de sulfametacina, tetraciclina y β-lactámicos incluyendo cefalosporinas. Actualmente se está desarrollando un ensayo para la detección de cloranfenicol.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Este método se aplica a aquellas muestras que, luego de ser analizadas utilizando alguno de los métodos anteriores, presentan resultado positivo.

Permite identificar y cuantificar los antibióticos, en algunos casos este método puede reemplazarse por Cromatografía en Capa Fina. En la Cromatografía Líquida cada antibiótico se determina separadamente lo que implica que necesariamente debe contarse con los respectivos estándares y a pesar de ello en algunos casos la identificación no es posible.

Las muestras deben someterse a un tratamiento previo al análisis, la miel se disuelve en una solución buffer a pH apropiado (aproximadamente 4,0) y se centrifuga si es necesario.
A continuación se realizan extracciones con solventes orgánicos con el fin de separar en fracciones los distintos antimicrobianos, por ejemplo puede utilizarse cloroformo. La muestra de

ensayo se divide en dos fases, las que son analizadas separadamente luego de una centrifugación.
El cloroformo se evapora con precaución teniendo en cuenta la sensibilidad de estos residuos frente a la temperatura y el residuo se disuelve en un buffer apropiado (pH 8,0) y se repite el ensayo de "screening".
Mediante este análisis se confirma la presencia de aquellos residuos solubles en cloroformo tales como la tilosina y la eritromicina.

La fase acuosa se purifica a través de una columna de extracción en fase sólida, los analitos se eluyen con metanol, luego de evaporar el solvente el residuo se disuelve en una solución buffer de pH adecuado y se somete nuevamente al análisis de "screening".
Mediante este paso se confirma la presencia de antibióticos solubles en agua tales como tetraciclinas y penicilinas.

Puede realizarse un tercer paso de extracción para separar los aminoglicósidos tales como estreptomicina.

La fracción que presentó actividad antimicrobiana se analiza por HPLC.

La Cromatografía Líquida puede combinarse con la técnica de Espectrometría de Masa (LC-MS/MS) que constituye el más moderno y prometedor método para el análisis e identificación de compuestos. La muestra se purifica a través de una columna de extracción en fase sólida antes del análisis cromatográfico. El límite de detección del ensayo está comprendido entre 0,5 y 10 μg/kg dependiendo del tipo de antibiótico (Bogdanov, 2003)

- **Investigación de Oxitetraciclina** (Galeano Díaz, 1990)

La cuantificación de este antibiótico se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Se pesan 1,0 gramos de miel y el compuesto se extrae dos veces con acetona, se evapora el solvente a 30 °C (86 ºF) y el residuo se disuelve en 200 μl de agua destilada.

El análisis cromatográfico se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

- Columna: fase reversa C_{18}.

- Fase móvil: acetonitrilo / ácido oxálico 0,01M (pH 2,1) con SDS 0,01 (35:65)

- Detector: UV con arreglo de diodos. La longitud de onda de medición es 270 nm.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 1,0 ml/min.
  b) Se trabaja con un patrón externo preparado con oxitetraciclina estándar disuelta en acetona.
  c) El volumen de inyección es de 20μl.

- **Investigación de Oxitetraciclina y Tetraciclina** (González Novelo, 2001)

La separación y cuantificación de ambos antibióticos se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

La preparación de la muestra se realiza como se explicó anteriormente y el residuo disuelto en agua se analiza bajo las siguientes condiciones:

- Columna: fase reversa C_{18}.

- Fase móvil: SDS / acetonitrilo.

- Detector: UV con arreglo de diodos. La longitud de onda de medición es 350 nm.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 1,0 ml/min.
  b) Se trabaja con un patrón externo preparado con una mezcla de oxitetraciclina y tetraciclina estándar disueltas en agua.
  c) Los tiempos de retención son de 3,05 para la oxitetraciclina y 3.35 para la tetraciclina.

- **Investigación de Oxitetraciclina y Sulfatiazol** (Pagliuca, 2000)

El método facilita la separación y cuantificación de ambos antimicrobianos.

La miel se disuelve en buffer Na_2EDTA - McIlvaine 0,1 M, se purifica a través de una columna y se eluye la oxitetraciclina con 1 ml de metanol.
El sulfatiazol se extrae del alimento con acetona, luego de filtrar, se evapora el solvente y se realiza una segunda extracción con una mezcla de HCl 1 N y éter etílico. A continuación se analiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en condiciones relativamente suaves de pH y a bajos volúmenes de inyección para asegurar la reproducibilidad y la vida útil de la columna.
Los límites de detección son 0,10 y 0,15 mg/kg respectivamente.

- **Investigación de Estreptomicina**

El dosaje de este antibiótico, de la familia de los aminoglicósidos, se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y derivatización post-columna para detectarlo fluorométricamente. El límite de detección es de 5μg/kg (Klementz, 1996)

En un estudio realizado aplicando este método sobre mieles provenientes de diferentes orígenes geográficos, europeas y americanas, se encontró un importante porcentaje de muestras con residuos de estreptomicina (Analyse de la Streptomycine dans les Miels, 1998)

- **Investigación de Cloranfenicol**

Es importante recalcar que la presencia de este antibiótico entraña un grave riesgo para la salud (es causante de aplasia medular), el uso de este antibiótico está prohibido prácticamente en todo el mundo. No se ha establecido un límite máximo, ya que se considera que su presencia en los alimentos independientemente de la concentración en la que se encuentre constituye un peligro para la salud humana.

Para el análisis de este antibiótico puede aplicarse la Cromatografía Líquida con gradiente de solventes combinada con doble Espectrometría de Masa (LC-MS/MS), esta metodología permite determinar trazas del residuo (Verzegnassi, 2003)

La miel se disuelve en agua y la solución se purifica a través de una columna de extracción en fase sólida antes del análisis cromatográfico, se trabaja con un patrón interno de cloranfenicol marcado isotópicamente. Con el objeto de confirmar los resultados se monitorean cuatro transiciones de masa características del compuesto analizado y del estándar.

Otro método propuesto para llevar a cabo el análisis de cloranfenicol en miel (Quintana-Rizzo. 2003) consiste en combinar la capacidad de fraccionamiento de la Cromatografía Líquida con la especificidad del Inmunoanálisis.
Luego de un paso de secado la muestra se disuelve y se somete al fraccionamiento por Cromatografía Líquida con gradiente de solventes que separa los distintos compuestos presentes en la muestra y a continuación se analizan separadamente con el *"Charm test II"* para anfenicoles. Aquellas fracciones que presentan resultado positivo con el método de "screening" se identifican como mieles positivas para cloranfenicol.

La muestra se prepara disolviendo 20 gramos de miel en buffer McIlvaine / EDTA, se purifica a través de una columna de extracción en fase sólida C_8 y se eluye con metanol, el líquido recogido se seca con corriente de nitrógeno y se disuelve en la fase móvil (buffer A) que se va a utilizar para la cromatografía.

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la cromatografía son las siguientes:

- Columna: C_8.

- Fase móvil: buffer A: 78% de sulfato de amonio10 mM, pH 4,6 y 22% de acetonitrilo - buffer B: 75% de acetonitrilo y 25% de agua,

- Detector: UV con arreglo de diodos.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 1 ml/min.
  b) Inicialmente la fase móvil es el buffer A, entre el primer minuto y hasta los 20 minutos de corrida la fase móvil es 50:50. A partir de aquí y hasta los 30 minutos la fase móvil es una mezcla 75:25 de buffer A y B respectivamente para terminar a los 32 minutos con 100% de buffer A.

c) Para determinar el tiempo de retención del cloranfenicol se utiliza una solución estándar de 300 μg/l.
d) Se inyectan 200μl de muestra.

Con las 10 fracciones colectadas luego de llevar a cabo la Cromatografía se practica el ensayo con el *Charm II test.*

Mediante la Decisión 2001/181/CE la Unión Europea estableció los límites de detección de los métodos analíticos (0,3 µg/kg) que se aplican para detectar la presencia de este residuo.

- **Investigación de Nitrofuranos**

Son antibióticos que poseen una acción carcinogénica potencial y son genotóxicos (causantes de daño al material genético de las células) además de producir reacciones alérgicas.
El uso de estos antibióticos para productos de origen cárnico está prohibido en distintas países, en la República Argentina se prohibió su uso desde el año 1995 mediante la Resolución N° 248 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria y como consecuencia no debe detectarse su presencia en los alimentos.

Son activos frente a distintas bacterias y protozoarios tales como *Nosema apis Zander*, agente causal de la nosemosis.

Actualmente no se dispone de métodos oficiales de referencia para la detección de estos contaminantes.
Se metabolizan rápidamente de modo que los residuos que pueden detectarse son sus metabolitos: 3-amino-2-Oxazolidinona (metabolito de la Furazolidona), 5-Metilmorfolino-3-amino-2-oxazolidinona (metabolito de la Furaltadona), 1-Aminohidantoína (metabolito de la Nitrofurantoína) y Semicarbazida (Nitrofurazona), los cuales son relativamente estables a los tratamientos térmicos.

La Unión Europea (Decisión 2001/181/CE) estableció los límites de detección de los métodos analíticos (1 µg/kg) que se aplican para estudiar la presencia de estos residuos. Cabe señalar que la citada normativa hace referencia a la carne de aves de corral y productos de acuicultura y no incluye a la miel ya que la detección de estos residuos en ese alimento es mucho más reciente que dicha normativa.

Métodos de Análisis

Los métodos de análisis se basan en la cuantificación y posterior confirmación de los metabolitos de nitrofuranos. Generalmente se llevan a cabo mediante técnicas de Cromatografía Líquida con detector UV o Masa o Cromatografía Líquida con doble análisis con detector de Masa (LC-MS/MS)
Actualmente se están desarrollando métodos inmuno-químicos tales como ELISA y microbiológicos que sean más accesibles y rápidos.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La determinación utilizando detector UV no es apropiada porque los metabolitos son moléculas muy pequeñas que presentan una absorción muy baja en el UV, para aumentar la absorción se derivatizan antes de ser analizados utilizando nitrobenzaldehído (se combina con el grupo amino primario dando sus correspondientes nitrofenilderivados que poseen una intensa absorción en el UV) La sensibilidad de esta técnica no es suficiente para poder cumplir con los requisitos establecidos por la Unión Europea.

La técnica con detector de Masa también requiere de este tratamiento. Esta técnica, con una optimización apropiada de las condiciones de separación podría llegar a detectar 1 μg/kg de miel pero no puede identificar los compuestos de acuerdo con lo exigido por la UE (Nitrofuran, 2003)

La muestra se somete a un "cleanup" y posterior extracción líquido-líquido con acetato de etilo, que incrementa la masa molecular de los analitos. Los compuestos de interés se extraen con ácido y se derivatizan con 2-nitrobenzaldehídoacetato. El análisis se lleva a cabo por Cromatografía Líquida, ionización por electrospray y Espectrometría de Masa (LC - ESI - MS. Luego de la aplicación del procedimiento el espectro de masa del analito contiene más iones característicos que facilitan su identificación.
El análisis proporciona una excelente linealidad con coeficientes de correlación mayores de 0,999 para todos los metabolitos, el límite se detección está comprendido entre 0,02 y 0,06 ng/nl. Se aplica para músculo e hígado de pollo (Agilent, 2003)

Una variante del método anterior consiste en la aplicación de la Cromatografía Líquida con doble análisis por Espectrometría de Masa (LC-MS/MS) e ionización por electrospray mediante el cual pueden detectarse simultáneamente los cuatro agentes antibacterianos: furazolidona, furaltadona, nitrofurazona y nitrofurantoína (Leitner, 2001)
La muestra se somete a un ""clean-up"" y a un paso posterior de enriquecimiento mediante pasaje a través de una columna de extracción en fase sólida de poliestireno, hidrólisis de los metabolitos combinados con proteínas y derivatización con 2-nitrobenzaldehído. Cabe señalar que el método se aplica a tejido animal de modo que en el caso de miel podría obviarse el paso de hidrólisis.
Se trabaja con patrón interno. El límite de detección es de 2,5 a 10 ng/g.

ELISA (Enzimo–Inmuno Análisis) (RIDASCREEN, 2003)

Es una determinación inmunoenzimática competitiva que permite identificar y cuantificar el 3-amino-2-Oxazolidinona (AOZ) y el 5-Metilmorfolino-3-amino-2-oxazolidinona (AMOZ) en carnes y en leche.

El método está basado en una reacción antígeno-anticuerpo. Las celdas en las cuales se lleva a cabo la reacción están cubiertas con anticuerpos de captura contra los anticuerpos anti-AOZ o anti-AMOZ, en ellas se agrega solución estándar del metabolito cuya presencia se investiga o solución de muestra, conjugado del metabolito y la enzima y el anticuerpo que corresponda. Se establece una competencia entre los metabolitos libres y los conjugados con

la enzima por los sitios del anticuerpo, el exceso de conjugado que quedó sin reaccionar se elimina por lavado.
Las placas se incuban en presencia del sustrato de la enzima y el reactivo de color, el compuesto conjugado transforma el cromóforo en un producto azul el cual cambia a amarillo por agregado de una solución que finaliza la reacción. La medida se realiza fotométricamente a 450 nm y se calcula la concentración del metabolito correspondiente sobre la base de la medición de la absorbancia ya que esta es inversamente proporcional a la concentración del metabolito en la muestra analizada.

Frente a las técnicas cromatográficas posee una serie de ventajas: es más sensible, el límite de detección es menor, la preparación de la muestra es sencilla y requiere menor tiempo.

Fenoles

Durante la recolección de la miel se utiliza ácido fénico para ahuyentar a las abejas. Como consecuencia de esta práctica quedan residuos de fenoles en la miel.
Cuando los niveles de fenol son altos (más de 20 mg/kg) la miel adquiere sabor desagradable.

Los recipientes no aptos para estar en contacto con alimentos, en los cuales es común almacenar la miel, son otra importante fuente de contaminación que en muchos casos no se tiene en cuenta. Algunos barnices poseen compuestos que pueden liberan fenoles y contaminar el producto.

En la República Argentina el límite máximo de fenoles admitido para la miel fue establecido en 10 μg/kg (CREHA, 2003)

Métodos de análisis

Cromatografía Gas-Líquido

Para la determinación y cuantificación de fenoles se puede utilizar la Cromatografía Gas-Líquido con diferentes detectores (ionización de llama, captura electrónica, entre otros) pudiendo alcanzarse distintos límites de detección. Se recomienda aplicar la técnica de “head-space” o microextracción en fase sólida para analizar este compuesto (Bogdanov, 2003)
La presencia de fenol debe confirmarse por Espectrometría de Masa.

HPLC con detector de Arreglo de Diodos (Sporns, 1981)

Mediante este método es posible separar y cuantificar el fenol que contamina la miel.
Debe realizarse un "clean up" de la muestra con el fin de purificarla y prepararla para su posterior estudio cromatográfico. El fenol puede separarse de la miel por destilación simple o arrastre con vapor a partir de 10 gramos de producto, la muestra debe recogerse y guardarse en material color caramelo.

Se realiza una destilación simple en presencia de 2-feniletanol y se analiza por Cromatografía Líquida.

Se agregan 10 ml de una solución de 2-feniletanol a 10 gramos de miel. Se destila la solución colectando 20 a 25 ml, los primeros 40 ml se descartan.

El análisis cromatográfico se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

- Columna: con sustituyentes C_{18}.
- Fase móvil: agua o agua ligeramente acidificada / acetonitrilo.
- Detector: la longitud de onda de medición es 195 nm.
- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 0,7 ml/min.
  b) Se utiliza patrón interno (2- feniletanol) Los picos se identifican por sus tiempos de retención. El contenido de fenol se calcula sobre la base de la altura del pico comparada con la altura del pico de un patrón. La concentración del patrón es de alrededor de 66,5 μg/ml. El t_R del fenol, utilizando agua como fase móvil es de 2,45 minutos y el del patrón interno 3,25 minutos. Si se utiliza la mezcla con acetonitrilo los tiempos de retención son mayores.
  Como patrón interno también puede utilizarse o-cresol, nitrofenol o clorofenol.
  c) El volumen de inyección es de 50μl.

La columna debe lavarse con metanol cada 25 a 30 determinaciones para prevenir la contaminación de la misma y mantener su eficiencia.

Los resultados se expresan en microgramos por kilogramo de miel.

HPLC con detector Amperométrico (Takeba, 1990)

Este método ofrece una alternativa para el análisis cromatográfico de fenoles en la miel. A pesar que el detector amperométrico es más sensible que el de arreglo de diodos es una metodología poco utilizada para análisis de rutina. La determinación es muy cara y el límite de detección depende marcadamente del pH de la fase móvil entre otros factores.

El fenol de extrae del destilado de la miel con benceno, se realiza una segunda extracción con NaOH 0,1 N luego de un lavado con solución de $NaHCO_3$ 1% y a continuación se purifica a través de una columna de extracción en fase sólida C_{18}.

El análisis cromatográfico se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

- Columna: Inertsil ODS.
- Fase móvil: acetonitrilo / NaH_2PO_4 0,01 M conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM y su sal de sodio, pH 5,0 (20:80.

- Detector: se aplica un potencial de 0,7 V.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 1,0 ml/min.
  b) El límite de detección es de 0,002 mg/kg.

HPLC con detector de Fluorescencia (Gratzfeld-Huesgen, 1997)

El fenol se extrae por destilación simple en presencia de NaCl a partir de 20 gramos de miel, se purifica a través de una columna de Florisil y se eluye con agua.

El análisis cromatográfico se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

- Columna: con sustituyentes C_{18}.

- Fase móvil: agua acidificada con ácido acético a pH 4,0 / acetonitrilo (81:19.

- Detector: la longitud de onda de excitación es de 225 nm y la longitud de onda de emisión de 310 nm.

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 0,350 ml/min.
  b) La temperatura del horno es de 37 °C (98,6 °F)
  c) El volumen de inyección es de 50 μl.
  d) El tiempo de corrida fue de 10 minutos.

CONTAMINANTES

Minerales

Los minerales contaminantes de la miel que frecuentemente se investigan son muchos. En algunos casos la legislación especifica límites particulares de determinados contaminantes para la miel y en otros casos los límites están dados por el máximo valor aceptado para los alimentos.

Cuando la miel está en contacto con superficies no protegidas con barniz sanitario o con materiales no aptos para estar en contacto con alimentos se contamina con metales tales como hierro.
Todos los procesos a los cuales es sometida la miel para su extracción y fraccionamiento son potenciales fuentes de contaminación. Todas las operaciones deben llevarse a cabo siguiendo las buenas prácticas de manufactura para minimizar el riesgo de contaminación, en especial la manipulación y descarga de las alzas mielarias y el escurrido de los cuadros.
La naturaleza del material con el cual han sido fabricados los equipos, bombas, cañerías y filtros es de vital importancia; se recomienda el acero inoxidable.

Otro punto a tener en cuenta es el material de los recipientes en los cuales se almacena y envasa la miel.
Para evitar contaminaciones minerales debido a contaminantes ambientales se recomienda, siempre que sea posible, mantener tapados los recipientes que contengan el producto.

El Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel (Resolución GMC 15/94) estable que los límites de contaminantes inorgánicos deberán cumplir con los límites establecidos en el Reglamento MERCOSUR correspondiente. En particular fija para la miel una tolerancia de 1,0 mg/kg para el arsénico y 10 mg/kg para el cobre (Resolución GMC 102/94)

El Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos de la República Argentina (CREHA, 2003) establece un límite de 50 μg/kg para el plomo.

El Codex Alimentarius exige que los límites máximos de metales pesados se ajusten a los límites establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius y especifica que los metales pesados deben estar en cantidades que no representen un riesgo para la salud.

De acuerdo con la legislación argentina (Capítulo III del Código Alimentario Argentino) los límites de contaminantes inorgánicos aceptados para los alimentos sólidos en general son los que se detallan a continuación:

- Estaño: 250 mg/kg.
- Antimonio: 2 mg/kg.
- Boro: 80 mg/kg.
- Fluor: 1,5 mg/kg.
- Plata: 1 mg/kg.
- Plomo: 2 mg/kg.
- Zinc: 100 mg/kg.

Métodos de análisis

Las técnicas de análisis actualmente disponibles pueden clasificarse en: clásicas e instrumentales. El método instrumental más ampliamente utilizado es la Espectrometría de Absorción Atómica. Con esta metodología es más fácil eludir las interferencias que normalmente se presentan ya que la miel presenta un amplio espectro de minerales.
Los métodos clásicos son más tediosos porque requieren una serie de pasos de purificación que permitan eliminar gradualmente los distintos metales que interfieren en las diferentes determinaciones. Los patrones deben necesariamente recibir el mismo tratamiento que la muestra, de modo que cada determinación implica procesar al menos cuatro o cinco muestras (la miel y los patrones) lo que conlleva a un mayor tiempo de análisis.
La mayoría de los métodos clásicos son espectrofotométricos.

En ambos casos los reactivos deben ser de alta pureza y el material utilizado lavado convenientemente con HNO_3 caliente. El agua usada para todas las diluciones de la muestra y para la preparación de los reactivos debe ser bidestilada en un aparato de vidrio.

Para asegurar la confiabilidad de los datos siempre debe realizarse un blanco de reactivos, en general se recomienda hacer dos o tres.

Cuando se van a determinar metales es muy importante el control del grado de contaminación del laboratorio. Deben tomarse todos los recaudos necesarios para evitar la

contaminación de las muestras, los reactivos y los materiales ya que en muchos casos los metales cuya presencia se debe corroborar o cuantificar se encuentran en el orden de trazas.

El Codex Alimentarius establece para la miel (C.A.C., 1999) solamente métodos especiales para la determinación de cobre, arsénico y plomo.
Esto no exime al analista de laboratorio a realizar la búsqueda de cualquier otro metal que pudiera contaminar el producto.

Arsénico

Métodos de análisis

Los métodos espectrofotométricos consisten en la conversión del As^{3+} en AsH_3 que pasa en estado gaseoso, arrastrada por una corriente de hidrógeno, a través de un material inerte impregnado en acetato de plomo (para retener el eventual desprendimiento sulfuro de hidrógeno) y se pone en contacto con un reactivo que da lugar a la formación de un compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente.

Para la aplicación de estos métodos, la muestra debe procesarse como se detalla a continuación: se pesa una cantidad de muestra que contenga 20 gramos de sólidos, en el caso particular de la miel debe agregarse agua hasta obtener esa concentración de sólidos.
Se digiere con una mezcla de HNO_3 y SO_4H_2. Cuando la primera reacción violenta pasó se calienta cautelosamente y se mantienen las condiciones oxidantes mediante pequeños agregados de HNO_3 ya que si el medio se torna reductor puede perderse arsénico.
Se continúa el calentamiento hasta que se haya destruido toda la materia orgánica y se observe desprendimiento de vapores de SO_3. Luego de enfriar se agrega $_2$y se calienta hasta eliminación de humos densos y pesados de SO_3 (si quedó $HClO_4$ se eliminará como humos blancos pero no tan densos y característicos como el SO_3)
Se enfría, se agregan 75 ml de agua y 25 ml de una solución saturada de oxalato de amonio y se vuelve a calentar para descomponer combinaciones nitradas y eliminar restos de sustancias oxidantes hasta humos blancos de SO_3. Se calienta hasta lograr un volumen final de aproximadamente 3 ml, se enfría y se lleva a 1 litro (A.O.A.C. 963.21C, 1990)
Paralelamente se prepara un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

Una porción de muestra, preparada convenientemente, se coloca en un generador. Se agregan 5 ml de HCl, 2 ml de solución de KI 15% y 8 gotas de Sn_2Cl 40%. La AsH_3 generada se hace reaccionar con el reactivo correspondiente de acuerdo con el método espectrofotométrico elegido.

Método con dietilditiocarbamato de plata (A.O.A.C. 952.13, 1990)

En este método la AsH_3 generada se hace reaccionar con dietilditiocarbamato, el compuesto coloreado formado se mide en un espectofotómetro.

La porción de muestra que debe transferirse al generador de AsH_3, en este caso, es de 5,0 ml.
Luego de 15 minutos se trasvasa el contenido del generador a un matraz de 25 ml y se agregan 4 ml de una solución de dietilditiocarbamato de plata. Se lee la absorbancia de la solución a 522 nm frente a un blanco de reactivos.

Se prepara una curva de calibración con 0,0 - 1,0 - 3,0 - 6,0 - 10,0 y 15,0 ml de una solución patrón de As_2O_3 (1,00 μg/ml) Cada uno de los patrones se somete al mismo tratamiento que la muestra.
La solución patrón de arsénico se prepara disolviendo 1,000 gramos de As_2O_3 en 25 ml de NaOH 20%, se lleva a 1 litro con agua. A partir de esta solución se prepara la solución de trabajo.

La masa de As_2O_3 en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg As_2O_3) Para expresar esa masa en As se multiplica el valor por 0,757.
La concentración de As en la miel se calcula en μg/g de miel.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de arsénico en miel.

Método del azul de molibdeno (A.O.A.C. 942.17, 1990)

En este caso, la AsH_3 generada se hace reaccionar con una solución de molibdato de amonio en medio ácido y $N_2H_4.H_2SO_4$ (sulfato de hidracina), el arsenomolibdato formado se mide en un espectofotómetro.

La porción de muestra que debe transferirse al generador de AsH_3, en este caso, debe ser de 20,0 ml.
Luego de 15 minutos se trasvasa el contenido del generador a un matraz de 25 ml y se agregan 0,5 ml de una solución de molibdato de amonio - ácido sulfúrico y 1 ml de $N_2H_4.H_2SO_4$ 15%. Se lleva a volumen y se deja 75 minutos. Se lee la absorbancia de la solución a 845 nm frente a un blanco de reactivos.

Se prepara una curva de calibración con 0,0 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 y 6,0 ml de una solución patrón de As_2O_3 (10,00 μg/ml) Cada uno de los patrones se somete al mismo tratamiento que la muestra.
La solución patrón de arsénico se prepara de la misma forma que en el método anterior. A partir de ella se prepara la solución de trabajo.

La masa de As_2O_3 en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg As_2O_3) Para expresar esa masa en As se multiplica el valor por 0,757.
La concentración de As en la miel se calcula en μg/g de miel.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de arsénico en alimentos.

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 986.15, 1995)

Se digieren 20 gramos de miel con HNO_3 en un sistema cerrado. Sobre una alícuota de la muestra digerida se agrega 1 ml de $Mg(NO_3)_2$, se calienta hasta sequedad y se continúa el calentamiento a 375°C (707ºF) Se incinera en mufla, durante 30 minutos, a 450°C (842ºF) para oxidar cualquier materia carbonosa y eliminar el exceso de $Mg(NO_3)_2$.
El residuo se disuelve en 2,0 ml de HCl 8M y se agrega 0,1 ml de KI 20% para reducir el As^{5+} a As^{3+}. Paralelamente se prepara un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.
Luego de 2 minutos se lee la absorbancia con la lámpara correspondiente.

Se prepara una curva de calibración con 2,0 ml de $MgCl_2$ (35,5 mg/ml) y alícuotas de 50 μl de una solución patrón conteniendo 0,0 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,20 y 0,25 μg de As. Se agrega a cada una 0,1 ml de KI 20% y al cabo de 2 minutos se mide la absorbancia con la lámpara correspondiente.
La solución patrón de arsénico (10,0 μg/ml) se prepara disolviendo 1,320 gramos de As_2O_3 en el mínimo volumen de NaOH 20%, se acidifica con HCl (1 + 1) y se lleva a 1 litro con agua. A partir de esta solución se prepara la solución de trabajo.

La concentración de arsénico en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de As en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de As en la miel se calcula en μg/g de miel.

Cobre

Métodos de análisis

Espectrofotometría (A.O.A.C. 960.40, 1990)

El método consiste en digerir la muestra con HNO_3 y H_2SO_4. El Cu se aísla y determina colorimétricamente, a pH 8,5, como dietilditiocarbamato en presencia de EDTA (agente complejante) para eliminar la interferencia del Bi y Te.

El procedimiento que se emplea para destruir la materia orgánica presente es el mismo que se explicó para el análisis del contenido de arsénico. Se toman 25 ml de la solución de digestión en una ampolla de decantación, se agregan 10 ml de una solución de citrato-EDTA y se lleva a pH 8,5 con NH_4OH 6 N utilizando azul de timol como indicador (hasta coloración verde o azul verdoso) A continuación se agrega 1 ml de la solución de dietilditiocarbamato y se extrae el compuesto de cobre con CCl_4.
Se determina la absorbancia a 400 nm en una celda de 1 cm de paso óptico.

La mayor exactitud del método se alcanza trabajando con una masa de Cu (en la alícuota de muestra) de aproximadamente 25 μg. Si la masa es mayor de 50 μg debe diluirse al doble con SO_4H_2 2 N o tomar una alícuota menor.

La curva de calibración se prepara a partir de una solución patrón de Cu de 2μg/ml. Se toman 0 - 1 - 2,5 - 5 - 10 - 15 y 20 ml y se llevan a 25 ml con SO_4H_2 2 N. El Cu se extrae siguiendo el mismo procedimiento que para la muestra.

La solución patrón (1 mg/ml) se prepara disolviendo 2,000 gramos de cobre en 15 ml de HNO_3 (1 + 4), se deja estar el tiempo suficiente para que se disuelva totalmente, se hierve, enfría y diluye a 200 ml. A partir de esta solución se prepara la solución de trabajo.

La masa de Cu en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg Cu)

La concentración de Cu en la miel se calcula en μg/g de miel.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de cobre en los alimentos.

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 971.20, 1995)

Una porción de muestra, convenientemente preparada, se vaporiza en horno de grafito conectado a un Espectrómetro de Absorción Atómica previamente calibrado usando una solución patrón de cobre.

Se pesa aproximadamente 1 gramo de miel (la concentración de Cu en la solución final debe ser menor de 10 μg/ml), se deja reaccionar con HNO_3, y se evapora hasta sequedad. Se calienta con HNO_3 y $HClO_4$ hasta obtener una solución clara. Se lleva a 50 ml con agua. Paralelamente se prepara un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

El contenido de cobre se determina midiendo la absorbancia a 324,7 nm.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Cu de 1000 μg/ml. Los patrones deben contener 0,0 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 2,0 - 4,0 - 8,0 y 10,0 μg Cu/ml. Se halla por extrapolación la concentración del metal en μg/kg de muestra.

La solución patrón de Cu (1000 μg/ml) se prepara disolviendo 1,000 gramos (99,99% de Cu) en 20 ml de HNO_3, se enfría y lleva a 1000 ml con agua.

La concentración de cobre en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Cu en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.

La concentración de Cu en la miel se calcula en μg/g de miel.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de cobre en la miel.

Plomo

En la miel se han reportado valores promedio de 0,053 μg de Pb / 1000 gramos. En un trabajo realizado con mieles de distintos orígenes se hallaron diferencias entre el contenido de Pb en mieles monoflorales (0,096 ± 0,056 μg/kg.), mieles multiflorales (0,042 ± 0,033 μg/kg.) y mieles de mielada (0,095 ± 0,040 μg/kg.) (Vorlova, 2002)

El plomo se encuentra en el polvo, vapores, superficies del laboratorio, etcétera. En este caso es particularmente importante realizar un ensayo en blanco y que éste posea menos de 1 microgramo de Pb.
Este valor puede alcanzarse trabajando con material meticulosamente lavado, reactivos de altísima pureza y exponiendo el blanco en la mufla o baño de vapor el mismo tiempo que la muestra.

Métodos de análisis

Espectrofotometría con ditizona (A.O.A.C. 934.07, 1990)

El plomo forma con la ditizona un complejo rojo que se extrae de una solución acuosa en condiciones estandarizadas, con un volumen determinado de $HCCl_3$ y un pH comprendido entre 9,5 y 10,0. Siempre queda un exceso de ditizona, de modo que debe determinarse no sólo el complejo coloreado sino también la ditizona libre (verde) La medición se realiza a 510 nm y a esta longitud de onda el complejo rojo de plomo absorbe fuertemente mientras que el verde prácticamente no presenta absorción.
Se agrega KCN para eliminar interferencias tales como Sn^{++}, Bi y Tl. La ditizona es destruida, bajo las condiciones de trabajo, por grandes cantidades de hierro y agentes oxidantes fuertes como los halógenos libres.

La preparación de la muestra puede realizarse tanto por vía húmeda como vía seca.
En el primer caso se digieren 10 gramos de miel en un balón de Kjeldhal (A.O.A.C. 963.21C, 1990) Al finalizar la digestión se agregan 100 ml de agua y suficiente cantidad de HCl como para disolver cualquier residuo de $CaSO_4$. Si se observa residuo se filtra a través de un filtro de vidrio sinterizado. Se disuelve el posible $PbSO_4$, contenido en el precipitado, sucesivamente con 10-20 ml de una solución caliente de HCl-ácido cítrico y de NH_4AcO, finalmente se lava con agua caliente.

Si se elige la segunda alternativa se obtienen las cenizas de 10 gramos de miel dejando la muestra durante toda la noche a menos de 500 ºC (932 ºF) El residuo se solubiliza en 15-20 ml de HCl, se pasa a una ampolla de decantación y se agregan 20 ml de una solución de ácido cítrico 1%. Se alcaliniza ligeramente con NH_4OH y se deja entre 1 y 2 minutos.
Si se forma un precipitado debe disolverse con HCl porque muchos precipitados alcalinos (fosfatos de Ca y Mg, hidróxidos y silicatos de Al e Fe) atrapan al plomo. La formación de precipitado puede evitarse pesando menor cantidad de muestra.

Si no se forma precipitado se agregan 5 ml de una solución de KCN 10%, el pH debe ser mayor o igual a 8,5.

Si la solución de cenizas está muy coloreada debido a altas concentraciones de Fe se recomienda llevar el pH a un valor mayor o igual a 10,0 para evitar que en presencia de Fe puede oxidarse la ditizona.

Se extrae el complejo rojo de Pb con cloroformo.

Se toma la fase orgánica y se agrega HNO_3 1%, el ditizonato de Pb se analiza en la fase acuosa.

Se prepara una curva de calibración con 5 ó 6 patrones preparados a partir de una solución patrón de Pb (2 mgPb/ml) que contengan entre 0 y 10 μgPb/ml. El metal se extrae siguiendo el mismo procedimiento que se aplica para la muestra.

El patrón se prepara disolviendo 3,197 mg de $Pb(NO_3)_2$ /ml en HNO_3 1%.

Se mide la absorbancia de una alícuota de la muestra procesada a 510 nm, la masa de Pb presente en la muestra se obtiene por extrapolación de la curva de calibración la cual debe realizarse para cada determinación y mediante ella hallar los valores de la ordenada al origen y la pendiente porque depende marcadamente de la solución de ditizona empleada.

La masa de Pb en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg Pb)

La concentración de Pb en la miel se calcula en μg/g de miel.

Remoción del estaño

El Sn se torna una interferencia cuando su concentración es mayor de 150 mg/kg. Para eliminarlo pueden aplicarse dos métodos alternativos.

- Volatilización de la solución ácida de cenizas, como $SnBr_4$: en este caso las cenizas disueltas en HCl se tratan con HBr.

- Tratamiento con polisulfuro de sodio: el Pb se aisla por precipitación como sulfuro.

La solución ácida de cenizas se lleva a pH 3,0 - 3,4 con NH_4OH luego de agregar ácido cítrico (10 gramos) Puede adicionarse $CuSO_4$. $5H_2O$ como coprecipitante, especialmente si la concentración de Pb es baja.

A continuación la solución se satura con H_2S, el precipitado se filtra y solubiliza con HNO_3.

Detección y remoción del bismuto

Se dispone de dos métodos alternativos, aplicables para cantidades pequeñas de Bi.

- El Bi se extrae con ditizona a pH 2,0. Cuando todo el metal fue extraído, se observa color verde, se lleva el pH a 8,5 con NH_4OH y se procede a la extracción del Pb previo agregado de KCN.

- Tratamiento con polisulfuro de sodio: se disuelve la mezcla de sulfuros con HNO_3 caliente y se separa el Bi del Pb como se explicó en el punto anterior.

Se recomienda este paso cuando se optó por la precipitación de los sulfuros para eliminar el Sn.

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 972.25, 1990)

La muestra se digiere con una mezcla de tres ácidos (HNO_3, H_3SO_4 y $HClO_4$) El Pb se extrae por co-precipitación con $SrSO_4$. Se decantan las sales solubles de sulfato y el precipitado se transforma en el carbonato correspondiente.
Luego de disolverlo en HNO_3 1N se analiza con un Espectrómetro de Absorción Atómica, con llama oxidante con una mezcla de aire-C_2H_2, previamente calibrado usando una solución patrón de plomo.
El contenido de plomo se determina midiendo la absorbancia a 217,0 o 283,3 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga menos de 10 gramos de sustancia seca y más de 30 microgramos de Pb. Se coloca en un balón de Kjeldhal con 2 ml de una solución de $SnCl_2$ 2% y 15 ml de la mezcla de ácidos, preparada de acuerdo con el método, por cada gramo de materia seca y se deja durante 2 horas.
Se debe calentar hasta que sólo quede H_2SO_4 y sales inorgánicas. Puede ocurrir que la muestra forme espuma, en ese caso debe enfriarse y agregarse HNO_3, si es necesario. Se enfría nuevamente y se agregan 15 ml de agua, se centrifuga a 350xg durante 10 minutos y se decanta el líquido. Se agregan 20 ml de agua y 1 ml de $H_2SO_4$1N.
Una vez finalizado el tratamiento se agregan 25 ml de solución saturada de $(NH_4)_2CO_3$ 20%, se deja durante 1 hora, se centrifuga y se decanta el líquido. Debe repetirse el tratamiento sobre el líquido residual.
El precipitado se disuelve en 5,0 ml de HNO_3 1N (si la cantidad de Pb es mayor de 25μg puede agregarse mayor cantidad), se agita vigorosamente para eliminar el CO_2, se deja durante 10 minutos y se centrifuga.

Se prepara una curva de calibración midiendo la absorbancia de seis patrones, preparados por dilución de 0 - 1 - 3 - 5 - 10 - 15 y 25 ml de la solución de trabajo (100 μgPb/ml) en matraz de 100 ml con HNO_3 1N.
La solución patrón de Pb (1000 μgPb/ml) se prepara disolviendo 1,5985 gramos de $Pb(NO_3)_2$, recristalizado, en 500 ml de HNO_3 1N, se lleva a 1 litro con este ácido. Se realiza la dilución correspondiente, con HNO_3 1N, para obtener la solución de trabajo.

La concentración de plomo en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Pb en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de Pb en la miel se calcula en μg/g de miel.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de plomo en miel.

Un método alternativo para la preparación de la muestra, antes del análisis por Espectrometría de Absorción Atómica, consiste en obtener las cenizas de 10 a 15 gramos de miel dejando la muestra durante toda la noche a menos de 500 ºC (932 ºF) Si al cabo de ese tiempo el residuo presenta partículas de carbón se agregan pequeñas porciones de HNO_3 5% y se vuelve a calcinar hasta eliminar totalmente la materia carbonosa. El residuo se solubiliza en 15-20 ml de HCl y se lleva a 50 ml con agua.

Si se elige este camino para la preparación de la muestra el valor del volumen que debe utilizarse en la fórmula es de 50,0 ml.

Polarografía (A.O.A.C. 982.23, 1995)

El método consiste en calcinar la muestra con K_2SO_4 y HNO_3 a 500 ºC (932 ºF) El Pb se determina por polarografía (ASV)

Se parte de 5 a 10 gramos de miel, las cenizas se disuelven en 1 ml de HNO_3 y se llevan a 50 ml con agua. Se toman 5,0 ml y se agregan 5,0 ml de solución electrolítica (1,7M en ácido acético, 1,25M en acetato de sodio y 0,1M en ácido tartárico) El pH de la solución en la celda debe ser de 4,3 $\pm$ 0,3.
Esta solución se mide en un polarógrafo, a -0,45 $\pm$ 0,05 V, con electrodo gotero de mercurio y electrodo de calomel o de Ag/AgCl como electrodo de referencia, a temperatura ambiente entre 20 y 30 ºC (68 y 86 ºF)
Paralelamente se mide un blanco de reactivos.

Se prepara una curva de calibración con patrones cuya concentración esté comprendida entre 0,1 y 10μgPb/ml.
La solución patrón de Pb (1,0 mgPb/ml) a partir de la cual se preparan los patrones se obtiene disolviendo 1,000 gramos de Pb (99,99%) en 10 ml de HNO_3 y se lleva a 1 litro con agua.

Se grafica la masa de Pb, en μg, en función de la altura del pico, en μA. A partir de esta curva se calcula la masa de Pb en la alícuota de muestra.
La concentración de Pb en la miel se calcula en μg/g de miel.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de plomo en alimentos.

Hierro

En miel se han encontrado valores de hasta 200 mg/kg, de óxido de hierro con valores promedio de 50 mg/kg.

Métodos de análisis

Espectrofotometría (A.O.A.C. 944.02, 1990)

Se reduce el Fe^{+++} presente en la muestra luego de la destrucción de la materia orgánica, con hidroxilamina. El Fe^{++} reacciona con α,α'-dipiridilo dando un catión complejo divalente de color rojo intenso o con la o-fenantrolina dando el complejo o-fenantrolinaferroso de color rojo. La concentración del producto final se determina espectrofotométricamente a 510 nm. La muestra puede ser digerida por vía seca o húmeda:

- Vía seca: se obtienen las cenizas calcinando 10,0 gramos de la muestra a 500ºC (932ºF) El residuo se disuelve en 2,0 ml de HCl calentando sobre baño de vapor durante 5 minutos y se lleva a 100 ml con agua.

- Vía húmeda: se sigue el mismo procedimiento empleado para la destrucción de la materia orgánica que en el caso del análisis del contenido de arsénico. Se parte de 10,0 gramos de miel y, luego de la digestión el volumen final debe ser de 100 ml.

En ambos casos se toma una alícuota de 10 ml y se agrega 1 ml de $H_2NOH.HCl$ 10%, 9,5 ml de $NaCH_3COO$ 2M y 1 ml de solución 0,1% de o-fenantrolina o 2 ml de solución 0,1% de α,α'-dipiridilo y se lleva a 25 ml con agua.
El contenido de hierro se determina midiendo la absorbancia a 510 nm contra un blanco de reactivos.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Fe (0,1 mg/ml) Se preparan once soluciones conteniendo 0,0 - 2,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 - 25,0 - 30,0 - 35,0 - 40,0 y 45,0 ml de una solución 0,01 mg/ml. Se agrega a cada una 2,0 ml de HCl y se llevan a 100 ml con agua. Cada uno de ellos se somete al mismo tratamiento que la muestra.
La solución patrón de Fe se prepara disolviendo 0,1000 gramos de Fe en 20 ml de HCl y 50 ml de agua, se lleva a 1000 ml con agua. La solución de trabajo se prepara a partir de esta solución.

La masa de Fe en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg Fe)
La concentración de Fe en la miel se calcula en μg/g de miel.

En aquellos casos en los cuales la concentración de hierro sea muy alta, debido posiblemente a una contaminación, se recomienda partir de una alícuota menor de muestra, en lugar de 10,0 ml se toman 5,00 ml y se reduce a la mitad el volumen de los reactivos.

Este método fue adoptado por el Codex Alimentarius para la determinación de hierro en alimentos.

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 965.09, 1990)

Una porción de muestra, convenientemente preparada, se analiza en un Espectrómetro de Absorción Atómica previamente calibrado usando una solución patrón de hierro. La muestra se quema en presencia de aire - C_2H_2.

Se calcinan 10,0 gramos de miel a 500 ºC (932 ºF), las cenizas se disuelven en HCl 2N, se hierven durante algunos minutos y se llevan a 100 ml con agua.
El contenido de hierro se determina midiendo la absorbancia a 248,3 nm.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Fe (1000 μg/ml) Se preparan soluciones conteniendo 0,0 - 2,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 y 20,0 μg Fe/ml.

La solución patrón de Fe se prepara hirviendo 1,000 gramos de Fe en 30 ml de HCl 6N, se lleva a 1000 ml con agua.

La concentración de hierro en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Fe en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de Fe en la miel se calcula en μg/g de miel.

Zinc

Métodos de análisis

Espectrofotometría (A.O.A.C. 944.09, 1990)

El método consiste en digerir la muestra por vía húmeda. El Pb, Cu, Cd, Bi, Sb, Sn, Hg y Ag se eliminan como sulfuros con una solución de cobre como agente defecante. Simultáneamente se elimina el Co y el Ni extrayéndolos con $HCCl_3$ como complejos metálicos de α-nitroso-β-naftol y dimetilglioxima respectivamente.
El Zn se extrae con CCl_4 como ditizonato de Zn.

Se pesan 50 gramos de miel (entre 25 y 100 μg de Zn), se agrega HNO_3 y se calienta cuidadosamente hasta que finalice la primera reacción violenta. Se adicionan 2 a 5 ml de SO_4H_2, y se continúa el calentamiento hasta completar la digestión, agregando pequeñas porciones de HNO_3 para evitar la formación de carbón. Cuando la solución está apenas coloreada se agregan 0,5 ml de $HClO_4$ y se calienta nuevamente.
Una vez finalizada la digestión se diluye a 40 ml con agua.

Previamente a la precipitación de los sulfuros se neutraliza la solución con NH_4OH, en presencia de $CuSO_4$ (2mg/ml) usando rojo de metilo como indicador. A continuación se lleva el pH a 1,9 - 2,1 con HCl. Los metales que interfieren se precipitan con H_2S.
Se filtra y descarta el precipitado luego de lavarlo convenientemente. El filtrado, luego de eliminar el H_2S, se hierve con solución saturada de Br_2 en agua. La solución resultante, previamente neutralizada con NH_4OH y llevada a pH ligeramente ácido, debe llevarse a un volumen adecuado (en general a 100 ml) para que contenga 0,2 a 1,0 μg Zn/ml.

El paso siguiente consiste en la eliminación del Ni y el Co. Se transfieren 20 ml de la solución anterior a una ampolla de decantación y se agregan 5 ml de una solución de citrato de amonio 11,25%, 2 ml de dimetilglioxima 0,2% y 10 ml de α-nitroso-β-naftol 0,05%, los complejos metálicos se extraen con $HCCl_3$.
El Zn se aisla y cuantifica en la fase acuosa. Se agregan 2,0 ml de ditizona y 10 ml de CCl_4. Sobre la fase orgánica se agregan 25 ml de HCl 0,04 N y se agita para transferir el complejo a la fase acuosa ácida. El solvente se descarta y se agregan 5,0 ml de una solución de citrato de amonio y 10,0 ml de CCl_4 a la capa acuosa, el pH debe estar comprendido entre 8,8 y 9,0. Se

agrega un volumen apropiado de ditizona (se determina experimentalmente) Se toman 5,0 ml de la fase orgánica, se diluye con 10,0 ml de CCl_4 y se determina la absorbancia a 540 nm.
Paralelamente se prepara un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Zn (500 μg/ml) Se toman 0 - 1 - 2 - 3 y 4 ml de la solución de trabajo (5μg/ml) y se llevan a 25 ml con HCl 0,04 N, se agregan 5,0 ml de buffer citrato y se someten al mismo procedimiento aplicado para el aislamiento y cuantificación del metal en la muestra.
La solución patrón de Zn se prepara disolviendo 0,500 gramos Zn puro en un pequeño exceso de HCl 0,04 N y se lleva a 1000 ml con agua. A partir de esta solución se prepara la solución de trabajo.

La masa de Zn en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg Zn)
La concentración de Zn en la miel se calcula en μg/g de miel.

Espectrometría de Absorción Atómica

Se dispone de dos métodos instrumentales para la investigación y cuantificación de Zn, ambos adoptados por el Codex Alimentarius para la determinación de zinc en alimentos.

- (A.O.A.C. 969.32, 1990)

La muestra puede digerirse por vía seca o húmeda. El residuo se toma con ácido y se diluye de modo tal que la concentración de Zn en la solución de trabajo esté comprendida dentro del rango óptimo de medición.
La absorbancia se mide con un Espectrómetro de Absorción Atómica previamente calibrado usando una solución patrón de zinc.
El contenido de zinc se determina midiendo la absorbancia a 213,8 nm.

La masa de muestra debe ser menor de 10 gramos. Si la muestra se digiere por vía seca deben obtenerse las cenizas a 525ºC (977ºF) y disolverse en HCl (1+1) La solución se lleva a 25 ml con el mismo ácido.
La digestión por vía húmeda se lleva a cabo con H_2SO_4 y HNO_3. La muestra digerida se lleva a 25 ml con H_2SO_4 (1 + 49)
En caso de ser necesaria una dilución posterior, esta debe realizarse con HCl 0,1N o H_2SO_4 (1 + 49) de acuerdo con el método de digestión empleado.
Paralelamente se realiza un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

Se efectúa una curva de calibración midiendo la absorbancia de cuatro patrones, preparados a partir de 0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 y 2,0 ml de la solución de trabajo y llevados a 25 ml con H_2SO_4 (1 + 49) si la digestión se llevó a cabo por vía húmeda o, en caso contrario, con HCl 0,1N.
La solución patrón de Zn (500 μg/ml) se prepara disolviendo 0,500 gramos de Zn puro en 5 a 10 ml de HCl, se evapora casi hasta sequedad y se lleva a 1000 ml con agua. La solución de trabajo (5 μg/ml) se obtiene a partir de la solución madre.

La concentración de zinc en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Zn en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de Zn en la miel se calcula en μg/g de miel.

- (A.O.A.C. 986.15, 1995)

La muestra se digiere con HNO_3 en un sistema cerrado. El Zn se determina por Espectrometría de Absorción Atómica, luego de transformar el As y el Se en sus respectivos hidruros.
Se lleva a sequedad y se disuelve en $HClO_4$ (1 + 99) Se analiza por espectrometría, usando llama de aire-C_2H_2.

Antimonio

Métodos de análisis

Espectrofotometría (A.O.A.C. 964.16., 1990)

La muestra se digiere por vía húmeda. El Sb^{5+} en solución ácida se hace reaccionar con Rodamina B, el compuesto rojo se extrae con benceno. Se mide la absorbancia de la solución a 565 nm.

La miel se digiere siguiendo el mismo procedimiento que se utiliza para la determinación espectrofotométrica de arsénico (A.O.A.C. 963.21C, 1990) teniendo la precaución de mantener las condiciones oxidantes durante toda la digestión.
A continuación se transfiere el digerido a un balón apropiado, se agregan 5 ml de H_2SO_4 y se calienta hasta eliminación de humos blancos de SO_3.
La muestra digerida se enfría en baño de hielo durante 30 minutos, al cabo de los cuales se agregan, lentamente, 5 ml de HCl 6N frío. Luego de transcurridos 15 minutos se agregan sucesivamente y en el menor tiempo posible, siempre en baño de hielo, 8 ml de H_3PO_4 3N y 5 ml de solución acuosa 0,02% de Rodamina B. Se agita y se extrae el complejo coloreado con 10 ml de benceno, agitando vigorosamente. Se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 565 nm.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Sb (100 μg/ml) Se toman 0 - 2 - 4 - 6 - 8 y 10 ml de la solución de trabajo (1μg/ml) en balón apropiado, se agregan 5 ml de H_2SO_4 y se someten al mismo tratamiento que la muestra.
La solución patrón de Sb se prepara disolviendo 0,1000 gramos Sb puro en 25 ml de H_2SO_4 con calentamiento, cuidadosamente se lleva a 1000 ml con agua.

La masa de Sb en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. μg Sb)

La concentración de Sb en la miel se calcula en μg/g de miel.

Espectrofotometría de Masa por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 993.14, 2000)

La muestra se digiere con HNO_3 y HCl y los elementos se determinan por Espectroscopia de Masa por Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS)

Se parte de aproximadamente 1 gramo de miel, debe prepararse un blanco.
La muestra digerida y el blanco se transfieren cuantitativamente a un matraz de modo que la concentración del ión en la solución que se va a analizar sea menor de 100 μg/ml.

El patrón (1000 μg Sb/ml) se prepara a partir de 0,100 gramos de polvo de antimonio en 2 ml de HNO_3 (1 + 1) y 0,5 ml de HCl con agua purificada convenientemente.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 100 μg/ml.

El instrumento proporciona directamente la concentración de cada elemento en μg/ml de la solución de análisis.
La concentración del elemento en la miel se calcula en μg/1000 gramos de miel.

Este método puede aplicarse para la determinación de trazas de elementos de interés en la miel tales como As, Cd, Cr, Cu, Cu, Pb, Mn, Ni, Se, Zn, entre otros.

Estaño

Métodos de análisis

Gravimetría (A.O.A.C. 25.132, 1980)

Se precipita el Sn en medio ácido como SnS y se pesa como SnO_2.

La muestra puede se digiere por vía húmeda con HNO_3 y H_2SO_4 (A.O.A.C. 963.21C, 1990) Una vez finalizada la digestión se agrega agua y se neutraliza con NH_4OH y a continuación, en exceso de ácido, se precipita el Sn con H_2S. Luego de reprecipitar y lavar convenientemente, el precipitado se calcina en mechero y se pesa como SnO_2.
Para expresar esa masa en Sn se multiplica el valor por 0,7877.
La concentración de Sn en la miel se calcula en μg/g de miel.

Volumetría (A.O.A.C. 25.134, 1980)

Se precipita el Sn en medio ácido como SnS, el Sn^{4+} se reduce a Sn^{++} y luego se titula en medio ácido con I_2. El Sn^{++} es fácilmente oxidado por el aire, especialmente durante la titulación por esta razón se trabaja en atmósfera de CO_2.

Se obtiene el SnS siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, el precipitado se filtra a través de asbestos y se disuelve en HCl con $KClO_3$, luego de eliminar el exceso de cloro se hace burbujear CO_2. Se agrega solución de almidón y se titula inmediatamente con una solución de I_2 0,01 N.
Puede agregarse un exceso de yodo y titular el exceso, por retorno, con una solución de $Na_2S_2O_3$ 0,01 N.
La concentración de Sn en la miel se calcula en μg/g de miel.

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 25.136, 1980)

Una porción de muestra, convenientemente preparada, se analiza en un Espectrómetro de Absorción Atómica previamente calibrado usando una solución patrón de estaño. La muestra se quema en presencia de N_2O - C_2H_2.

Se digieren 20,0 gramos de miel en presencia de HNO_3 y H_2SO_4 y el residuo se transfiere a un matraz de 100 ml con agua, se agregan 5 ml de solución saturada de NH_4Cl y 50 ml de alcohol metílico enfriando bajo la canilla. Puede precipitar $CaSO_4$ pero no interfiere en el ensayo.
El contenido de estaño se determina midiendo la absorbancia a 235,5 nm y llama de N_2O - C_2H_2.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Sn (1000 μg/ml)
La solución patrón de Sn se prepara disolviendo 1,000 gramos de Sn puro en 150 ml de HCl, se lleva a 1000 ml con agua.

La concentración de estaño en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Sn en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de Sn en la miel se calcula en μg/g de miel.

Cadmio

Métodos de análisis

El analista dispone de diferentes métodos para la determinación de este metal, el Cd puede analizarse aplicando el método de ditizona (A.O.A.C., 945.58, 1990), por Espectrofotometría de Absorción Atómica o por Polarografía pero las concentraciones de Cd en miel son muy bajas y como consecuencia deben necesariamente aplicarse métodos instrumentales para su detección y cuantificación, por esta razón solamente estos van a ser expuestos.
En la miel se han reportado valores promedio de 3,3 μg de Cd / 1000 gramos. En un trabajo realizado con mieles de distintos orígenes se hallaron diferencias entre el contenido de Cd en

mieles monoflorales (1,55 ± 0,58 μg/kg.), mieles multiflorales (1,85 ± 1,75 μg/kg.) y mieles de mielada (19,3 ± 13,9 μg/kg.) (Vorlova, 2002)

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 973.34, 1990)

La muestra se digiere con HNO_3, H_2SO_4 y H_2O_2. Los metales que interfieren se extraen a pH 9 con una mezcla de ditizona - $CHCl_3$ y el Cd se recupera de la solución con HCl. Se analiza en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica previamente calibrado usando una solución patrón de cadmio. La muestra se quema en presencia de aire - C_2H_2 aunque dadas las bajas concentraciones de cadmio que deben detectarse se recomienda aplicar la técnica con horno de grafito.

Se digieren 5,0 gramos de miel en presencia de HNO_3 y H_2SO_4, al final de la digestión se agrega H_2O_2. El residuo se disuelve en agua bidestilada y se ajusta el pH a 8,8 con NH_4OH en presencia de azul de timol como indicador, se observa un viraje de verde-amarillento a azul-verdoso. Se practican varias extracciones con la solución de ditizona en $CHCl_3$ (0,2 mg/ml), se reúnen los extractos clorofórmicos y se extrae el Cd con HCl 0,2 N. Se descarta la fase clorofórmica, se evaporan a sequedad todos los extractos acuosos y el residuo se disuelve en 5,0 ml de HCl 0,2 N.
El contenido de cadmio se determina midiendo la absorbancia a 228,8 nm usando una llama de aire - C_2H_2.

Se prepara una curva de calibración a partir de una solución patrón de Cd (2,0 μg/ml) Las soluciones patrón deben contener 0,0 – 0,1 – 0,5 – 1,0 y 2,0 μg Cd/ml.
La solución patrón de Cd se prepara disolviendo 1,000 gramos de Cd en 165 ml de HCl, se lleva a 1000 ml con agua.

La concentración de cadmio en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Cd en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de Cd en la miel se calcula en μg/g de miel.

En caso que la concentración de Cd en la alícuota analizada quede fuera del rango de trabajo, debe diluirse con HCl 2 N.

Polarografía (A.O.A.C. 982.23, 1995)

El método consiste en calcinar la muestra con K_2SO_4 y HNO_3 a 500 ºC. El Cd se determina por polarografía (ASV)

Se parte de 5 a 10 gramos de miel, las cenizas se disuelven en 1 ml de HNO_3 y se llevan a 50 ml con agua. Se toman 5,0 ml y se agregan 5,0 ml de solución electrolítica (1,7M en ácido acético, 1,25M en acetato de sodio y 0,1M en ácido tartárico) El pH de la solución en la celda debe ser de 4,3 ± 0,3.

Esta solución se mide en un polarógrafo, a -0,62 ± 0,05 V, con electrodo gotero de mercurio y electrodo de calomel o de Ag/AgCl como electrodo de referencia, a temperatura ambiente entre 20 y 30 ºC.
Paralelamente se mide un blanco de reactivos.

Se prepara una curva de calibración con patrones cuya concentración esté comprendida entre 0,1 y 10μg Cd/ml.
La solución patrón de Cd (1,0 mgCd/ml) a partir de la cual se preparan los patrones se obtiene disolviendo 1,000 gramos de Cd (99,99%) en 10 ml de HNO_3 y se lleva a 1 litro con agua.

Se grafica la masa de Cd, en μg, en función de la altura del pico, en μA. A partir de esta curva se calcula la masa de Cd en la alícuota de muestra.
La concentración de Cd en la miel se calcula en μg/g de miel.

Mercurio

Método de análisis

En la miel se han reportado valores promedio de 1,2 μg de Hg / 1000 gramos. En un trabajo realizado con mieles de distintos orígenes se hallaron diferencias entre el contenido de Hg en mieles monoflorales (1,05 ± 0,17 μg/kg.), mieles multiflorales (1,08 ± 0,36 μg/kg.) y mieles de mielada (1,91 ± 0,58 μg/kg.) (Vorlova, 2002)

Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C., 971.21, 1995)

La muestra se calienta a reflujo con HNO_3 7N, H_2SO_4 18 N y solución de molibdato de sodio al 2% y a continuación se somete a un tratamiento con una mezcla de HNO_3 - $HClO_4$ (1 + 1) Luego de diluir con agua se toma una alícuota que se coloca en el aparato para el análisis.

Se prepara el blanco de reactivos y la curva de calibración a partir de una solución patrón de Hg (1000 μg/ml) sometiendo 0,0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 y 1,0 μg aplicando idéntico tratamiento que la muestra.
La solución patrón de Hg se prepara disolviendo 0,1354 gramos de $HgCl_2$ en agua, la dilución para la solución de trabajo se prepara con H_2SO_4 1 N.

La concentración de mercurio en la alícuota de muestra analizada se obtiene directamente del aparato o en su defecto se grafican los valores de absorbancia de los patrones en función de la masa de Hg en μg y se obtiene, por extrapolación, la masa en la alícuota de muestra. Debe aplicarse la corrección con el blanco de reactivos.
La concentración de Hg en la miel se calcula en μg/g de miel.

BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies. Agilent Technologies Announces Routine, Sensitive Method for Determining Nitrofuran Metabolites in Food Animal Products (2003) Consulta del 18 de enero, 2004. http://www.agilent.com/about/newsroom/presrel/2003/24jun2003b.html

Amáncio Guerra Peixoto T. M. e Oliveira Horta Franklin H. M. de. Nivéis de Inseticidas Organoclorados em Mel de Abelha (1986) *Bol. SBCTA, Campinas, 20/3/41, jul/dez, pp. 195-200.*

Analyse de la Streptomycine dans les Miels. Consulta del 31 de marzo, 2004. *http://www.beekeeping.com/articles/fr/streptomycine.htm.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13th Ed (1980) Official Final Action. Tin. Gravimetric Method. *Washington, DC. Sec. 25.132-25.133, pp. 410.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13th Ed (1980) Official Final Action. Tin. Volumetric Method. *Washington, DC. Sec. 25.134-25.135, pp. 410.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13th Ed (1980) Official Final Action. Tin. Atomic Absorption Method. *Washington, DC. Sec. 25.136-25.138, pp. 410-411.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 934.07. Lead in Food. General Dithizone Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 258-262.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 942.17. Arsenic in Food. Molybdenum Blue Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 244-245.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 944.02. Iron in Flour. Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. II, Chap. 32, pp. 778-779.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 944.09. Zinc in Food. Colorimetric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 272.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 945.58. Cadmium in Food. Dithizone Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 246-247.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 952.13. Arsenic in Food. Silver Diethydithiocarbamate Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 245.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 960.40. Copper in Food. Colorimetric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp.248.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 963.21C. Arsenic in Food. Kjeldhal Flask Digestion. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 244.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 964.16. Antimony in Food. Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 242-243.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 965.09. Nutrients (Minor) in Fertilizers. Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.2, pp. 27-28.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 969.32. Zinc in Food. Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 272-273.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 972.25. Lead in Food. Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 258.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 15th Ed (1990) Official Method 973.34. Cadmium in Food. Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 247-248.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 970.52. Organochorine and Organophosphorus Pesticide Residues. General Multiresidue Method. *Washington, DC. Sec. 10.1.01. Vol. I, Chap.10, pp. 1-10.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 971.20. Copper and Nickel in Tea. Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Sec. 9.1.07. Vol. I, Chap. 9, pp. 8- 9.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 971.21. Mercury in Food. Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 20-21.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 982.23. Cadmium and Lead in Food. Anodic Stripping Voltammetric Method. *Washington, DC. Sec. 9.1.02. Vol. I, Chap. 9, pp. 3-5.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 986.15. Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium and Zinc in Food. Multielement Method. *Washington, DC. Sec. 9.1.01. Vol. I, Chap. 9, pp. 1- 3.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 17th Ed (2000) Official Method 993.14. Trace Elements in Waters and Wastewaters. Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometric Method. *Washington, DC. Sec. 9.2.40. Vol. I, Chap. 9, pp. 49-59.*

Atienza J., Jiménez J. J., Bernal J. L. and Martín Mª. T. Supercritical Fluid Extraction of Fluvanilate Residues in Honey. Determination by High-performance Liquid Chromatography (1993) *Journal of Chromatography A. 655, pp. 95-99.*

Bernal J. L., Jiménez J. J., del Nozal Mª. J. y Toribio L. Análisis de Residuos de Plaguicidas en Alimentos. Productos de la Colmena. *Plaguicidas. Aspectos Ambientales, Analíticos y Tecnológicos. (1998) Ed. I. Morell y L. Candela, pp. 147-162.*

Bogdanov, S. Current Status of Analytical Methods for the Detection of Residues in Bee Products (2003) *Apiacta 38, pp.190-197.*

Bogdanov S., Kilchenmann V., Imdorf A. and Fluir P. Residues in Honey after Application of Thymol against Varroa using the Franco Thymol Frame. Consulta del 28 de febrero, 2004. *http://www.beekeeping.com/articles/us/thymol.htm*

Cabras, P., Melis, M. and Spanedda, L. Determination of Cymiazole Residues in Honey by Liquid Chromatography (1993) *Journal of Association Official Agricultural Chemists Vol.76, N°1, pp. 92-94.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. General Requirements. Definitions for the Purpose of the Codex. Alimentarius. *Volume 1. Section 2 (1991)*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Recommended Methods of Analysis and Sampling. *Codex Stan 234-1999.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. General Methods of Analysis for Contaminants. *Codex Stan 228, Rev (2) 2001.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits (MRLs) for Pesticides. *CAC/MRL 1, 2001.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs. *CAC/MRL 2, 2001.*

C.A.C. Codex. Alimentarius Commission. Extraneous Maximum Residue Limits (EMRLs) *CAC/MRL 3, 2001.*

CREHA. Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos. Plan Anual de Residuos y Toxinas en Alimentos de Origen Animal (2003)

Decisión 2001/181/CE de la Comisión, de 13 de marzo de 2003, por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al Establecimiento de Límites Mínimos de Funcionamiento Exigidos (MRPL) para Determinados Residuos en Alimentos de Origen Animal. *Diario Oficial, No L 71 de 15.03.2003.*

Directiva 94/29/CE del Consejo, de 23 de junio de 1994 por la que se modifican los Anexos de las Directivas 86/362/CEE y 86/363/CEE relativas a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los cereales y en los productos alimenticios de origen animal, respectivamente *Diario Oficial, No L 083 de 13.4.1995.*

Directiva 86/362/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986 relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas en y sobre los productos alimenticios. *Diario Oficial, No L 221 de 7.8.1986.*

Fernández García, Mª. I. y García Fernández, Mª. A. Determinación de Plaguicidas en Miel (1993) *Vida Apícola Nº 57, Enero-Febrero, pp. 48-53.*

Fernández Muíño, M. and Simal Lozano, J. Simplified Method for the Determination of Organ Chorine Pesticides in Honey (March 1991) *J. Analyst, Vol. 116, pp. 269-271*.

Formica J. Gas Chromatographic Determination of Residues of Bromopropylate and Two of its Degradation Products in Honey (1984) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.67, N°5, pp. 896-898.*

Galeano Díaz, Guiberteau, Cabanillas, Salinas. Rapid Determination of Sulpathiazile, Oxitetracycline and Tetracycline in Honey by High Performance Liquid Chromatography (1990) *Analytical Letters 23 (4), pp. 607-616.*

González Novelo, S.A., Rivas Burgos, J., Sauri Duch, E. y Zumarraga Barbudo, C. Análisis de Antibióticos en Miel de Abejas (2001) *Notiabeja Nº 6, Noviembre-Diciembre, pp.1-2.*

Gratzfeld-Huesgen, A. Sensitive Analysis of Bisphenol A in Polycarbonates using HPLC and Fluorescence Detection. (06/1997) *Hewlett-Packard, Germany, Publication Number 12-5965-9043E.*

Horie, M., Sarro, K., Nose, N. and Nakazawa, H. Simultaneous Determination of Sulfonamides in Honey by Liquid Chromatography (1992) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol.75, N°5, pp. 786-789*.

Horn, H. Intensive Practical Course of Honey Analysis (1996) *Landesanslalt für Bienenkunde. Universität Hohenheim. Stuttgart. Germany.*

Jiménez J. J., Bernal J. L., del Nozal Mª. J., Toribio L. and Martín Mª. T. Gas Chromatography with Electron-capture and Nitrogen-phosphorus Detection in the Analysis of Pesticides in Honey after Elution from a Florisil Column. Influence of the Honey Matrix on the Quantitative Results (1998) *Journal of Chromatography A. 823, pp. 381-387.*

Jiménez J. J., Bernal J. L., del Nozal Mª. J., Martín Mª. T. and Mayorga A. L. Solid-phase Microextraction Applied to the Analysis of Pesticide Residues in Honey Using Gas Chromatography with Electron-capture Detection (1998) *Journal of Chromatography A. 829, pp. 269-277.*

Khismatoullin, R., Kuzyaev, R., Lyapunov, Y. and Elovikova, E. Modification of Microbiological Detection Method of Tetracycline in Honey (2003) *Apiacta 38, pp.246-248.*

Klementz, D. and Pestemer, W. Extraktion, “clean-up” und HPLC – Bestimmung von streptomycin in Apfel-, Honig- und Nektarproben. – erste ergebnisse aus

freilandversuchen (1996) *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 48, pp.280-284.*

Legg, D. R., Baumgartner, A., Salter, R. and Wheeler, A. ROSA (Rapid One Step Assay) for Antibiotics in Honey (2003) *Apiacta.38, pp.207-217.*

Legislación Alimentaria de la Comunidad Europea. Principios Fundamentales. Contaminantes. Reglamento General sobre Contaminantes en Alimentos. *Volúmen 1. Sección 9.2. (Marzo 1997), pp. 2.*

Leiter, A., Zöllner, P. and Lindner, W. Determination of the Metabolites of Nitrofuran Antibiotics in Animal Tissue by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (2001) *Journal of Chromatography A 939 (1-2), pp. 49-58.*

Neidert, E., Baraniak, Z. and Sauve, A. Rapid Quantitative Thin Layer Chromatographic Screening Procedure for Sulfathiazole Residues in Honey. (1986) *J.Assoc. Off. Anal. Chem. 69, pp. 641-645.*

Nitrofuran / Furazolidon. Consulta del 18 de enero (2003) http://www.rikilt.dlo.nl/Services/Info%20Nitrofuran.

Ogata, J. and Bevenne, A. Chlorinated Pesticide Residues in Honey (1973) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. New York, 9(3), pp. 143-147*.

Pagliuca, G., Gazzotti, T., Kindt, M., Zironi, E., Formato, G. e Rosmini, R. La vigilanza Sanitaria sul Miele: Proposta di un Metodo Analitico per la Determinaziones di Residui di Ossitetraciclina e Sulfatiazolo mediante HPLC (2000) *Apidologie, 31, pp. 517-524.*

Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J., Sniegocki, T. and Grzebalska, A. Sulfonamide Residues in Honey. Control and Development of Analytical Procedures (2003) *Apiacta 38, pp. 249-256.*

Quintana-Rizzo, J., Salter, R. and Saul, S. Confirmation of Amphenicols in Honey using HPLC-Receptorgram. (2003) *Apiacta 38, pp. 218-225.*

Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial, No L 67 de 7.3.1997.*

Reglamento 315/93/CEE del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los alimentos. *Diario Oficial No L 37 de 13.2.1993.*

Resolución GMC 62/92 (Resolución MSyAS 003, 11/01/95) Residuos de Plaguicidas en los Productos Agrícolas.

Resolución GMC Nº 15/94 (Resolución MSyAS 01, 11/01/95) Reglamento Técnico MERCOSUR de Identidad y Calidad de Miel.

Resolución GMC Nº 102/94 (Resolución MSyAS 184, 30/05/95) Contaminantes Inorgánicos. Límites máximos de Tolerancia para MERCOSUR.

Resolución SAGPyA Nº 125, 11/03/98. Adoptase un criterio integral respecto de los controles a realizarse en tejidos, fluidos, excreciones de animales, productos, subproductos y derivados de origen animal para detectar la presencia de residuos de sustancias químicas sintéticas y naturales, ya sea que dichos productos fueren de origen nacional o de importación, destinados al consumo interno o la exportación.

Resolución SAGPyA Nº 270, 09/06/00. Anexo VIII. Producción Apícola Orgánica.

Resolución SAGPyA Nº 451, 17/08/01. Modificación de la Resolución N° 1286/93 del ex Servicio Nacional de Sanidad Animal, en relación con la condición de los animales tratados con medicamentos veterinarios alopáticos de síntesis química o antibióticos.

Resolución SENASA N° 248, 12/05/95. Se prohíbe el uso de nitrofurazona, sus derivados y sus diferentes sales en medicina veterinaria.

RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) 03-04-26. Consulta del 30 de mayo, 2004. *http://www.sceti.co.jp/medical/PdfFiles/rbo/R3701_Nitrofurane_AOZ.pdf.*

RIDASCREEN® Nitrofuran (AMOZ) 03-06-30. Consulta del 30 de mayo, 2004. *http://www.sceti.co.jp/medical/PdfFiles/rbo/R3711_Nitrofurane_AMOZ.pdf.*

Royal Society of Chemistry. The Agrochemicals Handbook. (1987) *2nd ed. Unwin Brothers Limited, Surrey.*

Sheht, H. B. and Sporns P. Enzyme Immunoassay for Screening of Sulfathiazole in Honey (1990) *J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73, pp. 871-874.*

Schwartz, D.P. and Sherma J. Practical Screening Procedure for Sulfathiazole in Honey (1986) *J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, pp. 72-76.*

Sporns, P. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Phenol in Honey (1981) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol. 64, N°2, pp. 337-339.*

Su-Hsiang, T., Pi-Chiou, C. and Shin-Shou, C. Determination of Amitraz Residue in Fruits by High Pressure Liquid Chromatographic (1999) *Journal of Food and Drugs Analysis 7(3), pp. 225-232.*

Takeba et. al. Determination of Phenol in Honey by High Pressure Liquid Chromatographic with Amperometric Detection (1990) *Journal of Official Association Agricultural Chemists Vol. 73, N°4, pp. 602-604.*

Tarbin, J. A. and Shearer, C. G. Screening of Sulphonamides in Egg using Gas Chromatography – Mass Selective and Liquid Chromatographic – Mass Spectrometry (1999) *Journal of Chromatography B 729, pp. 127-138.*

Verzegnassi, L., Royer, D., Mottier, P. and Stadler, R. H. Analysis of Chloramphenicol in Honeys of Different Geographical Origin by Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (April 2003) *Food Additives & Contaminants. Taylor & Francis. Volume 20, Number 4, pp. 335-342.*

Vorlova, L., Celechovska, O. Activity of Enzymes and Trace of Element Content in Bee Honey (2002) *Acta Vet. Brno., 71, pp. 375-378.*

Wehling, M., von der Ohe, W. and von der Ohe K. Natural Content of Formic and Oxalic Acids in Honeys (2003) *Apiacta.38, pp. 257.*

CAPÍTULO VII

ANÁLISIS NUTRICIONAL

√ Hidratos de Carbono

√ Ácidos

√ Proteínas

√ Lípidos

√ Aminoácidos

√ Vitaminas

√ Minerales

√ Valor Calórico

ANÁLISIS NUTRICIONAL

Interesa conocer la composición cualitativa y cuantitativa de todos los constituyentes de la miel con el objeto de determinar el valor nutricional de la miel.
Este estudio se realiza, desde el punto de vista de la salud, con el fin de saber cuales son los componentes del alimento y su importancia para una dieta apropiada. En otros casos se requiere este análisis si se desea incluir en el rotulado del envase la información nutricional.

Los resultados de los análisis de vitaminas y aminoácidos deben analizarse cuidadosamente porque en algunos casos los apicultores utilizan productos bioestimulantes y energizantes para la alimentación y nutrición de las abejas con el objeto de evitar deficiencias nutritivas y el consiguiente desequilibrio de la colmena. Estos productos son ricos en aminoácidos y vitaminas y pueden modificar la composición normal de la miel, este hecho es sumamente importante en trabajos de investigación donde se busque establecer los valores del contenido normal de estos micronutrientes en la miel.

Los métodos de análisis que se aplican para realizar este estudio, en muchos casos, son los mismos que se utilizan para el estudio de la composición físico-química de la miel o para la búsqueda de residuos.
Los métodos analíticos que ya fueron analizados en los capítulos correspondientes no se explicarán en detalle. En este capítulo solamente se desarrollarán aquellos métodos específicos como por ejemplo: investigación y cuantificación de vitaminas, aminoácidos y algunos minerales que normalmente no se investigan como contaminantes.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

- HIDRATOS DE CARBONO

La cuantificación de los hidratos de carbono totales puede realizarse por Cromatografía en Columna (A.O.A.C. 954.11, 1995), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (A.O.A.C. 977.20, 1995) o Cromatografía Gas – Líquido (Bogdanov, 1997), en los dos últimos casos también podrá conocerse el perfil de carbohidratos.

- ACIDEZ

Los ácidos presentes en la miel no contribuyen particularmente al valor calórico de este alimento.
La realización de este análisis solamente está justificada si el interés reside en conocer la composición acídica de la miel.

Los métodos más utilizados para conocer el perfil de ácidos son la Cromatografía en Capa Fina (Randerath, 1974) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, esta última también permite cuantificarlos.

Métodos de análisis

Cromatografía en Capa Fina sobre Sílica Gel

La miel (aproximadamente 10 gramos) se disuelve en 100 ml de agua. Se preparan patrones de los ácidos cuya presencia desea investigarse.

Las condiciones de la cromatografía en son las que a continuación se detallan:

- Solvente: se utilizan eluyentes relativamente polares.

Ácidos fórmico, acético, pirúvico y láctico: Piridina / éter de petróleo (1:2) o Alcohol etílico / amoníaco / agua (80:4:16)

Ácidos maleico y fumárico: Alcohol etílico / amoníaco / agua (80:4:16)

Ácidos oxálico, malónico, succínico, glutárico, adípico, pimélico, subérico, azelaico y sebásico: Alcohol etílico 96º / agua / amoníaco 25% (100:12:16)

- Revelador: se utilizan soluciones indicadoras como verde de bromocresol, azul de bromofenol, púrpura de bromocresol, rojo de metilo o éster del ácido dihidroindantroazidilsulfúrico. Por ejemplo el púrpura de bromocresol se prepara en solución de 0,04 gramos en etanol 50% regulada hasta pH 10 con NaOH.

- Volumen de muestra: se aplican 2 μl tanto de muestra como de estándares.

Cromatografía en Capa Fina sobre Celulosa

Con este método se obtienen excelentes separaciones de ácidos monocarboxílicos (láctico y pirúvico), dicarboxílicos (succínico – fumárico – malónico y α-cetoglutárico) y tricarboxílicos (cítrico – isocítrico y cis-aconítico)

La muestra se prepara como se explicó anteriormente, en este caso la cromatografía es bidimensional.

Las condiciones de la cromatografía son las que a continuación se detallan:

- Solvente: (1) Alcohol etílico 98% / amoníaco 25% / agua (8:2:1) y (2) Alcohol isobutílico / ácido fórmico 5N (2:3)

- Revelador: Verde de bromocresol, se prepara en solución de 0,04 gramos en isopropanol regulada hasta pH 7 con NaOH 2 N. Se observan manchas amarillas sobre fondo azul verdoso.

- Volumen de muestra: se aplican 2 μl tanto de muestra como de estándares.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Este método tiene la ventaja frente al los anteriores de permitir cuantificar la totalidad de los ácidos orgánicos presentes en la miel. En la bibliografía se han reportado gran cantidad de determinaciones de ácidos orgánicos en diferentes alimentos, principalmente en derivados de frutas (Shaw, 1983) (Coppola, 1986) (Romero Rodríguez, 1991) A continuación se presentan las condiciones generales para el ensayo.

Se prepara una solución acuosa de miel al 1% y se analiza bajo las siguientes condiciones:

- Columna: C_{18}.
- Fase móvil: buffer fosfato de pH comprendido entre 2,0 y 2,5.
- Detector: UV-visible. La longitud de onda de análisis varía entre 210 a 215 nm.
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  - Se trabaja con un flujo de 0,6 ml/min.
  - Se trabaja con patrones externos de los correspondientes ácidos.
  - El volumen de inyección es de 10μl.
  - El tiempo de corrida es de aproximadamente 30 minutos.

Los resultados se expresan en miligramos por 100 gramos de miel.

En estas condiciones se han separado mezclas de ácidos, entre los que se pueden citar: oxálico, tartárico, málico, acético, cítrico, succínico, ascórbico, dehidroascórbico y láctico, entre otros (Abreu Payrol, 2001)

- PROTEÍNAS

Para la cuantificación de las proteínas puede utilizarse cualquiera de los métodos explicados oportunamente. En general el método Micro-Kjeldhal es el más recomendado para este tipo de análisis (A.O.A.C. 962.18, 1995)

Si se desea conocer el perfil de proteínas puede aplicarse la técnica de Isoelectroenfoque luego de extraer las proteínas utilizando uno de los dos métodos alternativos usados para el ensayo del patrón interno en la investigación de azúcares C-4, ya explicados en el Capítulo V. Este estudio está justificado únicamente desde el punto de vista de la investigación (IEF, 1973)

- LÍPIDOS

La cuantificación del residuo graso de la miel no se incluye entre los análisis de rutina porque la miel posee una pequeña proporción de lípidos.

El análisis de las sustancias grasas presentes en la miel reviste importancia debido a la presencia de ciertos ácidos dicarboxílicos característicos que se utilizan como un índice de genuinidad del producto.

Una determinación interesante desde el punto de vista nutricional está dada por el estudio del espectro de ácidos grasos y esteroles presentes en los lípidos de la miel.

El aislamiento y cuantificación del contenido graso de la miel puede llevarse a cabo por extracción con una mezcla de cloroformo y ácido fórmico. Una posterior saponificación con KOH 4% en etanol permite separarlo en dos fracciones:

- Lípidos ácidos: se transforman en sus ésteres metílicos y se analizan por Cromatografía Gas-Líquido utilizando una columna polar.

- Insaponificable: se precipitan los esteroles con digitonina y se analizan por Cromatografía Gas-Líquido.

Con la finalidad de aumentar el grado de separación de los distintos ácidos grasos los ésteres metílicos pueden hidrogenarse antes del análisis cromatográfico. Esos compuestos hidrogenados son separados por formación de compuestos de inclusión en urea (algunos no forman esos compuestos de inclusión) y luego analizados por Cromatografía Gas-Líquido (Pereyra González, 1993)

Para separar los lípidos de la miel se transfieren 100 ml de una solución de muestra al 50% a una ampolla de decantación y se agregan 160 ml de una mezcla de cloroformo / ácido fórmico (2:1) Se practican tres extracciones, las capas orgánicas reunidas se agitan con aproximadamente 70 ml de agua. La fase orgánica se lava dos veces con solución de lavado (capa superior resultante de agitar 200 ml de la mezcla de extracción con 50 ml de agua)
Se filtra, se destila el solvente a presión reducida y a 60 °C (140 ºF), el residuo se solubiliza en cloroformo y se transfiere a un recipiente tarado. El residuo seco se obtiene luego de eliminar el solvente calentando en estufa a 70 °C (158 ºF) y al vacío.
El cálculo de los resultados se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{m_R \times 100}{m_m}$$

m_R masa de residuo graso, en gramos.

m_m masa de muestra, en gramos.

- **Estudio de ácidos grasos totales en los lípidos ácidos** (Pereyra González, 1993)

A continuación se presenta una síntesis de la metodología aplicada para conocer el porcentaje de ácidos grasos totales en la fracción grasa y su perfil cualitativo y cuantitativo.

El total de lípidos aislados se saponifica, los lípidos ácidos se obtienen a partir de la solución resultante de los líquidos de lavado de la fase etérea del insaponificable y la solución hidroalcohólica de jabones resultante.
Se agrega HCl (1+4) hasta reacción ácida a la heliantina y se extraen los cuerpos acídicos con éter etílico, se lava hasta reacción neutra al tornasol de los líquidos acuosos, se filtra, se destila el éter en evaporador rotatorio, el residuo se solubiliza en éter etílico y se transfiere a un recipiente tarado. El residuo seco se obtiene luego de eliminar el solvente calentando en estufa a 70 °C (158 ºF) y al vacío.
El cálculo de los resultados se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lípidos ácidos} = \frac{m_R \times 100}{m_m}$$

m_R masa de lípidos ácidos, en gramos.

m_m masa de lípidos totales, en gramos.

Cromatografía Gas-Líquido

El primer paso para realizar la Cromatografía Gas-Líquido consiste en la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.
El método de preparación se basa en la neutralización de los ácidos grasos libres y metanólisis alcalina de los glicéridos, seguida de esterificación de los ácidos grasos en medio ácido. Los métodos recomendados se detallan a continuación (Reglamento (CE), 2002):

- Transesterificación en frío con solución de KOH en metanol (cuando el contenido de ácidos grasos libres es menor de 3,3%) El KOH no esterifica los ácidos grasos libres. Los ésteres etílicos de los ácidos grasos se transesterifican más lentamente que los glicéridos y puede ocurrir que sólo se metilen parcialmente.

- Metilación en caliente con solución metanólica de metilato de sodio seguido de esterificación en medio ácido (cuando el contenido de ácidos grasos libres es mayor de 3,3%)

En el primer caso se pesan 0,1 gramos de grasa en un tubo de 5 ml, con tapa. Se añaden 2 ml de heptano y 0,2 ml de solución de KOH 2 N en metanol y se agita enérgicamente durante 2 minutos.
Se toma la capa superior que contiene los ésteres metílicos y se analiza en el cromatógrafo, la solución no debe guardarse más de 12 horas.
En el segundo caso se pesan 0,25 gramos de grasa en un recipiente apropiado y se calienta a reflujo durante 15 minutos con 10 ml de solución metanólica de metilato de sodio 0,2 N.
Se neutraliza con H_2SO_4 en solución metanólica 1 N, se agrega un ligero exceso y se hierve durante 20 minutos. Se agregan 20 ml de solución saturada de NaCl y se agita. Los ésteres metílicos se extraen con heptano.

Las condiciones cromatográficas que se recomienda aplicar para llevar a cabo la determinación se detallan a continuación:

- Columna: Cromosorb A.W. 60/80 con 14% de adipato de etilenglicol.

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: de ionización de llama (FID)

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 30 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 200 °C (392 °F), en el horno y en el detector es de 194 °C (381 °F)
  c) Los patrones se preparan con los ésteres metílicos de los ácidos grasos al 5% en éter etílico.
  d) El volumen de inyección de muestra derivatizada disuelta en hexano es de 1 a 8 μl.

- **Estudio de esteroles totales en el insaponificable** (Pereyra Gonzáles, 1993)

Para conocer el porcentaje de esteroles totales en la fracción grasa y su perfil cualitativo y cuantitativo se recomienda la aplicación de la metodología que se detalla a continuación.

Se parte de 50 gramos de miel disuelta en 50 ml de agua, se extrae la grasa como se explicó anteriormente. El residuo graso total aislado se saponifica con 25 ml de solución alcohólica de KOH 4% durante 45 minutos.
Se extrae el insaponificable con éter etílico, se lava hasta reacción neutra al tornasol de los líquidos acuosos, se filtra, se destila el éter en evaporador rotatorio, el residuo se solubiliza en éter etílico y se transfiere a un recipiente tarado. El residuo seco se obtiene luego de eliminar el solvente calentando en estufa a 70 °C (158 ºF) y al vacío.
El cálculo de los resultados se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Insaponificable} = \frac{m_R \times 100}{m_m}$$

m_R masa de insaponificable, en gramos.

m_m masa de lípidos totales, en gramos.

Para la cuantificación del los esteroles totales se pesan exactamente 600 miligramos de insaponificable, se llevan a 25 ml con alcohol absoluto y sobre una alícuota de 10 ml se precipitan con 9 ml de una solución de digitonina 1%. Luego de dejarlo toda la noche se filtra el precipitado formado, se lava con solución de lavado (73 ml de acetona, 18 ml de agua y 9 ml de etanol absoluto) Se seca a 100 °C (212 ºF) durante 2 horas y se pesa el residuo.

El porcentaje de esteroles totales se calcula con la ayuda de la fórmula que se presenta a continuación.

$$\% \text{ Esteroles totales} = \frac{m_R \times 100 \times f}{m_m}$$

m_R masa de esteroles totales, en gramos.

f factor de dilución.

m_m masa de insaponificable, en gramos.

Cromatografía Gas-Líquido

Previamente al análisis cromatográfico deben aislarse los esteroles totales del insaponificable, para ello se siembran dos bandas del insaponificable, disuelto en 2 ml de una mezcla de etanol / éter etílico, en una placa de sílica gel utilizando colesterol como indicador.
La corrida se lleva a cabo con una mezcla de hexano y éter etílico en partes iguales.
Luego de separar de la placa la porción de la banda correspondiente a los esteroles (se compara una de las bandas del insaponificable con la banda del patrón de colesterol previo revelado con 2,7-diclorofluoresceína) se disuelve en éter etílico, se filtra y se evapora el solvente. De este modo la muestra ya está preparada para su análisis por Cromatografía Gas-Líquido.

Las condiciones cromatográficas que se recomienda aplicar para llevar a cabo la determinación se detallan a continuación:

- Columna: Cromosorb A. W. 60/80 con 3% de OV 17.

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: de ionización de llama (FID)

- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 30 ml/min.
  b) La temperatura en el puerto de inyección es de 300 °C (572 °F), en el horno 260 °C (500 °F) y en el detector es de 300 °C (572 °F)
  c) Los patrones se preparan con los correspondientes esteroles al 5% disueltos en éter etílico.
  d) El volumen de inyección de muestra es de 1 a 3 μl.

- AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos encontrados en la miel son: ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina y valina,
La prolina es el más importante desde el punto de vista de la genuinidad del producto ya que es el aminoácido que se encuentra en mayor proporción. El método para la determinación de este aminoácido fue explicado en detalle en el capítulo IV.

En este capítulo se expondrán los métodos disponibles para la determinación cualitativa y cuantitativa de todos los aminoácidos.

Métodos de análisis

- Cromatografía en Capa Fina

Este método permite conocer el perfil de aminoácidos, se analizan los estándares en las mismas condiciones que la muestra y se comparan con la muestra. El primer paso en la determinación consiste en la separación de los compuestos por pasaje a través de una columna de intercambio catiónico y una extracción con NH_4OH.

Se pesan alrededor de 100 gramos de miel, la solución se clarifica con alcohol etílico 80% dejándola en reposo varias horas. Luego de filtrar se evapora el alcohol y la solución restante se lleva a 250 ml con agua destilada. La muestra así preparada se pasa a través de la columna de intercambio iónico, los aminoácidos se eluyen con NH_4OH 1N, se obtiene el residuo por evaporación y se disuelve en una mezcla de n-propanol / agua (70:30)

A continuación se lleva a cabo una Cromatografía en Capa Fina bidimensional en las siguientes condiciones (A.B.A., 1968):

- Soporte: placa de celulosa.
- Solvente: (1) n-propanol / n-butanol / hidróxido de amonio 1,5% (3:3:2) y (2) n-propanol / metiletilcetona / ácido fórmico 25% (5:3:2) 1% en ninhidrina.
- Revelador: luego de calentar durante 30 minutos aparecen manchas azul-violáceas a excepción de la prolina e hidroxiprolina que dan manchas amarillas.
- Volumen de muestra: se aplican 2 μl tanto de muestra como de estándares.

- Analizador de aminoácidos

Mediante este método la muestra se pasa a través de una columna de intercambio catiónico seguido de cuatro eluciones secuenciales con compuestos de Li (se lleva a cabo en el analizador) A continuación se mide la absorbancia de la muestra entre 440 y 570 nm luego de una reacción post columna con ninhidrina a 131 °C (267,8 °F) Se utilizan (S)-2-Aminoetil-1-Cisteína o Ácido Glucosamínico como estándar interno (SRC, 2004)

El método está basado en la técnica desarrollada por Moore y Stein (Moore, 1963)

Los resultados van a depender de cuales sean los aminoácidos presentes en la muestra, por ejemplo si se desea conocer la existencia de metionina y cisteína estos deben oxidarse a metionina sulfona y ácido cístico respectivamente. Este procedimiento que puede llevarse a cabo con agentes oxidantes tales como el ácido perfórmico destruye la tirosina de modo que el perfil completo de aminoácidos de la miel se obtendrá de la combinación de varias determinaciones en distintas condiciones (A.O.A.C. 994.12, 1995)

- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución**

La determinación de aminoácidos por medio de esta metodología puede llevarse a cabo en diferentes condiciones. En general se utiliza una columna de fase reversa mediante la cual se pudieron separar 16 aminoácidos, el pico correspondiente a la serina se superpuso con el pico del ácido aspártico (Fabiani, 2002)
El pH de la muestra se lleva a 8,5 con una solución buffer de borato 200 mM y a continuación se derivatizan los aminoácidos usando 9-fluorenilmetil-cloroformato, el exceso de reactivo se elimina con la amina hidrofóbica hidrocloruro de 1-amino-adamantane. La medición se realiza a 263 nm con un tiempo de corrida de aproximadamente 35 minutos.

- **VITAMINAS**

La determinación de vitaminas no es un análisis de rutina. En general se realiza el análisis cualitativo y cuantitativo de vitaminas en trabajos de investigación o cuando se desea conocer el valor nutricional de este alimento.
Dadas las pequeñas cantidades de vitaminas presentes en la miel, su gran variabilidad natural y el efecto perjudicial que pueden tener los procesos de fraccionamiento y extracción a los cuales es sometida la muestra, es necesario trabajar con grandes cantidades de miel lo que dificulta la tarea debido a las características del producto.

En términos generales los distintos procesos a los cuales se somete la miel, particularmente el calentamiento, afectan en gran medida el contenido vitamínico.
Entre los procesos térmicos, la pasteurización es uno de los más ampliamente utilizados. Si se respetan los tiempos cortos y se controla correctamente la temperatura la destrucción de vitaminas es pequeña. La mayor fuente de destrucción de vitaminas es el calentamiento incontrolado durante su procesamiento, si las temperaturas son elevadas y los tiempos muy largos la disminución del nivel vitamínico es drástica. Este es un punto crítico del proceso que puede conducir a la obtención de una miel que ha perdido prácticamente todas sus vitaminas.
Las vitaminas B_1 y C son muy sensibles a la temperatura.
La biotina es relativamente estable frente a la acción del calor.
La acidez elevada puede ocasionar la pérdida de vitaminas tales como B_1, C, ácido fólico y ácido pantoténico, la estabilidad de este último depende del pH alcanzando su mayor estabilidad entre pH 6 y 7.
Los agentes oxidantes con los cuales la miel entra en contacto durante su procesamiento y envasado tales como el oxígeno y la luz destruyen las vitaminas B_1, B_{12}, C y el ácido fólico.
La biotina es una de las vitaminas más estables frente a los agentes oxidantes.
La presencia de altas concentraciones de iones metálicos afecta la estabilidad de algunas vitaminas, la reacción de degradación es catalizada por estos iones. La vitamina C es destruida por Cu e Fe y la B_1 principalmente por el Cu.
Las condiciones no apropiadas de estacionamiento, especialmente en lugares con alta temperatura ambiente pueden ocasionar una considerable pérdida del contenido vitamínico, al igual que la incidencia directa de la luz sobre el alimento. Las vitaminas B_2 y B_6 son las más sensibles a la luz mientras que la biotina es bastante estable a la luz UV.
La vitamina B_1 se inactiva por acción del $SO_3^{=}$.

Algunas vitaminas, en general, son relativamente estables tales como la niacina y la vitamina B_{12}.

Existen diferentes métodos que permiten identificar y cuantificar el contenido de vitaminas en los alimentos aplicables a la miel.

Es sumamente importante que la muestra sea preparada de modo tal que el proceso a que vaya a ser sometida no destruya la vitamina que se desea cuantificar, de lo contrario los resultados no serán confiables. Se recomienda trabajar con patrones que sean sometidos al mismo tratamiento que la muestra.

Es importante también, tener en consideración que las vitaminas pueden estar ligadas a componentes propios del alimento, esto dificulta el proceso de extracción y puede conducir a errores por defecto.

Métodos de análisis

Los métodos aplicados al análisis de estos compuestos pueden ser:

Microbiológico: miden una determinada respuesta frente a cantidades crecientes de vitamina, por ejemplo crecimiento o capacidad de fermentación. Se trabaja con un determinado microorganismo que necesita la vitamina para su crecimiento.
Actualmente son muy utilizados.

Físico-Químico: se basan en determinaciones cromatográficas (HPLC), espectrofotométricas, espectrofluorométricas y reacciones colorimétricas (de productos de oxidación) entre otras. Son los métodos más ampliamente usados. En la mayoría de los casos son específicos para cada vitamina.

Biológico: los métodos biológicos fueron los primeros que se aplicaron a este tipo de análisis, son muy costosos, poco reproducibles y requieren mucho tiempo.

Las vitaminas hidrosolubles se extraen del alimento con ácido clorhídrico, en caliente, y a continuación se aplica un tratamiento enzimático o se pasa a través de una columna de extracción en fase sólida dependiendo de la vitamina que se desea analizar. Una vez extraída se cuantifica de acuerdo con el método elegido.

Si se eligen métodos cromatográficos, en algunos casos, pueden determinarse varias vitaminas simultáneamente. A continuación se presenta una somera descripción de la metodología existente para el análisis individual de cada vitamina ya que en la miel, como en la mayoría de los alimentos, las cantidades de estos nutrientes son tan variables que un mismo método no permite la determinación conjunta debido a los diferentes límites de detección para los distintos compuestos. Esto no implica que no sea posible llevar a cabo determinaciones conjuntas, por lo menos para algunas de las vitaminas que se pueden investigar en la miel.

- **Ácido Ascórbico (Vitamina C)**

Se dispone de diferentes métodos para la identificación y cuantificación del ácido ascórbico. Técnicas espectrofluorométricas, polarográficas y cromatográficas pueden ser aplicadas al estudio de esta vitamina. La metodología que se desarrollará es la que a continuación se detalla:

Titulación oxidativa (A.O.A.C. 967.21, 2000)

Se basa en la reducción del indicador 2,6-diclorofenolindofenol (DCFI) por el ácido ascórbico, interfieren los agentes reductores.
En el punto final el exceso de colorante no reducido es color rosado en solución ácida. La vitamina se extrae con una mezcla de ácido metafosfórico y acético y se titula en este medio para mantener la acidez apropiada para llevar a cabo la reacción y evitar la auto oxidación del ácido ascórbico a pH alto.
Se toma un volumen apropiado de solución de miel y se agregan 50 ml de una solución de ácido oxálico 1%. Se titula con DCFI 0,025% hasta que la coloración rosada del punto final persista durante 15 segundos.
Paralelamente se titula una solución patrón de ácido ascórbico.

Espectrofotometría de los productos de oxidación (A.O.A.C. 967.22, 2000)

En este método el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico en presencia de carbón activado. La forma oxidada reacciona con o-fenilendiamina dando una sustancia fluorescente. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración.

Se pesan alrededor de 15 gramos de miel y se agregan 100 ml de solución de ácido metafosfórico / ácido acético (15 gramos de ácido en 40 ml de ácido acético llevados a 500 ml con agua bidestilada)
Se filtra y el filtrado se agita con carbón activado y se filtra nuevamente, descartando los primeros mililitros.
Se preparan dos blancos, de muestra y de patrón. Para ello se toman 5,0 ml de una solución de ácido bórico-acetato de sodio (3 gramos de ácido bórico en 100 ml de acetato de sodio 50%) en dos matraces de 100 ml y se agregan a 5,0 ml de muestra preparada y 5,0 ml de patrón respectivamente, se dejan en reposo 15 minutos y se llevan a volumen con agua bidestilada.
La muestra y el patrón se preparan adicionando 5,0 ml de muestra y 5,0 ml de patrón a dos matraces de 100 ml conteniendo 5,0 ml de solución de acetato de sodio 50% y llevando a volumen con agua bidestilada.
Se toman 2,0 ml de cada solución y se agregan 5,0 ml de solución 0,02 g% de o-fenilendiamina. A los 35 minutos se lee a 350 nm ($\lambda_{excitación}$) y a 430 ($\lambda_{emisión}$)

Se compara la concentración de vitamina en la muestra y en el patrón. Los resultados se expresan en μg/100 gramos de miel.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Lam, 1984)

La muestra puede prepararse siguiendo el método aplicado anteriormente o clarificar la solución con crema de alúmina. Antes de inyectar en el equipo la solución se filtra a través de un filtro de 0,45 μm.

Las condiciones cromatográficas sugeridas son las que se detallan a continuación:

- Columna: fase reversa C_{18}.
- Solvente: metanol / agua (15:85) (0,005 M en ácido etanosulfónico con 0,5% de trietilamina a pH 3,6.
- Detector: arreglo de diodos. La determinación se lleva a cabo a 254 nm.
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 2,0 ml/min.
  b) Se trabaja a temperatura ambiente 25 °C (77 °F)
  c) Se trabaja con una solución patrón de vitamina preparada disolviendo entre 20 y 80 miligramos de ácido ascórbico en 100 ml de agua.
  d) El volumen de inyección recomendado es de 10 μl.
  e) En estas condiciones el tiempo de retención de la vitamina es de aproximadamente 1,5 minutos.

- **Tiamina (Vitamina B_1)**

Espectrofluorometría (A.O.A.C. 942.23, 2000)

La muestra se somete a una hidrólisis ácida para liberar la vitamina combinada, luego se separa y purifica por Cromatografía de Intercambio Iónico. La vitamina se oxida con ferricianuro en medio alcalino y se obtiene tiocromo, derivado fluorescente. La fluorescencia es proporcional a la concentración de vitamina.

Se pesan 50 gramos de miel, se disuelven en 70,0 ml de HCl 0,1N y se deja en baño maría hirviente durante media hora, se filtra y se lleva a 100 ml con agua bidestilada.
La totalidad de la solución se pasa a través de una columna de intercambio iónico, se eluye la vitamina con tres porciones de solución hirviente de KCl 20% en HCl 0,1N luego de lavarla con 20 ml de agua caliente.
Se adicionan al eluido 3,0 ml de solución alcalina de ferricianuro (1 ml de ferricianuro de potasio 1% con 30 ml de NaOH 15%) e inmediatamente 15,0 ml de alcohol isobutílico.
Se preparan dos blancos, de muestra y de patrón agregando 3,0 ml de NaOH 15% en lugar de la solución de ferricianuro.

Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se lee la fluorescencia a 365 nm ($\lambda_{excitación}$) y a 435 nm ($\lambda_{emisión}$)

Se compara la concentración de vitamina en la muestra y en el patrón. Los resultados se expresan en μg/100 gramos de miel.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Nogueira Carvalho, 1993)

Para la preparación de la muestra se sigue el mismo procedimiento que en el caso anterior. Luego de filtrar la muestra preparada a través de un filtro de 0,45 μm se realiza la determinación cromatográfica en las siguientes condiciones:

- Columna: fase reversa C_{18}.
- Fase móvil: KCl 0,25% / metanol (50:50)
- Detector: de fluorescencia. Se mide a 362 nm ($\lambda_{excitación}$) y a 464 nm ($\lambda_{emisión}$)
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  - Se trabaja con un flujo de 0,5 ml/min.
  - Se trabaja con patrón externo de vitamina de 10 μg/ml.
  - El volumen de inyección es de 10μl.
  - La reacción de derivatización puede realizarse a la salida de la columna con ferricianuro alcalino. El flujo del reactor es de 0,6 ml/min.

El método de preparación de la muestra puede simplificarse purificando la muestra hidrolizada a través de una columna de extracción en fase sólida C_{18} y análisis cromatográfico previa derivatización con ferricianuro. La elución de la columna se lleva a cabo con una mezcla de metanol / buffer a pH 5,5 de 60:40.
En este caso la fase móvil es una mezcla de metanol y buffer acetato a pH 5,5 y las λ de onda de excitación y emisión son 370 y 435 nm respectivamente (Sims, 1993)

Esta vitamina puede determinarse conjuntamente con la vitamina C (Lam, 1984) En este caso el estándar se prepara a partir de 3 a 12 miligramos de tiamina disuelta en 10 ml de monotioglicerol y 400 ml de buffer a pH 3,6, luego de agregar 75 ml de alcohol metílico se lleva a 500 ml con buffer.
Se trabaja con dos detectores conectados en serie, a 254 nm y 280 nm para analizar tiamina y otras vitaminas.
El tiempo de elución en las condiciones del ensayo es de 9 minutos aproximadamente.

- **Riboflavina (Vitamina B_2)**

Para la determinación de esta vitamina deben seguirse los siguientes pasos:

- Extracción con soluciones ácidas.
- Transformación de todas las sustancias con actividad de vitamina B_2 en riboflavina.
- Purificación por cromatografía.
- Cuantificación por métodos físicos, químicos o microbiológicos.

Microbiológico (A.O.A.C. 940.33, 1995)

Este ensayo se lleva a cabo utilizando *Lactobacillus casei*. El crecimiento del microorganismo genera turbidez que se compara con estándares preparados paralelamente con la muestra. Se mide la transmitancia entre 450 y 660 nm.

Espectrofluorometría (A.O.A.C. 970.65, 2000)

En este método se mide la fluorescencia en el intervalo de pH de 3 a 5 ya que ella depende del pH.

Se pesan 50 gramos de miel, se disuelven en 70,0 ml de HCl 0,1N y se deja en baño maría hirviente durante media hora, se filtra y se lleva a 100 ml con agua bidestilada.
A una alícuota de 10,0 ml se agrega 1,0 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml de solución de permanganato de potasio 4%. Al cabo de 2 minutos se decolora con 0,5 ml de H_2O_2 3%, se agita y se lee la fluorescencia a 440 nm ($\lambda_{excitación}$) y a 565 nm ($\lambda_{emisión}$) La vitamina presenta fluorescencia verde amarillenta. Paralelamente se prepara el patrón.
Deben prepararse un blanco de muestra y uno de patrón siguiendo el mismo procedimiento empleado para la muestra pero agregando 20 miligramos de ditionito de sodio en la cubeta del aparato antes de la medición.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Nogueira Carvalho, 1993)

Para la preparación de la muestra se sigue el mismo procedimiento que en el caso anterior. Luego de filtrar la muestra preparada a través de un filtro de 0,45 μm se realiza la determinación cromatográfica en las siguientes condiciones:

- Columna: fase reversa C_{18}.
- Fase móvil: KCl 0,25% / metanol (50:50)
- Detector: de fluorescencia. Se mide a 432 nm ($\lambda_{excitación}$) y a 545 nm ($\lambda_{emisión}$)

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
  - Se trabaja con un flujo de 0,5 ml/min.
  - Se trabaja con patrón externo de vitamina de 10μg/ml.
  - El volumen de inyección es de 10μl.
  - Se hace una reacción post-columna con ferricianuro alcalino. El flujo del reactor es de 0,6 ml/min.

El método de preparación de la muestra puede simplificarse llevando a cabo la cromatografía directamente sobre la muestra hidrolizada en las mismas condiciones que las explicadas anteriormente para la determinación de tiamina, en este caso la medición se lleva a cabo a una λ de onda de emisión 520 nm (Sims, 1993)

Esta vitamina puede determinarse conjuntamente con las vitaminas C y B_1 (Lam, 1984) En este caso el estándar se prepara siguiendo que mismo procedimiento utilizado para la preparación del estándar de tiamina a partir de 2 a 12 miligramos de riboflavina.
El tiempo de elución en las condiciones del ensayo es de 14 minutos aproximadamente.

- **Ácido Nicotínico (Niacina)**

Microbiológico (A.O.A.C. 944.13, 1995)

Este ensayo se lleva a cabo utilizando *Lactobacillus plantarum*. El rango de determinación es muy estrecho y en algunos casos los resultados no son consistentes (Juraja, 2002)

Espectrofotometría (A.O.A.C. 961.14, 2000)

La determinación se basa en la reacción de la niacina (ácido nicotínico y nicotinamida) con ácido sulfanílico y bromuro de cianógeno para dar un compuesto piridínico que se transforma en derivados que reaccionan con aminas aromáticas. Los compuestos coloreados obtenidos se miden espectrofotométricamente.
Este es el método tradicional de determinación de esta vitamina. No es recomendable debido a que el bromociánogeno es altamente tóxico, el color obtenido es inestable y la precisión es mucho menor que con otros métodos disponibles.

Cromatografía Gas-Líquido (Hsiu-Jung, 2000)

La muestra puede analizarse directamente una vez disuelta en agua, no requiere tratamiento previo. Se utiliza 1,9-nonanediol como patrón interno

Las condiciones recomendadas de trabajo son las siguientes:

- Columna: polar (CP-Sil 24CB)

- Gas carrier: nitrógeno.

- Detector: de ionización de llama (FID) La temperatura es de 300 º C (572 ºF)

- Otros parámetros:
  j) Se trabaja con un flujo de 5 ml/min.
  k) La temperatura en el puerto de inyección es de 280 °C (526 °F) La temperatura inicial de la columna es de 100 °C (212 °F), a los 2 minutos se aplica una rampa de 8 °C/min. (46,4 °F/min.) hasta los 180 °C (356 °F) incrementándola hasta 250 °C (482 °F) a razón de 10 °C/min. (50 °F/min.) hasta alcanzar una temperatura 290 °C (554 °F) que se mantiene durante 3 minutos.
  c) La concentración de la solución estándar de niacina es de 0,2 gramos por 100 ml disuelta en alcohol metílico. La curva de calibración se prepara a partir de esa solución en concentraciones de 40 – 20 – 10 – 5 – 2 y 1 μg/ml.
  d) El volumen de inyección es de 0,1 μl.
  e) En estas condiciones la nicotinamida eluye a aproximadamente 12 minutos.

  El límite de detección es de 2 µg/ml.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Juraja, 2002)

La niacina se extrae de la miel calentando la muestra en autoclave durante 2 horas a 121 °C o en estufa a 130 °C durante un período equivalente en presencia de $Ca(OH)_2$, se ajusta al pH a 7,0 con solución de ácido oxálico 10% y luego se purifica a través de una columna de extracción en fase sólida C_{18} y otra de intercambio catiónico colocadas en serie. La muestra se eluye con una solución al 2% de NH_4OH en alcohol metílico que debe prepararse en el momento de usar. Se evapora el solvente y el residuo se disuelve en agua desionizada y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm.

La cromatografía se lleva a cabo en las siguientes condiciones;

- Columna: fase reversa C_8 o C_{18}.

- Fase móvil: metanol / agua desionizada (15:85) o (5:95)

- Detector: UV-visible. La medición se realiza a 284 nm.

- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.

- Otros parámetros:
- Se trabaja con un flujo de 1 a 1,5 ml/min.
- Se trabaja con un patrón de la vitamina que se somete al mismo tratamiento que la muestra.
- Bajo estas condiciones el tiempo de retención para el ácido nicotínico es de 9 minutos.

Esta vitamina puede determinarse conjuntamente con las vitaminas C, B_1 y B_2 (Lam, 1984) En este caso el estándar se prepara siguiendo que mismo procedimiento utilizado para la preparación del estándar de tiamina a partir de 20 a 110 miligramos de niacinamida.
El tiempo de elución en las condiciones del ensayo es de 3 minutos aproximadamente.

- **Piridoxina (Vitamina B_6)**

Microbiológico (A.O.A.C. 961.15, 1995)

Este ensayo se lleva a cabo utilizando *Saccharomyces uvarum*. El crecimiento del microorganismo genera turbidez que se compara con estándares preparados paralelamente con la muestra. Se mide la transmitancia a 550 nm.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Lam, 1984)

La muestra se prepara en agua clarificando la solución con crema de alúmina. Antes de inyectar en el equipo la solución se filtra a través de un filtro de 0,45 μm.

Las condiciones cromatográficas sugeridas son las que se detallan a continuación:

- Columna: fase reversa C_{18}.
- Solvente: metanol / agua (15:85) (0,005 M en ácido etanosulfónico con 0,5% de trietilamina a pH 3,6.
- Detector: arreglo de diodos. La determinación se lleva a cabo a 280 nm.
- Integrador: calcula directamente la concentración de los componentes de la muestra.
- Otros parámetros:
  a) Se trabaja con un flujo de 2,0 ml/min.
  b) Se trabaja a temperatura ambiente 25 °C (77 °F)
  c) Se trabaja con una solución patrón de vitamina preparada disolviendo entre 1 y 15 miligramos de clorhidrato de piridoxina en 10 ml de monotioglicerol y 400 ml de buffer a pH 3,6, luego de agregar 75 ml de alcohol metílico se lleva a 500 ml con buffer.
  d) El volumen de inyección recomendado es de 10 μl.
  e) En estas condiciones el tiempo de retención de la vitamina es de aproximadamente 4 minutos.

Esta vitamina puede determinarse conjuntamente con las vitaminas C, B_1, B_2 y niacina. El orden de elución es: vitamina C, niacina, B_6, B_1 y B_2 con un tiempo total de corrida de 20 minutos.

- **Cianocobalamina (Vitamina B_{12})**

Microbiológico (A.O.A.C. 952.20, 1995)

Este ensayo se lleva a cabo utilizando *Lactobacillus delbrueckii*. El crecimiento del microorganismo genera turbidez que se compara con estándares preparados paralelamente con la muestra. Se mide la transmitancia entre 540 y 660 nm.

El método es aplicable para muestras con concentraciones de vitamina mayores de 0,1 μg/g.

- **Ácido pantoténico**

Microbiológico (A.O.A.C. 945.74, 1995)

Este ensayo se lleva a cabo utilizando *Lactobacillus plantarum*. El ácido pantoténico se extrae de la miel y se transforma en una forma fácilmente reconocible por el microorganismo, después de extraerlo y diluirlo convenientemente se mide la turbidez generada por el crecimiento del microorganismo. Se mide la transmitancia entre 540 y 660 nm.

- MINERALES

Los minerales encontrados en la miel, importantes desde el punto de vista nutricional son: sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso, cobre, zinc, hierro y fósforo.

Los métodos de análisis aplicables para estos elementos deben necesariamente ser métodos instrumentales debido a las bajas concentraciones en que se encuentran, la química clásica no es útil porque los límites de detección no son suficientemente bajos como para obtener resultados confiables.

El análisis de los resultados debe llevarse a cabo con suma prudencia porque algunos de los minerales, propios de su composición, que normalmente se encuentran en la miel pueden estar en concentraciones altas debido a una contaminación. Un ejemplo importante es el Fe, la miel posee normalmente este metal pero si ocurrió una contaminación debido a un inadecuado material de almacenamiento podrían encontrarse valores superiores a los normales en miel.

A continuación se presentan los métodos de análisis para aquellos iones que generalmente se determinan en alimentos. Para otras determinaciones, como por ejemplo el análisis de Ni o Se, podrían aplicarse los métodos desarrollados para alimentos teniendo en cuenta la cantidad de muestra de partida de acuerdo con el límite de detección del método y la concentración del metal en la miel. El contenido de Ni puede determinarse por Espectrometría de Absorción Atómica (A.O.A.C. 971.20, 1995) al igual que el de Se (A.O.A.C. 986.15, 1995)

Sodio y Potasio

Los valores reportados de sodio son de 18 mg/kg en miel de flores y 76 mg/kg en mielada y de potasio de 205 mg/kg en miel de flores y 1676 mg/kg en mielada.

Método de análisis

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

La muestra se digiere con HNO_3 y $HClO_4$ y los elementos se determinan por Espectroscopia de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 10 miligramos de K y Na (10 gramos de miel), se digieren en un balón de Kjeldahl con HNO_3 / $HClO_4$ (2:1) durante toda la noche. Deben prepararse dos blancos. Antes de comenzar la digestión se calienta a baja temperatura sobre plancha calefactora, una vez iniciada la digestión se desprenden vapores rojo - anaranjados de NO_2. Luego de completada la reacción con el $HClO_4$ (cese de la formación de espuma) se calienta fuertemente durante 2 minutos. La muestra no debe secarse porque puede causar explosión.
La muestra digerida y los blancos se transfieren cuantitativamente a un matraz de 10 ml y se llevan a volumen con agua bibidestilada, si se forma precipitado debe disolverse. Para la determinación de K debe realizarse una dilución al quinto.

Los patrones se preparan como se indica a continuación:

Potasio: se disuelven 1,9067 gramos de KCl en agua bidestilada y se lleva a 1 l.
Sodio: se disuelven 2,5421 gramos de NaCl en agua bidestilada y se lleva a 1 l.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 200 μg/ml.

La medición se lleva a cabo en un Espectrómetro de Emisión por la técnica de plasma inductivamente acoplado a 766, 5 nm para el K y 589,0 nm para el Na.

El instrumento proporciona directamente la concentración de cada elemento, en μg/ml, de la solución de análisis.
La concentración del elemento en la miel se calcula en μg/1000 gramos de miel.

Calcio

Los valores reportados de calcio son de 49 mg/kg en miel de flores y 51 mg/kg en mielada.

Método de análisis

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

La concentración de Ca se determina aplicando el mismo método descripto anteriormente para Na y K midiendo a una longitud de onda de 317,9 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 10 miligramos de Ca (10 gramos de miel)

El patrón de Ca se prepara disolviendo 2,4973 gramos de $CaCO_3$ en 300 ml de agua bidestilada y 10 ml de HCl, luego del cese del desprendimiento de CO_2 se lleva a 1 litro con agua.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 200 μg/ml.

Cobre

Método de análisis

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

El Cu en la miel puede determinarse utilizando el mismo método descripto anteriormente para Na y K midiendo a una longitud de onda de 324,7 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 0,25 miligramos de Cu (5 gramos de miel)

La solución patrón de Cu se prepara disolviendo 1,000 gramos de Cu en 10 ml de HCl más 5 ml de agua bidestilada, se agrega HNO_3 hasta disolución total (gota a gota) Se hierve para eliminar los humos, se enfría y lleva a 1 litro con agua.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 5 μg/ml.

Hierro

Método de análisis

Si se desea conocer el contenido natural de hierro de la miel pueden aplicarse cualquiera de los métodos explicados en el capítulo anterior.

Dados los contenidos normales de Fe en la miel debe partirse de una alícuota de muestra digerida de 10,0 ml.

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

El Fe se determina aplicando el mismo método descripto anteriormente para Na y K midiendo a una longitud de onda de 259,9 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 0,5 miligramos de Fe (5 gramos de miel)

La solución patrón de Fe se prepara disolviendo 1,000 gramos de alambre de Fe en 20 ml de HCl 5 M y se lleva a 1 litro con agua bidestilada.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 10 μg/ml.

Magnesio

Los valores reportados son de 19 mg/kg en miel de flores y 35 mg/kg en mielada.

Método de análisis

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

El Mg en la miel puede determinarse utilizando el mismo método descripto anteriormente para Na y K midiendo a una longitud de onda de 383,2 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 0,25 miligramos de Mg (2 gramos de miel)

La solución patrón de Mg se prepara disolviendo 1,000 gramos de Mg en 50 ml de HCl 1 M y lleva a 1 litro con agua bidestilada.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 5 μg/ml.

Manganeso

Método de análisis

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

El Mn en la miel puede determinarse utilizando el mismo método descripto anteriormente para Na y K midiendo a una longitud de onda de 257,6 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 0,25 miligramos de Mn (10 gramos de miel)

La solución patrón de Mn se prepara disolviendo 1,000 gramos de Mn en 10 ml de HCl más 1 ml de HNO_3 y lleva a 1 litro con agua bidestilada.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 5 μg/ml.

Fósforo

Los valores reportados son de 35 mg/kg en miel de flores y 47 mg/kg en mielada.

Métodos de análisis

Espectrofotometría (A.O.A.C. 986.24, 1995)

El fósforo se determina sobre las cenizas complejándolo con molibdato de amonio.

Se pesa una masa de miel que contenga aproximadamente 4,0 miligramos de P (20 gramos) Se obtienen las cenizas a 600 ºC (1112 ºF) El residuo se solubiliza en 40 ml de HCl (1 + 3) y algunas gotas de HNO_3. Se transfiere cuantitativamente a un matraz de 50 ml y se lleva a volumen con agua bidestilada.

Se prepara una curva de calibración con 5 patrones preparados a partir de una solución estándar de P de 2 mgP/ml preparada a partir de 8,7874 gramos de KH_2PO_4 secado durante 2 horas a 105 ºC (221 ºF) y llevada a 1000 ml con agua bidestilada.

Para la preparación de los patrones se toman alícuotas de 0 - 5,0 - 8,0 - 10,0 y 15,0 ml de la solución de trabajo (0,1 mgP/ml) en matraces de 100 ml con agua bidestilada. Se toman 20,0 ml de la solución preparada como se explicó anteriormente.
Se agregan 20,0 ml del reactivo de molibdovanadato de amonio (20 gramos de molibdato de amonio en 200 ml de agua caliente – 1,0 gramos de metavanadato de amonio en 125 ml de agua caliente y 160 ml de HCl), se llevan a volumen y se dejan durante 10 minutos para que se desarrolle el color.

Se mide la absorbancia a 400 nm. La masa de P en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (A vs. mg P)
El contenido de P en la miel se calcula en miligramos / 1000 gramos de miel.

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

El P en la miel puede determinarse utilizando el mismo método descripto anteriormente para Na y K midiendo a una longitud de onda de 214,9 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 5 miligramos de P (10 gramos de miel)

La solución patrón de P se prepara disolviendo 4,263 gramos de $(NH_4)_2HPO_4$ en agua bidestilada y lleva a 1 litro.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 100 μg/ml.

Zinc

Método de análisis

Espectrofotometría de Emisión por Plasma Inductivamente Acoplado (A.O.A.C. 984.27, 1995)

El Zn en la miel puede determinarse utilizando el mismo método descripto anteriormente para Zn midiendo a una longitud de onda de 213,8 nm.

Se pesa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 0,25 miligramos de Zn (10 gramos de miel)

La solución patrón de Zn se prepara disolviendo 1,000 gramos de Zn en 10 ml de HCl y lleva a 1 litro con agua bidestilada.
La concentración del estándar mayor no debe superar los 3 μg/ml.

Selenio

Método de análisis

Fluorometría (A.O.A.C. 25.126, 1980)

La se digiere por vía húmeda El fósforo se determina sobre las cenizas complejándola con molibdato de amonio.

Se pesa una masa de miel que contenga menos de 0,8 μg de Se y se digiere durante toda la noche con 10 ml de HNO_3. Luego de calentar cuidadosamente se agregan $HClO_4$ 70% y H_2SO_4. Debe evitarse la formación de espuma porque se puede perder Se, si ocurriera debe descartarse el ensayo y pesar nueva muestra. El tratamiento se completa con el agregado de H_2O_2 hasta eliminación de humos blancos.
El Se se extrae en ampolla de decantación con 10,0 ml de solución de EDTA 0,02M, 25,0 ml de NH_4OH y 5,0 ml de solución de 2,3 – Diaminonaftaleno de 1mg/ml.
El compuesto se extrae con 6,0 ml de ciclohexano y se mide la fluorescencia a 525 nm.

Se prepara una curva de calibración con patrones preparados a partir de una solución estándar de Se de 100 μgSe/ml obtenida disolviendo 0,10000 gramos de Se negro, de pureza

mayor de 99,9%, en 5 ml de HNO_3 y llevada a 1 litro con agua previo agregado de 20 ml de H_2SO_4 5N.

La concentración de los patrones debe estar comprendida entre 0 y 0,8 μg de Se. Los patrones y el blanco de reactivo deben ser sometidos al mismo tratamiento que la muestra incluyendo el paso de digestión.

La masa de Se en la alícuota de muestra analizada se calcula por extrapolación de la curva de calibración (F vs. ng Se/6 ml ciclohexano)
El contenido de Se en la miel se calcula en nanogramos / 1000 gramos de miel.

- VALOR CALÓRICO

En los alimentos el cálculo del valor energético se realiza tomando como referencia los siguientes aportes: (CAA, 1969) en kilocalorías por gramo (Calorías / gramo) de alimento:

- Lípidos, 4 Calorías / gramo.
- Etanol, 7 Calorías / gramo.
- Hidratos de Carbono asimilables, 4 Calorías / gramo.
- Proteínas, 4 Calorías / gramo.
- Ácidos Orgánicos, 3 Calorías / gramo.
- Polialcoholes, 2,4 Calorías / gramo.

En el caso particular de la miel solamente deberán tenerse en cuenta los lípidos, los hidratos de carbono asimilables y las proteínas para realizar los cálculos del valor calórico.

BIBLIOGRAFÍA

ABA. (1968) *Revista de la Asociación Bioquímica Argentina, pp. .*

Abreu Payrol, J., Martínez, M. M. Castillo García, O. and Redondo López, D. Ácidos Carboxílicos del Fruto de Bromelia pinguin L. (Piña de Ratón) por HPLC (2001) *Revista Cubana de Farmacia, 35 (2), pp. 122-125.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13th Ed (1980) Official Final Action. Selenium. Fluorometric Method. *Washington, DC. Sec. 25.126-25130, pp. 409-410.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 940.33. Riboflavin (Vitamin B_2) in Vitamin Preparations – Microbiological Method. Washington, DC. Sec. 45.2.06. Chap. 45, pp. 48-49.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 17th Ed (2000) Official Method 942.23. Thiamine (Vitamin B_1) in Human and Pet Foods – Fluorometric Method. Washington, DC. Sec. 45.1.05. Chap. 45, pp. 6-7.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 944.13. Niacin and Niacinamide (Nicotinic Acid and Nicotinamide) in Vitamin Preparations – Microbiological Method. Washington, DC. Sec. 45.2.04. Chap. 45, pp. 46-47.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 945.74. Pantothenic Acid in Vitamin Preparations – Microbiological Method. Washington, DC. Sec. 45.2.05. Chap. 45, pp. 47-48.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 952.20. Cobalamin (Vitamin B_{12} Activity) in Vitamin Preparations – Microbiological Method. Washington, DC. Sec. 45.2.02. Chap. 45, pp. 44-45.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 954.11. Separation of Sugars in Honey. Charcoal Column Chromatographic Method I. Washington, DC. Sec. 44.4.11. Chap. 44, pp. 22-24.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 17th Ed (2000) Official Method 961.14. Niacin and Nicotinamide in Drugs, Foods and, Feeds – Colorimetric Method. Washington, DC. Sec. 45.1.10. Chap. 45, pp. 12-13.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 961.15. Vitamin B_6 (Pyridoxine, Pyridoxal, Pyridoxamine) in Food Extracts – Microbiological Method. Washington, DC. Sec. 45.2.08. Chap. 45, pp. 51-53.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 962.18. Nitrogen in Honey. Washington, DC. Sec. 44.4.06. Chap. 44, pp. 21.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 17th Ed (2000) Official Method 962.21. Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices – 2,6 DCF Titrimetric Method. Washington, DC. Sec. 45.1.14. Chap. 45, pp.16-17.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 17th Ed (2000) Official Method 962.22. Vitamin C (Total) in Vitamin Preparations – Microfluorometric Method. Washington, DC. Sec. 45.1.15. Chap. 45, pp.17-18.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 17th Ed (2000) Official Method 970.65. Riboflavin (Vitamin B_2) in Foods and Vitamin Preparations – Fluorometric Method. Washington, DC. Sec. 45.1.08. Chap. 45, pp. 9-10.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 971.20. Copper and Nickel in Tea. Atomic Absorption Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Vol. I, Chap.9, pp. 242.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 977.20. Separation of Sugars in Honey. Liquid Chromatographic Method. *Washington, DC. Sec. 44.4.13. Chap. 44, pp. 25.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 984.27. Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium and Zinc in Infant Formula. Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopic Method. *Washington, DC. Sec. 50.1.15. Chap. 50, pp. 14-15.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 986.15. Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium and Zinc in Food. Multielement Method. *Washington, DC. Sec. 9.1.01. Chap. 9, pp. 1- 3.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 986.24. Phosphorus in Milk - Based Infant Formula. Spectrophotometric Method. *Washington, DC. Sec. 50.1.12. Chap. 50, pp. 12.*

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 16th Ed (1995) Official Method 994.12. Amino Acids in Feeds. Alternative I. Performic Acid Oxidation with Acid Hydrolysis – Sodium Metabisulfite Method. *Washington, DC. Sec. 44.1.11. Chap. 4, pp. 4-4H.*

Bogdanov, S., Martin, P. and Lüllmann, C. Harmonized Methods of the European Honey Commission (1997) Apidologie Extra issue, pp. 1-59.

CCA. Código Alimentario Argentino Actualizado. Ley 18.284 del año 1969. Decreto Reglamentario 2126/71 del 30 de junio de 1971. *Cap. XVII, Artículo 1345, pp. 459.*

Coppola, E.D. and Starr, M.S. Liquid-Chromatographic Determination of Major Organic Acids in Apple Juice and Cranberry Juice Cocktail: Collaborative Study (1986) *J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69 (4), pp. 594-597.*

Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G. P., Castellari, M. and Galassi, S. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluorenylmethyl-Chloroformate (January 2002) *Journal of Chromatographic Science, ISSN 0021-9665 Volume 40, Number 1, pp. 14-18*

Hsiu-Jung, L., Mei-Ling, W., Chung-Wen, C., Bao-Shyung H., Min-Hsiung, L. and Youk-Meng C. A Gas Chromatographic Method for Determination of Nicotinamide, Paraben Esters and Caffeine in Commercial Health Drinks, Tonic Drinks and Cold Formulas (2002) *Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 8, No. 3, pp. 180-186*.

IEF. Isoelectric Focusing and Isotachophoresis (June 1973) *Annals of the New York Academy of Sciences. Volume 209, pp. 1-529.*

Juraja, S. M., Craige Trenerry, V., Millar, R. G., Scheeling, P. and Buick, D. R. Asia Pacific Food Analysis Network Training Exercise: The Determination of Niacin in Cereals by Alkaline Extraction and High-Performance Liquid Chromatography (June 2002) *Australian Government Analytical Laboratories Public Interest Program, Number 2002-2, pp. 1-26*.

Lam, F-L., Holcomb, I. J. and Fusari, S.A. Liquid Chromatographic Assay of Ascorbic Acid, Niacinamide, Pyridoxine, Thiamine, and Riboflavin in Multivitamin-Mineral Preparations (1984) *Journal of Official Association of Agricultural Chemists. Vol. 67, Nº 5, pp. 1007-1011*.

Moore, S. and Stein, W. H. Chromatographic Determination of Aminoacids by the Use of Automatic Recording Equipment (1963) *Methods of Enzymol. Volume VI. Academic Press (EUA) (6), pp. 819-831.*

Nogueira Carvalho, P. R. Análise de Vitaminas em Alimentos (1993) *Instituto de Tecnología de Alimentos. Campinas.*

Pereyra González, A. S. Estudios sobre Mieles de Abeja, *Apis mellífera*, de Producción Nacional: Evaluaciones de Contenidos de Nitrógeno, Lípidos Totales y sus Composiciones Acídicas y Valores de la Relación Glucosa/Fructosa (1993) *Tesis Doctoral, pp. 43-86.*

Randerath, K. Enciclopedia de la Química Industrial. Cromatografía de Capa Fina (1974) *Ediciones Urmo. Bilbao, Tomo 8, pp. 263-266.*

Reglamento 796/2002/CE de la Comisión de 6 de mayo de 2002 que modifica el Reglamento 2568/1991/CEE Relativo a las Características de los Aceites de Oliva y sobre sus Métodos de Análisis.

Romero Rodríguez, M.A., González Rodríguez, M.V., Lage Yuste, M.A., López Hernández, J., Paseiro Losada, P. and Simal Lozano, J. Identification and Quantitative Analysis of the Major Organic Acids in Fruits by HPLC (1991) *An. Bromatol., 42 (2), pp. 299-306.*

SRC. Scientific Research Consortium, Inc. Aminoacids. Consulta del 22 de mayo, 2004. *http://www.aminoacids.com/amino1.htm*

Shaw, P. E. and Wilson, C. W. III. Organic Acids in Orange, Grapefruit and Cherry Juices Quantified by High-Performance Liquid Chromatography using Neutral Resin or Propylamine Columns (1983) *J. Sci. Food Agric., 34 (11), pp. 1285-1288.*

Sims, A. and Shoemaker, D. Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Thiamine and Riboflavin in Selected Food (1993) *Journal of Official Association of Agricultural Chemists. Vol. 76, Nº 5, pp. 1156-1160.*