

Calidad y tecnología de miel y de la producción apícola.

Trabajo Práctico N° 3 **Caracterizar las mieles por sus propiedades físico-químicas.**

Objetivos:

- Determinar las características fisicoquímicas de las distintas mieles.
- Identificar los parámetros de calidad

Introducción:

La miel es el producto primario más importante de la actividad apícola, se puede mantener en su estado natural por un largo período de tiempo si se almacena a temperaturas debajo de 10°C. Su deterioro se produce cuando sufre un calentamiento excesivo, no está madura o ha absorbido humedad, o se almacena durante períodos prolongados bajo condiciones inadecuadas.

A temperaturas relativamente elevadas, cambia rápidamente el sabor que puede deberse a la descomposición de algunos de los componentes de las proteínas por sobrecalentamiento. El color es también modificado por las temperaturas elevadas (color de más claro a más oscuro). El aumento de temperatura, produce también un aumento de H.M.F. (hidroxi metil furfural) y disminuye la actividad de las enzimas presentes.

Para impedir la fermentación, la miel debe ser calentada a 71°C y enfriada rápidamente en recipientes herméticamente cerrados, cuando la miel está contaminada con levaduras, la fermentación se produce aún a temperaturas relativamente bajas. Por otra parte, puede fermentarse como resultado de cambios físicos que se producen durante la granulación una vez envasada.

Extracción o toma de muestras para el análisis de miel.

Las muestras extraídas deben ser representativas de la partida total, para que los resultados sean confiables.

Los materiales utilizados para el muestreo deben ser esterilizados. Se deben usar cucharas de acero inoxidable, pinzas, espátulas y tijeras que puedan ser acondicionadas en el mismo establecimiento donde se efectúa el muestreo.

Para recolectar la muestra, se recomienda utilizar envases limpios, secos, con cierre hermético, de boca ancha, esterilizados y de tamaño adecuado, siendo preferibles los envases plásticos.

En caso de hacer un muestreo de tambores, éste debería llevarse a cabo tambor por tambor. La miel no debe ser calentada para homogeneizarla.

Definiciones:

- **Extracción o toma de muestras:** Es el acto de separar de una partida determinada una muestra representativa, a efectos de determinar mediante análisis organoléptico y/o de laboratorio la aptitud o no de la mercadería puesta a consideración.
- **Análisis sanitario:** Es la determinación bromatológica para establecer la calidad de aptitud o no de la mercadería, tendiente a preservar la salud pública o individual del consumidor, realizado de acuerdo a los métodos y las técnicas analíticas legales nacionales o supletorias internacionales reconocidas.
- **Lote:** Cantidad determinada de alimento envasado de una misma procedencia y clasificación, de condiciones presumiblemente uniformes, en envases del mismo tipo, medida y peso.
- **Partida:** Cantidad determinada de alimento envasado, comprendido en un solo envío.

En el momento de la extracción de la muestra, para que tenga marco legal, se debe proceder de la siguiente forma:

1. Se tomarán 3 muestras, las que serán representativas del lote o partida del producto a analizar. Esta puede estar constituida por materia prima, productos en fase de elaboración o terminados.
2. Toda muestra destinada al Laboratorio de Análisis deberá ser empaquetada, según corresponda rotulada, precintada, lacrada y sellada, en forma tal que no haya posibilidad de hacer sustitución de ninguna clase.
3. Las 3 muestras deberán ser iguales, estableciendo que pertenezca a igual partida, año de elaboración, establecimiento elaborador.
4. De estas 3 muestras, una será considerada original y será empleada para el análisis en primera instancia.
5. La segunda muestra, considerada duplicado, será reservada por la Autoridad sanitaria para eventual pericia de control.
6. La tercera, considerada triplicado, quedará en poder del responsable del establecimiento inspeccionado quien podrá disponer de ella o presentarla para su análisis, en caso de efectuarse la pericia de control de contra verificación.
7. Se realizará la toma de una cuarta muestra en caso de que sea necesario análisis microbiológico.
8. Las muestras deben ser acondicionadas e identificadas correctamente, debiendo consignarse en el labrado de las actas correspondientes:
 - ✓ Nombre del producto
 - ✓ Marca del producto
 - ✓ Datos de la firma elaboradora
 - ✓ Fecha de extracción de la muestra y hora
 - ✓ Datos del rótulo (RRPA, RPE, N° de lote)
 - ✓ Hacer constar la cantidad existente en cada muestra
 - ✓ Fecha de vencimiento
 - ✓ Temperatura en el momento de la recolección
 - ✓ Forma de traslado de la misma

- ✓ Firma de inspectores y dueño o responsable

Toma de muestras de tambores directamente en el estado que sale de la centrífuga:

La miel contenida en los recipientes puede llegar a no ser homogénea. Si no se mueve el tambor no se efectúa en su interior una mezcla completa de la miel.

Si moviéndola y mezclándola se ha procurado que la miel de los recipientes sea homogénea, no obstante pueden producirse modificaciones durante el almacenaje, con la consecuente pérdida de homogeneidad.

La miel con gran contenido de agua se separa en dos capas: los cristales se depositan en la base del recipiente, mientras que encima hay dos capas más líquidas.

Si se almacena la miel donde existe humedad en recipientes que no son herméticos, la miel absorbe agua, y se incrementa el contenido de agua en la capa superior. Por el contrario si hay aire seco, la superficie pierde mayor cantidad de agua que las capas más profundas. Si existen partículas de cera o impurezas en la miel, las mismas se encuentran en la superficie del fondo. Así, una muestra tomada de la superficie puede contener más impurezas que el resto de la misma miel.

Químicamente las distintas capas pueden contener mayor o menor cantidad de agua y en algunos casos, también puede haber fermentado la parte superior, sin que la miel de las capas inferiores haya sufrido alteraciones.

Por lo tanto, una toma de muestra verdaderamente representativa debe contener miel de todas las capas.

En caso de que la miel sea líquida, es conveniente mezclarla antes de extraer muestras.

Si esta cristalizada, la extracción de la muestra se realiza con un taladro.

Si se efectúa conjuntamente tomas de muestras de varios recipientes, debe procurarse sacar aproximadamente la misma cantidad de miel de los recipientes de igual tamaño a fin de que, más tarde, la muestra coincida en lo posible con la mezcla posterior.

Elementos necesarios:

Taladros: son varillas metálicas de forma triangular. (Figura 1)

Frascos saca muestras: Consisten en un frasco de vidrio o recipiente de metal de 35 a 40 ml de capacidad, fijado por medio de una abrazadera a una varilla de longitud suficiente para llegar al fondo del recipiente que contiene la miel. (Figura 2)

El frasco tiene un tapón móvil unido a la cuerda. El aparato se introduce cerrado a varias profundidades dentro del recipiente, donde se quita el tapón para llenarlo. Pipetas

sacamuestras: consisten en un tubo de vidrio o metal de 5cm de diámetro, y en la punta superior presentan 2 anillos que facilitan su manejo. (Figura 3).

Obtención de las muestras:

- Miel sólida: se realiza esta toma de muestra con ayuda del taladro.
- Miel líquida que puede ser homogeneizada: se mezcla bien con una espátula antes de tomar la muestra, hasta homogeneizarla, y luego se introduce la pipeta sacamuestras

hasta extraer unos 500g de sustancia, y se guarda en envases apropiados para el análisis.

- Miel líquida que no puede ser homogeneizada: con el frasco sacamuestras, se extraen diez muestras de 50 g cada una de diferentes niveles: fondo, medio y parte superior, y a distintas posiciones.



Figura 1, 2 y 3. Elementos necesarios para tomar muestras.

Envase y Rotulo:

Envase: la miel deberá ser envasada en recipientes de 500 g de capacidad o mayores, hechos de materiales inocuos para la salud humana. Las características organolépticas y la composición del producto no deberán ser alteradas por el material del recipiente.

Rotulo: los rótulos serán de papel o de cualquier otro material que pueda ser adherido a los envases, o bien de impresión permanente sobre los mismos.

Las inscripciones deberán ser fácilmente legibles a simple vista, redactadas en español, y en otro idioma si las necesidades de algún país así lo dispusieran, y hechas en forma tal que no se borren bajo condiciones de uso normal.

No podrá tener ninguna leyenda de significado ambiguo, ilustraciones, viñetas o adornos que induzcan al engaño, ni descripción de características del producto que se puedan comprobar.

El rotulo deberá llevar como mínimo lo siguiente:

- a) La palabra "miel"
- b) El nombre o marca del fabricante, envasador, distribuidor, importador, exportador o vendedor y su dirección.
- c) El contenido neto en unidades del Sistema Internacional.
- d) El número de identificación del lote de producción, el cual podrá ponerse en clave.
- e) La fecha de producción.

f) El país de origen.

Almacenamiento y transporte:

- a. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible; por lo tanto, se debe remitir con prontitud al laboratorio de análisis después de ser extraídas.
- b. Cuando por algún motivo sea necesario almacenar las muestras por cierto tiempo, debe hacerse de manera que la temperatura del material no sufra grandes variaciones y que las condiciones de almacenamiento no alteren la calidad de la miel.

Material disponible:

- Mieles en diferentes condiciones de almacenamiento.
- Miel fresca

Actividades:

Contenido de humedad

Las mieles producidas en climas relativamente secos encierran de **15,4 a 17%** de humedad. Las mieles que contienen menos de 17,4% de agua son consideradas en general como exentas de la posibilidad de fermentación siempre que no haya granulado. Aun la miel con mucho cuerpo, cuando granula puede fermentar y avinagrarse.

Cuando la miel granula, los cristales de glucosa (dextrosa) se separan dejando un exceso de humedad libre que, unida a la fructosa que no ha granulado todavía hace que el tenor de agua sea lo suficientemente elevada para que pueda tener un lugar la fermentación si se proporciona una temperatura propicia.

La miel tiene una actividad de agua muy baja (**$A_w=0.60$**), por lo que el crecimiento microbiano es casi nulo. A valores de A_w más elevados de **0.60-0.75** pueden crecer mohos e incluso levaduras

Metodología:

- Por Refractometría

Fundamento:

El contenido de agua de la miel se encuentra directamente relacionado con el índice de refracción (y con otras propiedades como el peso específico). Medir el contenido de humedad de esta manera es más sencillo que emplear el método directo pesando la muestra antes y después de un proceso de secado.

Instrumental:

- Recipiente con cierre hermético.
- Refractómetro de Abbe
- Varilla de vidrio
- Baño de agua a 60°C

Preparación de la muestra:

Las mieles total o parcialmente cristalizadas deben calentarse en un recipiente hermético a no más de 60°C, hasta la completa disolución de los cristales.

El espacio entre la muestra de miel y la tapa del recipiente debe ser mínimo, de manera tal que se evapore la menor cantidad de agua posible de la miel.

Luego de la disolución de los cristales, debe invertirse suavemente el recipiente para enjuagar las superficies de las paredes y recoger el agua de condensación.

Luego se deja enfriar la muestra hasta temperatura ambiente con el recipiente tapado. Debe mezclarse el contenido antes de efectuar la medición.

Procedimiento:

Se coloca con una varilla de vidrio limpia y seca, una o dos gotas de miel entre los prismas limpios y secos del refractómetro. Luego se realiza la lectura a 20°C, siguiendo las instrucciones del aparato.

En caso de realizarse la medición a una temperatura distinta deberán aplicarse los siguientes factores de corrección:

- a. Temperatura mayor de 20°C: Se suman 0,00023 por cada grado centígrado al valor del índice de refracción.
- b. Temperatura menor de 20°C: Se restan 0,00023 por cada grado centígrado al valor del índice de refracción.

Color Pfund y Lovibond

El color de las mieles se debe a las materias pigmentarias como el caroteno y la xantofila. Sin duda en el origen también hay polifenoles del tipo de los flavonoles. El fenómeno de la melenización de los azúcares durante el envejecimiento o el calentamiento provoca una intensificación del color de la miel.

La miel puede presentarse dentro de una gama de colores que va desde el blanco agua hasta el ámbar oscuro, dependiendo principalmente de su origen botánico, las características del terreno y condiciones climáticas entre otros factores. Las mieles oscuras poseen 4 veces más minerales (fosfato de calcio, potasio, magnesio, etc.) que las claras, lo cual les otorgaría mayores propiedades nutricionales. En general las mieles claras poseen aroma y gusto más suave y son preferidas en repostería, para la elaboración de bebidas y en cosmetología.

El color se evalúa en base a la lectura en una escala internacional (escala Pfund) graduada en mm.

Color Pfund	Escala Internacional (mm)
Blanco agua	8
Extra blanco	9-17
Blanco	18-34
Ámbar extra claro	35-48
Ámbar claro	49-83
Ámbar	84-114
Ámbar oscuro	> 114

Para determinarla se utiliza la miel líquida, sin cristales. La cristalización trae como consecuencia un aclarado del matíz.

Instrumental:

- Graduador de color Pfund
- Graduador de color Lovibond

Preparación de la muestra:

Las mieles líquidas y transparentes se pueden analizar directamente.

Las mieles que se encuentran total o parcialmente cristalizadas deben colocarse en un baño de agua a 60°C o en una estufa a esa temperatura hasta la total disolución de los cristales.

Nota: No deben sobrepasarse los 60°C ya que a temperaturas más elevadas pueden descomponerse los azúcares presentes en la miel.

Procedimiento:

-Para la medición con colorímetro Pfund:

Se coloca una cantidad adecuada de miel hasta el borde de la cubeta del graduador.

Se toman 5 lecturas en el lugar donde coincide el color de la muestra con el color del graduador según las instrucciones del aparato.

Se informa como resultado el promedio de las lecturas realizadas.

-Para la medición con colorímetro Lovibond:

Se coloca una cantidad de miel en la celda de 33.00 mm. Insertar el disco¹ de colores estándar en el colorímetro mirando hacia el observador. Ajustar el contenedor de celdas para la correcta colocación de las mismas. Colocar la celda con la muestra de miel del lado derecho y el blanco del lado izquierdo. Usando una fuente de luz natural o artificial blanca, rotar el disco hasta que se parezca lo más posible con la muestra.

¹El disco contiene la siguiente escala:

Water White	Extra Light Amber
Extra White	Light Amber
White	Amber

Contenido de minerales. Conductividad

El contenido de cenizas es un criterio de calidad para evaluar el origen de la miel de abejas. Las mieles oscuras, especialmente las mieles de mielada, son las más ricas en minerales. Actualmente, esta determinación suele reemplazarse por la medición de conductividad eléctrica. Esta medición es directamente proporcional al contenido de cenizas y la acidez de la miel.

Los minerales están presentes en cantidades variables, oscilando entre **0,22 y 1%**. Los análisis detectan hasta 30 oligoelementos, siendo el Potasio el más importante 47 mg, le siguen el sodio, magnesio, calcio, hierro, zinc, entre otros.

Instrumental:

- ♦ Baño térmico mantenido a 20°C
- ♦ Balanza
- ♦ Conductímetro
- ♦ Matraz aforado de 25 ml
- ♦ Vaso de precipitado de 50 ml

Preparación de la muestra:

Las mieles líquidas transparentes se pueden analizar directamente.

Las mieles que se encuentran total o parcialmente cristalizadas deben colocarse en baño de agua a 60°C o en estufa a esa temperatura hasta la total disolución de los cristales. Se agita periódicamente.

Nota: No se debe sobrepasar los 60°C ya que a temperaturas más elevadas pueden descomponerse los azúcares presentes en la miel.

Si se observan sustancias extrañas (cera, panal, partes de abejas, etc.), se calienta la muestra nuevamente en un baño de agua a 40°C, se filtra a través de un filtro con circulación de agua caliente.

Procedimiento:

Pesar 20g de miel (masa seca), y disolverla en unos ml de agua destilada. Completar a volumen en un matraz aforado de 100 ml.

Trasvasar la solución a un vaso de precipitado de 50 ml y colocarlo en un baño termostático a 20°C.

Introducir la celda de medida en la solución de miel hasta que la temperatura sea de $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, y realizar la lectura.

La conductividad eléctrica se expresa en siemens por cm^{-1} .

Contenido de minerales. Cenizas.

Instrumental:

- Balanza analítica
- Recipiente hermético
- Baño de agua a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$
- Filtro con circulación de agua caliente con material filtrante adecuado
- Baño de arena o manto calefactor

- Mufla mantenida a $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$
- Lámpara infrarrojo
- Desecador
- Cápsula de porcelana

Preparación de la muestra:

Las mieles líquidas transparentes se pueden analizar directamente.

Las mieles que se encuentran total o parcialmente cristalizadas deben colocarse en baño de agua a 60°C o en estufa a esa temperatura hasta la total disolución de los cristales. Se agita periódicamente.

Nota: No se debe sobrepasar los 60°C ya que a temperaturas más elevadas pueden descomponerse los azúcares presentes en la miel.

Si se observan sustancias extrañas (cera, panal, partes de abejas, etc.)

Se calienta la muestra nuevamente en un baño de agua a 40°C , se filtra a través de un filtro con circulación de agua caliente.

Procedimiento:

Se pesan de 5 a 10 g de muestra en una cápsula calcinada y tarada (asegurando 0,1 mg). Para favorecer la carbonización pueden adicionarse algunas gotas de aceite de oliva.

Se calienta suavemente en un baño de arena o manto calefactor hasta que la muestra quede ennegrecida y seca, y no haya peligro de pérdida por formación de espuma o rebosamiento.

Se calcina en una mufla mantenida a $550^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}\text{C}$, hasta obtener cenizas blancas. Se deja enfriar en un desecador y se pesa. La calcinación se repite hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5g.

Cálculos:

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

Donde:

C: Cenizas provenientes de las sustancias minerales, expresado en gramos por 100 gramos.

m_i : Masa del residuo, expresada en gramos.

m : Masa de la muestra expresada en gramos.

Acidez

La acidez es un importante criterio de calidad.

Ácidos orgánicos como málico, oxálico y glucónico, entre otros representan el 0,5% aproximadamente y le confieren a este producto apícola un **pH ácido** que oscila entre **3,5 y 5**. Estos componentes brindan una acción digestiva y estimulante suave del apetito.

La fermentación de la miel causa un incremento de acidez. Valores superiores a lo normal indican que se trata de una miel que ha sufrido un proceso de fermentación.

La determinación de la acidez en una muestra de miel se basa en la neutralización de los componentes ácidos presentes en la misma.

Reactivos:

- Solución valorada de hidróxido de sodio (0,1N)
- Solución de fenoftaleína, 1g en 100 ml de etanol
- Agua libre de CO₂, (para lo cual debe estar recién hervida y enfriada).

Instrumental:

- ◆ Balanza analítica
- ◆ Recipiente con cierre hermético
- ◆ Baño de agua a 40°C
- ◆ Vaso de precipitado de 100 ml
- ◆ Probeta de 100 ml
- ◆ Varilla de vidrio
- ◆ Erlenmeyer de 250 ml
- ◆ Bureta graduada de 10 ml

Procedimiento:

Se pesan 10 g de miel en un vaso de precipitado limpio, seco y tarado. Se disuelven con 75 ml de agua en porciones que se van transfiriendo a un erlenmeyer de 250 ml.

Se agregan 3 o 4 gotas de fenoftaleína, y se valora gota a gota con NaOH 0,1N agitando continuamente el erlenmeyer hasta que el color rosado persista durante 10 segundos.

Se anotan los ml de la solución de NaOH empleados.

Nota: en caso de mieles oscuras emplear menor cantidad de muestra o un aparato para determinar ph, valorando la muestra hasta ph 8,5.

Cálculos:

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

Donde:

A: Acidez expresada en miliequivalentes de ácido por Kg. de miel.

V: Volumen de la solución de NaOH empleado en la valoración expresado en ml.

N: Normalidad de la solución de NaOH

m: Masa de la muestra expresada en gramos.

Adulteración

La adulteración de la miel con glucosa comercial se realiza con fines económicos (menores costos) y comerciales (para lograr mayor aceptabilidad del producto, ya que la mayoría de los consumidores prefiere la miel líquida). El importante contenido de dextrinas en la glucosa comercial no permite la formación de núcleos de cristalización.

Por otra parte, la miel cuando se examina en el polarímetro imparte al plano de la luz polarizada una rotación levógira (izquierda). La adición de una apreciable cantidad de azúcar de caña o glucosa, tiende a cambiar la dirección de rotación porque estos azúcares son dextrógiros.

La miel y el azúcar invertido presentan una considerable similitud en su composición, pero existen algunas diferencias que permiten el descubrimiento de adulteraciones. Componentes secundarios de la miel, tales como sustancias minerales (cenizas) y materiales nitrogenados, pueden ser utilizados para detectar el agregado de azúcar invertido.

Metodología: Método de Bianchi (Determinación de la glucosa comercial)

Principio del método:

A diferencia de las dextrinas de almidón, los componentes de la miel semejantes a las dextrinas (azúcares a superiores) no presentan reacción si se acidula la solución de miel con ácido clorhídrico y se la mezcla luego, con alcohol.

Reactivos:

- Alcohol etílico absoluto.
- Acido clorhídrico
- Acido tricloroacético
- Agua destilada

Instrumental:

- ◆ Tubos de ensayo
- ◆ Errermeyer
- ◆ Probeta

Procedimiento:

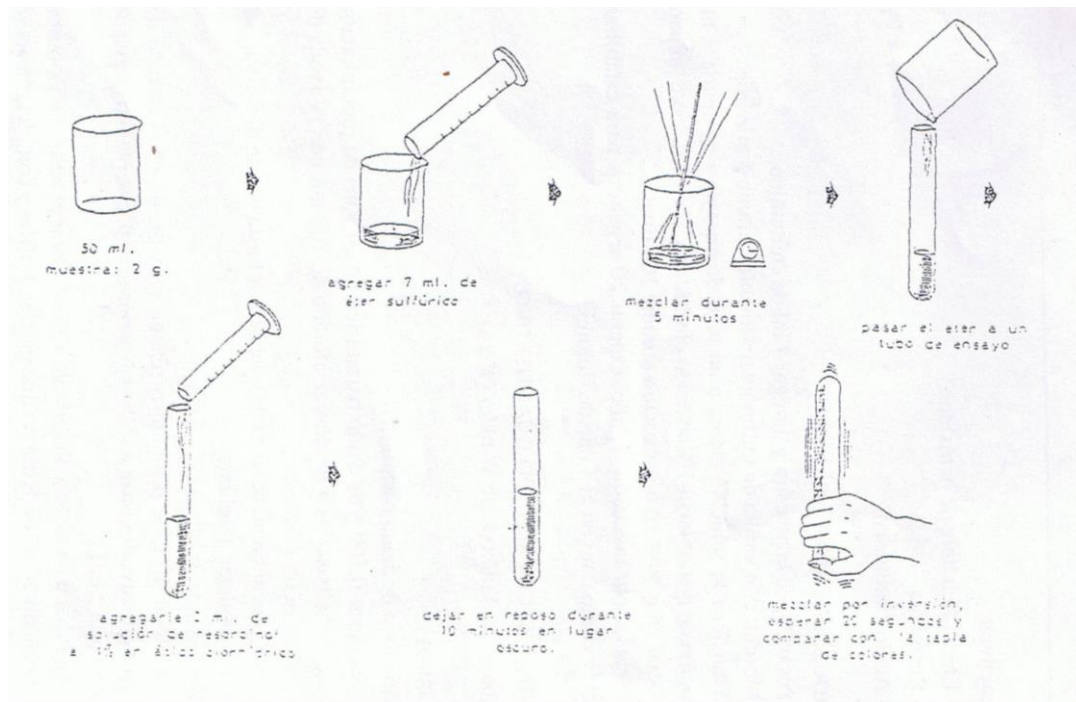
Preparación de la muestra para el ensayo.

En un vaso de precipitación de 50ml pesar 1g de la muestra y disolverla en 5ml de agua destilada.

Determinación:

- a. En un tubo de ensayo colocar 1ml de la solución preparada, agregarle 2 gotas de ácido clorhídrico y finalmente 5ml de alcohol etílico absoluto.
- b. Tapar, agitar y observar el medio alcohólico.

Determinación de la glucosa comercial



Expresión de los resultados:

Reacciones posibles

- Negativa** mezcla límpida u opalescencia muy débil
- Positiva** turbidez franca, líquido opaco.
- Positivo fuerte** enturbiamiento lechoso, precipitación.
- Dudosa** opalescencia débil.

En caso de duda, tratar un volumen de la solución problema (5ml), con igual volumen de ácido tricloroacético al 10%, filtrar y repetir la experiencia anterior en un tubo de ensayo.

En caso negativo, la mezcla se mantendrá límpida; de lo contrario, es presumible la presencia de dextrinas de almidón.

Contenido de hidroximetilfurfural (HMF)

El hidroximetilfurfural (HMF) es un compuesto que se forma por deshidratación de la fructosa (levulosa), cuando este azúcar está en medio ácido (la miel es siempre ácida).

Este factor de calidad es un indicador de la frescura de la miel. Su formación ocurre durante el almacenamiento de la miel y aumenta según las condiciones de pH y temperatura de almacenamiento. Esta formación se acelera cuando se aumenta la temperatura. Cuanto más fuerte sea el calentamiento, o cuanto más tiempo actúe provocará la formación de mayor cantidad de HMF. Un buen pasteurizado no produce, en condiciones normales de trabajo, un aumento mayor de 3,4 mg de HMF/ Kg

La miel recién almacenada en los panales por las abejas y que no ha padecido calentamiento excesivo ni el paso del tiempo, suele tener bajas o nulas cantidades de HMF.

El proceso de deshidratación de fructosa se dará a un ritmo tal que ocasionará una ganancia en HMF de alrededor de 1mg/kg/mes en las zonas más frías y 1,5 a 2 mg/ Kg en las más cálidas.

Conocer los mg/Kg de HMF de una miel nos permite, además, estimar cuan vieja es la miel.

Si la miel es almacenada por largos periodos de tiempo a temperaturas superiores a la media descrita anteriormente, o es calentada, se favorece la caramelización de los azúcares.

Metodología: White

Fundamento

El HMF es un compuesto que se forma como consecuencia de la deshidratación de los azúcares presentes naturalmente en la miel, especialmente de fructosa.

La miel recién extraída posee muy baja concentración de HMF (**5 a 7 mg/Kg**), la cual aumenta con el calor y el tiempo de conservación. Naturalmente la concentración de HMF aumenta muy poco al año a temperaturas bajas.

Aparte de la temperatura, también el valor del pH de una miel posee importancia para la velocidad de formación del HMF.

Si bien el Código Alimentario Argentino establece como límite 40 mg/kg, actualmente no se aceptan mieles con un contenido superior de 20 mg/kg.

El método de White es el más utilizado para la verificación del HMF en la miel se basa determinando la absorbancia a 280nm de una solución de miel, con respecto a una solución de referencia de la misma muestra, en la que se destruyo con bisulfito de sodio, el cromóforo del HMF.

La diferencia de la absorbancia entre la muestra clarificada (sin bisulfito de sodio) y la referencia (con bisulfito de sodio), se asemeja a la banda de absorción de HMF entre 250 nm y 360 nm, con un máximo de 284 nm.

Materiales y reactivos

- Espectrofotómetro VIS-UV que permita leer a 284 y 360 nm.
- Cubeta de 10 mm
- Papel Filtro
- Matraz aforado de 50 y 100 ml
- Pipetas aforadas de 5 ml
- Balanza analítica

Reactivos:

- Agua exenta de O₂
- Reactivo clarificante I (15g de hexaferrocianato de K trihidratado en 100 ml de H₂O)
- Reactivo clarificante II (30g de acetato de Zn dihidratado en 100 ml de H₂O)
- Solución de bisulfito de sodio (0,1827g en 100 ml de H₂O)

- Etanol: 95ml / 100ml

Preparación de la muestra:

La miel sin impurezas se homogeneiza suficientemente mediante agitación evitando la entrada de aire.

La miel que contiene impurezas se agita a temperatura ambiente hasta que esta quede homogénea y se la pasa por un tamiz.

Procedimiento:

Se pesan 5g de miel, asegurando el 1mg, en un vaso de precipitado de 50ml limpio y seco y se disuelven en agua en porciones hasta completar 25ml. Luego se trasvasan cuantitativamente a un matraz aforado de 50ml. A continuación, se agregan 0,5ml del Reactivo I, se agita bien y se agrega 0,5ml del reactivo II. Se agita nuevamente y se agrega agua hasta enrase. Posteriormente se filtra a través de un papel de filtro seco y se desechan los primeros 10ml filtrados.

Determinación:

Se preparan 2 tubos de ensayo: M (muestra) y R (referencia). Se pipetea 5ml de la solución de miel clarificada en cada uno de los tubos.

Se pipetea 5ml de agua en el tubo M y 5ml del bisulfito de sodio en el tubo R. Se agita cada tubo. Se miden las absorbancias de los tubos M y R con respecto al blanco de agua exenta de O₂ en las cubetas correspondientes a 284 y 336 nm.

Nota: si la absorbancia obtenida con la muestra fuese mayor que 0,6 se diluye la solución de la muestra con agua sin O₂, tanto como sea necesario y la solución de metabisulfito de sodio diluida 1:1 con agua. Se corrigen las absorbancias por el factor de dilución utilizado. De esta manera se obtiene mayor exactitud.

Cálculos y expresión de los resultados:

Cálculo de la concentración de HMF en miel expresada en mg/Kg de miel:

Cálculo:

$$\text{HMF} = (\Delta_{284} - \Delta_{336} \text{ Muestra} - \text{Referencia}) \times 14.97 \times 5/P \times 10$$

Siendo P el peso en gramos de la muestra de miel.

λ	Abs. Muestra (M)	Abs. Referencia (R)	
284nm			
336nm			($\Delta_{284-336}$ M-R)
$\Delta_{284-336}$			

Enzimas

Las enzimas producidas por las secreciones salivales de las obreras, tienen un importante rol en la formación de la miel. Su importancia comercial no está relacionada con la nutrición humana, sino con su fragilidad y singularidad. Su reducción o ausencia en mieles adulteradas, sobrecalentadas o excesivamente almacenadas sirve como indicador de frescura. Las principales enzimas presentes en la miel son la invertasa, diastasa y glucoxidasa.

La diastasa es una enzima de origen vegetal, su función es la de catalizar la hidrólisis, primero del almidón en dextrinas e inmediatamente después, en glucosa. Esta enzima es sensible a la temperatura y al paso del tiempo, por lo que, su determinación es un parámetro de control para analizar si la miel se encuentra en buen estado o por el contrario ha perdido parte de sus propiedades.

La actividad diastásica se calcula como número diastásico (DN), que corresponde al número de la escala Gothe. Este número expresa la cantidad de diastasa como volumen de almidón al 1% hidrolizado por la enzima en 1 gramo de miel en 1 hora a una temperatura de 40°C. El Código Alimentario Argentino exige un mínimo de 8 unidades Gothe.

En el presente trabajo se analizará la actividad diastásica mediante Unidades Amilolíticas (UI) utilizando una técnica espectrofotométrica. Se incubará una solución de almidón tamponado con muestras de miel, las enzimas presentes producirán la hidrólisis del polisacárido. El grado de hidrólisis se determinará por el agregado de una solución de yodo, el que detiene la reacción y produce un complejo con el almidón no hidrolizado, dicho complejo posee un máximo de absorción a 640 nm.

1. Reactivos

- Solución de sustrato: solución de almidón 0,5 mg/ml, tamponada a pH 7 con buffer fosfato 0,1 M en NaCl 0,15 M. Almacenar en heladera.

- Reactivo de yodo: solución 0,01 eq/L de I₂ en ácido clorhídrico 0,02 M. Almacenar en heladera. Para 100 ml de solución: 0,1269 g I₂ y 0,17 ml HCl concentrado.

2. Procedimiento:

Pesar 1 g de miel y diluir con 9 ml de agua destilada. Posteriormente con la miel diluida se preparan las muestras y los controles por duplicado de acuerdo a los pasos detallados en la siguiente tabla:

	Control	Muestra
Sustrato	1 ml	1 ml
	Incubar a 40 °C 3 minutos y agregar:	
Miel diluida	0	400 µl
Agua destilada	400 µl	0
	Incubar a 40 °C, 7 minutos 30 seg exactos y agregar:	
Solución de I2	1 ml	1 ml
	Mezclar y retirar del baño, agregar agua	
Agua destilada	8 ml	8 ml
	Mezclar por inversión y dejar reposar durante una hora, si la temperatura ambiente es superior a 25 °C medir antes de los 20 minutos.	
	Leer absorbancia (ABS) en espectrofotómetro a 640 nm Ajustar a cero con agua destilada.	

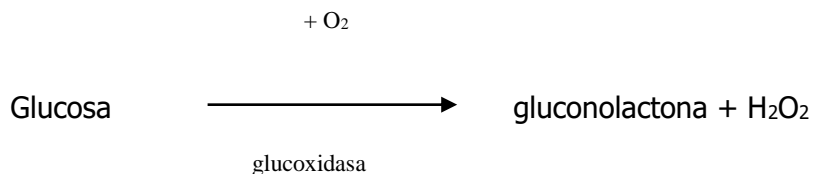
3. Medición de actividad enzimática:

$$UA = \frac{ABS \text{ del control} - ABS \text{ de muestra}}{ABS \text{ del control}} \times 100$$

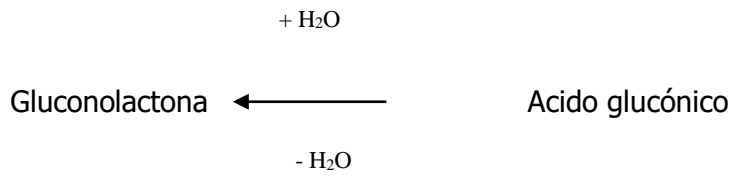
Actividad de la glucoxidasa

Metodología: Bianchi

Entre las enzimas que se encuentran en la miel, existe una enzima oxidante, la glucoxidasa, que produce peróxido de hidrogeno durante su acción sobre la glucosa de acuerdo a la ecuación:



La gluconolactona puede posteriormente pasar a ácido glucónico, que puede existir en equilibrio con lactona.



La oxidación enzimática de la glucosa tiene lugar muy lentamente en la miel no diluida y a velocidades mucho más elevadas a medida que esta se diluye. Esta enzima es más sensible al calor que la amilasa de la miel, lo cual constituye una prueba importante para determinar el calentamiento de la miel.

Se destruye calentando una solución de miel al 50% durante cinco minutos a 100 C, diez minutos a 80 C, o treinta minutos a 56C.

La acumulación del peróxido de hidrogeno en la miel diluida es la causa de la mayor parte de los efectos antibacterianos no osmóticos de la miel.

La glucoxidasa sufre una degradación por calentamiento, envejecimiento o adulteración de la miel.

Principio del método

La glucoxidasa actúa sobre la glucosa produciendo ácido glucónico, más peróxido de hidrógeno: este último en presencia de yoduro de potasio libera yodo, que con el almidón de una coloración azul.

En cambio, en su ausencia, al no producirse peróxido de hidrógeno no se libera el yodo, por lo tanto el almidón no se colorea de azul.

Reactivos:

- 1- Solución de yoduro de potasio al 1%:
Yoduro de potasio p.a..... 1g.
Agua destilada c.s.p..... 100ml
La disolución se hace en frío.

- 2- Solución de almidón al 0,100%
Almidón soluble..... 0,050g.
Agua destilada c.s.p..... 50ml

Pesar el almidón soluble en una balanza analítica, en un vaso de precipitación de 50ml, disolverlo en 10ml de agua destilada fría. Luego llevar a volumen de 40ml con agua destilada caliente y someter al calentamiento, manteniendo en ebullición por tres minutos.

Dejar enfriar espontáneamente y una vez frío pasar a un matraz aforado de 50ml y completar a volumen. Preparar una solución nueva días alternos.

- 3- Solución de ácido clorhídrico al 50 %:
Ácido clorhídrico conc. 25ml
Agua destilada c.s.p..... 50ml

En un matraz aforado de 50ml colocar 20ml de agua destilada, agregar el ácido clorhídrico lentamente con agitación, enfriar y completar a volumen.

- 4- Solución de glucosa al 8%

Glucosa p.a..... 8g
Agua destilada c.s.p..... 100ml

Disolver la glucosa p.a. en 20ml de agua destilada y completar a volumen.

5- Solución buffer fosfato ph 6,5.

Solución concentrada A. Se disuelven 27,6g de fosfato monosódico $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada (0,2M).

Solución concentrada B. Se disuelven 28,39g de fosfato disódico anhidro Na_2HPO_4 , o bien 53,62 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada (0,2M).

Mezclar 58,6ml de solución concentrada A con 31,5ml de la solución B en un matraz aforado de 200ml, y completar a volumen con agua destilada.

Material necesario

- Balanza
- Baño María
- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Pipetas
- Vaso de precipitado
- Instrumental de laboratorio

Preparación de la muestra

En un vaso de precipitado de 50ml pesar 1,2 g de la muestra, agregarle 1ml de buffer pH 6,5 y disolver sin calentar, con varilla de vidrio.

Luego agregarle 9ml de agua destilada, mezclar, trasvasar a un tubo de ensayo, e incubar por 30 minutos en baño María a 37° C.

Procedimiento

- a) Colocar en una gradilla 5 tubos de ensayo y agregarle a cada uno agua destilada en la proporción siguiente:
 - 1 tubo 0,00ml de agua destilada
 - 2 tubo 0,20ml de agua destilada
 - 3 tubo 0,40ml de agua destilada
 - 4 tubo 0,60ml de agua destilada
 - 5 tubo 0,80ml de agua destilada
- b) Agregar luego las cantidades de muestra siguientes:
 - 1 tubo 1,00ml de muestra
 - 2 tubo 0,80ml de muestra
 - 3 tubo 0,60ml de muestra
 - 4 tubo 0,40ml de muestra
 - 5 tubo 0,20ml de muestra
- c) Colocar 1ml de yoduro de potasio al 1% en cada tubo.
- d) Luego agregar una gota de ácido clorhídrico al 50% y dos gotas de solución de almidón al 0,100%.
- e) Incubar 5 minutos en baño María a 37 °C y retirar.

Preparación del testigo

Solución de glucosa al 8%.....3ml
 Yoduro de potasio al 1%.....1ml
 Solución de almidón al 0,100%.....2 gotas
 Agua oxigenada al 3%.....1 gota

El testigo es estable por 10 minutos.

Cálculo y expresión de los resultados

Comparar de inmediato los tubos problema con el testigo, cuya coloración no deberá ser inferior a este.

Nº de tubos no inferior al testigo	Cantidad de glucoxidasa
4 ó 5	Elevada
3	Regular
2	Escasa
1	Vestigios
0	Nula

Interpretación: cantidades menores de regular cantidad, corresponden a una miel vieja, calentada, mal procesada o adulterada.

Existen mieles con bajo contenido natural de glucoxidasa, por contener sustancias que descomponen el peróxido de hidrógeno que se ha formado.

Azúcares. Determinación por HPLC

Mediante este método se pueden determinar fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa en miel. Además, es utilizado para la cuantificación de otros sacáridos tales como melezitosa, enlosa, isomaltosa y rafinosa.

En este práctico solo se determinarán fructosa, glucosa y sacarosa.

Después de un proceso de filtración de la solución, el contenido de azúcar es determinado por HPLC (High Pressure Liquid Cromathophy) con detector RI. El área de los picos identificados se obtiene en base a sus tiempos de retención. La cuantificación es obtenida por el método de estándar externo sobre el área o altura de los picos (Bogdanov y Baumann, 1988).

Reactivos:

- El agua debe ser destilada o al menos de pureza equivalente.
- Metanol para HPLC
- Acetonitrilo para HPLC (sustancia peligrosa, por lo cual debe tenerse máximo cuidado en su uso.)

Instrumental:

- Ampolla muestra
- Baño ultrasónico
- Matraz aforado de 100ml
- Pipeta de 25ml
- Filtro de membrana para solución acuosa, con tamaño de poro de 0.45 μm
- Filtro soporte para filtro membrana con jeringa adaptada
- HPLC compuesto de bomba, aplicador de muestra, regulador de temperatura, detector RI termostatizado a 30 $^{\circ}\text{C}$ *, columna en horno con temperatura regulable a 30 $^{\circ}\text{C}$, integrador.
- Columna analítica de acero sin manchas, e.g. 4.6mm de diámetro, 250mm de longitud con sílica gel aminomodificado con tamaño de partícula de 5-7 μm . Antes de usar realizar convenientemente un sistema de ensayo que asegure que todos los azúcares puedan ser separados.

***Nota:**

La cromatografía debe ser mantenida a temperatura ambiente sin que influya sobre los resultados de los azúcares, determinados por el presente método.

Procedimiento:

Solución Eluyente para HPLC. Mezclar 80 vol de acetonitrilo con 20 vol de agua. Desgasificar antes de usar.

Sustancias estándares de fructosa, glucosa, sacarosa:

Pipetear 25ml de metanol dentro de un matraz aforado de 100ml. Dependiendo del azúcar que se analice disolver la cantidad abajo detallada, en aproximadamente 40ml de agua y transferirlo al matraz aforado y llevar hasta la marca con agua.

Fructosa: 2.000g

Glucosa: 1.500g

Sacarosa: 0.250g

Turanosa: 0.150g

Maltosa: 0.150g

Usar jeringa y un soporte filtro membrana para transferir de la ampolla la solución muestra. Las soluciones estándares son estables por 4 semanas en refrigerador a 4 $^{\circ}\text{C}$ y por 6 meses a - 18 $^{\circ}\text{C}$.

Preparación de la solución muestra

Pesar 5 g de miel y colocarlo en un vaso de precipitado y disolver con 40ml de agua. Con una pipeta tomar 25ml de metanol y agregarlo a matraz aforado de 100ml y transferir la solución de miel al matraz, llevar a volumen con agua. Correr completamente por una membrana de filtro y recolectar en ampolla de muestra. Almacenar como la solución patrón.

HPLC

Es usada una columna del tipo descrita anteriormente, las condiciones siguientes han sido encontradas para dar una separación satisfactoria.

Rango de flujo: 1.3min
Fase móvil: Acetonitrilo: agua (80:20, v/v)
Temperatura de columna y detector: 30°C
Volumen de muestra: 10 µl

Nota:

Se debe mantener a 30°C las condiciones de análisis y el detector termostaticado., si no es posible a temperatura ambiente.

Nota:

Deberán ser inyectados iguales volúmenes de muestra y solución estándar.

Cálculo y expresión de los resultados

Los azúcares de la miel son identificados y cuantificados por comparación de los tiempos de retención y las áreas de pico de estos azúcares con los azúcares de los estándares.

La cantidad porcentual de azúcares, w , debe determinarse para fructosa, glucosa y sacarosa (en g/100g) y es calculado de acuerdo a la siguiente fórmula (procedimiento estándar externo)

$$W = \frac{A_1 \times V_1 \times m_1 \times 100}{A_2 \times V_2 \times m_0}$$

Donde:

A_1 = área de pico o altura de pico dado del azúcar que compone la solución muestra, expresado en unidades de área, longitud o integración.

A_2 = altura de pico del compuesto azúcar en solución estándar expresada como unidades de área, longitud o integración.

V_1 = Volumen total de solución muestra en ml

V_2 = Volumen total de solución estándar en ml

m_1 = cantidad de azúcar en g en volumen total de estándar (V_2)

m_0 = peso de la muestra en g

Los resultados son redondeados al decimal.