

VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)  
EN MIEL DE ABEJAS POR EL MÉTODO 980.23 DE LA AOAC PARA EL  
LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD  
TECNOLÓGICA DE PEREIRA

PAOLA ANDREA ZAMBRANO CORREA

STEPHANY ORTEGA ALARCÓN

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

PEREIRA

2015

VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)  
EN MIEL DE ABEJAS POR EL MÉTODO 980.23 DE LA AOAC PARA EL  
LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUAS Y ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD  
TECNOLÓGICA DE PEREIRA

**PRESENTADO POR:**

PAOLA ANDREA ZAMBRANO CORREA

STEPHANY ORTEGA ALARCON

**DIRIGIDO POR:**

CARLOS HUMBERTO MONTOYA NAVARRETE

QUÍMICO INDUSTRIAL

**PROYECTO DE GRADO**

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
TECNÓLOGO EN QUÍMICA

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

PEREIRA

2015

## **DEDICATORIA**

### ***Stephany Ortega Alarcón***

*A Dios por ser mi guía y mi guardián de vida.*

*Este proyecto se lo dedico a mi madre Luz Nidia Alarcón Amariles, mi padre Luis Emilio Ortega Millán y a mi hermano Edwin David Ortega Alarcón por la dedicación, guía, responsabilidad, amor y apoyo incondicional que me brindaron para poder culminar este peldaño en mi vida; la fortaleza y motivación que me daban con sus palabras cuando no veía el camino para continuar.*

### ***Paola Andrea Zambrano Correa***

*A Dios y a la vida misma por darme la oportunidad de alcanzar un peldaño más, en el que espero sea un largo y fructuoso camino. E indudablemente a mi familia, a mi madre Margoth Correa Vallejo, mi padre Jorge Alberto Zambrano Sánchez y mi hermano Jorge Andrés Zambrano Correa, a quienes guardo un profundo agradecimiento por su gran amor, guía, dedicación y apoyo incondicional, los cuales han sido los cimientos de la gran estructura que conforma mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradecemos a Dios por guiarnos en cada paso de nuestra vida y permitirnos llegar hasta este momento con sabiduría.*

*Agradecemos a nuestras familias por el continuo afecto, comprensión y apoyo ofrecido durante la carrera.*

*Agradecemos a nuestro director, el QI. Carlos Humberto Montoya Navarrete jefe de laboratorios de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira por habernos brindado la oportunidad, el apoyo necesario y el tiempo disponible para llevar a cabo este proyecto.*

*Agradecemos al profesor Ariel Felipe Arcila Zambrano y a los integrantes del Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira por permitirnos desarrollar nuestro proyecto en sus instalaciones y facilitarnos sus materiales y equipos para poder llevar a la culminación, este trabajo.*

*Agradecemos al Tecnólogo Químico William Alexander Hernández Herrera por su asesoramiento, paciencia, colaboración en la realización de este proyecto y junto con el Químico Industrial Alexis Gonzales Díaz por el acompañamiento durante el desarrollo experimental.*

*Agradecemos a la profesora Gloria Edith Guerrero Álvarez por asesorarnos durante todo el proyecto y por estar pendiente en cada detalle para la continua mejoría de este.*

*Agradecemos a nuestros amigos que fueron una grata compañía en nuestro proceso de aprendizaje y nos apoyaron durante la realización de este trabajo.*

*Por último agradecemos a todas las personas que contribuyeron en nuestro crecimiento profesional en especial a nuestros profesores de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira.*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>LISTA DE FIGURAS</b> _____	<b>10</b>
<b>Pág.</b> _____	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> _____	<b>11</b>
<b>Pág.</b> _____	<b>11</b>
<b>LISTAS DE GRÁFICAS</b> _____	<b>13</b>
<b>Pág.</b> _____	<b>13</b>
<b>1. RESUMEN</b> _____	<b>3</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> _____	<b>6</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> _____	<b>7</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> _____	<b>10</b>
<b>5. MARCO TEÓRICO</b> _____	<b>11</b>
<b>5.1. ¿QUÉ ES LA MIEL?</b> _____	<b>11</b>
5.1.1 DESCRIPCIÓN _____	<b>11</b>
5.1.2. CLASIFICACIÓN _____	<b>11</b>
5.1.3. FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD. (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.( ICONTEC), 2007) _____	<b>12</b>
<b>5.2. ¿QUÉ ES EL HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)?</b> _____	<b>13</b>
5.2.1. ETAPAS CRÍTICAS EN LA PRODUCCIÓN DE MIEL DONDE EXISTE EL RIESGO DE FORMACIÓN DE HMF. _____	<b>15</b>
<b>5.3. DEFINICIONES DE ALGUNOS PARÁMETROS Y VOCABULARIO A UTILIZAR EN LA VALIDACIÓN (SEGÚN NTC-2194 E ISO 8402). (IVM, 1997).</b> _____	<b>16</b>
<b>5.4. REQUISITOS DE LA NORMA NTC/ISO/IEC 17025:2005. (ISO, 2005).</b> _____	<b>18</b>
<b>5.5. ¿QUÉ ES LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANÁLITICO? (Duffau et al., 2010).</b> _____	<b>19</b>
5.5.1. ESTABLECER PLAN DE VALIDACIÓN _____	<b>23</b>
5.5.2. DESARROLLO DE PRUEBAS DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN _____	<b>23</b>
<b>5.5.3. ELEMENTOS DE CALIDAD ANALÍTICA A CONSIDERAR:</b> _____	<b>24</b>
5.5.4. EVALUAR RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN _____	<b>25</b>
5.5.5. INFORME DE VALIDACIÓN _____	<b>25</b>
5.5.6. SELECTIVIDAD _____	<b>25</b>
5.5.7. LINEALIDAD _____	<b>25</b>
5.5.8. SENSIBILIDAD _____	<b>28</b>
5.5.9. LÍMITES _____	<b>29</b>
5.5.10. Límite de detección (LOD) _____	<b>29</b>
5.5.11. Límite de cuantificación (LOQ) _____	<b>30</b>
5.5.12. EXACTITUD _____	<b>32</b>
5.5.13. ROBUSTEZ _____	<b>36</b>

5.5.14. APLICABILIDAD	36
5.5.15. INCERTIDUMBRE	37
5.6. ESPECTROFOTOMETRÍA UV	39
5.7. CONDUCTIMETRÍA	40
5.8. POLARIMETRÍA:	40
5.9. REFRACTOMETRÍA	41
5.10. ASPECTOS BÁSICOS DE LA METROLOGÍA	42
5.10.1. METROLOGÍA Y CALIDAD	43
5.10.2. METROLOGÍA QUÍMICA	44
5.11. NORMATIVIDAD DE LA MIEL	45
5.11.1. CODEX STAND-012-1981	45
5.11.2. RESOLUCIÓN 1057 del 2010	45
5.11.3. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC. 1273	47
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>47</b>
6.1. MÉTODOS Y EQUIPOS	47
6.2. MUESTRA DE ANÁLISIS	47
6.3. ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS	48
6.4. MATERIALES:	48
6.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO 980.23 DE LA AOAC	49
6.6. ACTIVIDADES PRINCIPALES PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.	51
6.7. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LA MIEL.	53
6.7.1. Determinación de sólidos insolubles en miel	53
6.7.2. Determinación del contenido aparente de sacarosa	54
6.7.3. Determinación del contenido de humedad.	55
6.7.4 Determinación del contenido de cenizas y metales pesados	57
6.7.5. Determinación de conductividad	58
6.7.6. Determinación de acidez libre	58
6.7.7. Determinación de azúcares reductores	59
6.7.8. Determinación de pH	63
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>64</b>
7.1. LINEALIDAD	64
7.2 SELELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD	72
7.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN	74
7.4. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	77
7.5. ROBUSTEZ	89
7.6. RESULTADOS BROMATOLÓGICOS	99

<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>110</b>
8.1 LINEALIDAD	111
8.2. SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD	111
8.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	111
8.4. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	112
8.4.1. REPETIBILIDAD	112
8.4.2. REPRODUCIBILIDAD	112
8.5. ROBUSTEZ	113
8.5.1. Aumento del contenido de HMF por elevación de temperatura en una muestra de miel de abejas.	113
8.5.2. Aumento del contenido de HMF por aumento en la humedad en una muestra de miel de abejas.	114
8.6. ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS	115
8.6.1. CONTENIDO APARENTE DE SACAROSA	115
8.6.2. CONTENIDO DE CENIZAS	115
8.6.3. ACIDÉZ LIBRE	115
8.6.4. HUMEDAD	116
8.6.5. SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA	116
8.6.6. CONDUCTIVIDAD	116
8.6.7. PH	116
8.6.8. SÓLIDOS SOLUBLES	116
8.6.9. HIDROXIMETILFURFURAL	116
8.6.10. AZÚCARES REDUCTORES	116
8.6.11. METALES PESADOS	117
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>118</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>120</b>

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

<i>Figura 1. Estructura del 5- (hidroximetil) furfural</i>	13
<i>Figura 2. Reacción de formación del HMF.(James A. Dumesic, Yomaira J. Pagán Torres, Tianfu Wang, 2014)</i>	14
<i>Figura 3. Flujograma del proceso de la miel de abeja.(Feldman, Etcheverry, Nimo, Janin, &amp; Pons, 2AD)</i>	15
<i>Figura 4. Proceso de validación (Duffau et al., 2010).</i>	21
<i>Figura 5. Curva para establecer el rango lineal.</i>	26
<i>Figura 6. Curva de calibración.</i>	26
<i>Figura 7. Curva de calibración (regresión lineal).</i>	28
<i>Figura 8. Representación gráfica de la precisión y la veracidad.</i>	32
<i>Figura 9. Diagrama para la determinación de la incertidumbre (Duffau et al., 2010).</i>	38
<i>Figura 10. Mejoramiento continuo del Sistema de Gestión de Calidad (CORRALES MONTOYA &amp; MONTOYA CORRALES, 2012).</i>	43
<i>Figura 11. Procedimiento para la determinación de sólidos insolubles en miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	53
<i>Figura 12. Procedimiento para la preparación de patrones para la determinación del contenido aparente de sacarosa (Navarrete, 2013).</i>	54
<i>Figura 13. Procedimiento para la determinación del contenido aparente de sacarosa (Navarrete, 2013).</i>	54
<i>Figura 14. Procedimiento para determinar el contenido de humedad en miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	55
<i>Figura 15. Procedimiento para determinar cenizas y metales pesados en miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	57
<i>Figura 16. Procedimiento para la determinación de la conductividad en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	58
<i>Figura 17. Procedimiento para la determinación de acidez libre en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	58
<i>Figura 18. Procedimiento para la preparación de los reactivos necesarios en la determinación de azúcares en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	59
<i>Figura 19. Procedimiento para determinar el título de Fehling (Navarrete, 2013).</i>	60
<i>Figura 20. Procedimiento para la determinación de azúcares en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	61
<i>Figura 21. Procedimiento para la determinación de azúcares invertidos en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	62
<i>Figura 22. Procedimiento para determinar el pH de una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	63



## LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. <i>Parámetros que se deben evaluar según el tipo de método que se pretende utilizar (Duffau et al., 2010).</i>	22
Tabla 2. <i>Parámetros que se deben determinar para los análisis hechos por espectrofotometría (Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, 2011).</i>	24
Tabla 3. <i>Ejemplo para la determinación de límites.</i>	31
Tabla 4. <i>Valores permisibles para los requisitos exigidos por la resolución 1057 del 2010 para la miel de abejas (Palacio Betancourt, 2010).</i>	46
Tabla 5. <i>Requisitos Microbiológicos para la miel de abejas (Palacio Betancourt, 2010).</i>	46
Tabla 6. <i>Materiales.</i>	48
Tabla 7. <i>Actividades realizadas para llevar a cabo la determinación de cada parámetro.</i>	51
Tabla 8. <i>Valores de índice de refracción para la determinación del % de humedad en miel de abejas (Navarrete, 2013).</i>	56
Tabla 9. <i>Patrones de Hidroximetilfurfural para la determinación de la linealidad.</i>	65
Tabla 10. <i>Patrones y absorbancias para la determinación de la linealidad.</i>	66
Tabla 11. <i>Datos de las absorbancias y las concentraciones teóricas de los patrones de la curva de comprobación.</i>	69
Tabla 12. <i>Relación entre la concentración teórica y la concentración experimental obtenida a partir de la ecuación según el método 980.23 de la AOAC.</i>	71
Tabla 13. <i>Relación entre la concentración teórica y la concentración experimental obtenida a partir de la ecuación de la curva de verificación.</i>	71
Tabla 14. <i>Concentración ponderada de la muestra de miel fortificada.</i>	73
Tabla 15. <i>Concentración de Hidroximetilfurfural en miel sin fortificar.</i>	73
Tabla 16. <i>Absorbancia y concentración de los patrones de hidroximetilfurfural.</i>	74
Tabla 17. <i>Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 1.</i>	78
Tabla 18. <i>Cálculos de los resultados de de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 1.</i>	78
Tabla 19. <i>Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 1.</i>	79
Tabla 20. <i>Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 1.</i>	79
Tabla 21. <i>Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 2.</i>	80
Tabla 22. <i>Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 2.</i>	80
Tabla 23. <i>Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 2.</i>	81
Tabla 24. <i>Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 2.</i>	81
Tabla 25. <i>Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 3.</i>	82
Tabla 26. <i>Cálculo de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 3.</i>	82
Tabla 27. <i>Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 3.</i>	84
Tabla 28. <i>Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 3.</i>	84

Tabla 29. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 4.	85
Tabla 30. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 4.	85
Tabla 31. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 4.	86
Tabla 32. . Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 4.	86
Tabla 33. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 5.	87
Tabla 34. Cálculo de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 5.	87
Tabla 35. . Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 5.	88
Tabla 36. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 5.	88
Tabla 37. Resultados de dos repeticiones del calentamiento de la miel a siete temperaturas diferentes para lograr una modificación en el aumento del contenido de Hidroximetilfurfural.	89
Tabla 38 Análisis de varianza de un factor ANOVA, temperatura en Hidroximetilfurfural..	90
Tabla 39. Datos y resultados obtenidos para la observación del efecto de la humedad en la concentración del Hidroximetilfurfural en miel de abejas.	91
Tabla 40. Análisis de varianza de un factor ANOVA, humedad en Hidroximetilfurfural.	92
Tabla 41. Datos de miel de abejas con la variable acidez sin fortificar.	92
Tabla 42. Datos miel de abejas con la variable acidez fortificada.	92
Tabla 43. Resultados de análisis bromatológicos.	100
Tabla 44. Relación concentración Vs ángulo de giro de soluciones patrón para la determinación del contenido de sacarosa en miel.	101
Tabla 45. Resultados de la determinación del contenido de cenizas en miel de abejas.	102
Tabla 46. Resultados de la valoración de la acidez en la miel.	102
Tabla 47. Resultados del índice de refracción de la miel de abejas.	103
Tabla 48. Resultados de los ensayos de la determinación de HMF para bromatología.	104
Tabla 49. Título de Fehling.	104
Tabla 50. Azúcares reductores.	105
Tabla 51. Azúcares reductores totales.	105
Tabla 52. Reporte resultados de la determinación de Cobre en la muestra de miel de abejas.	106
Tabla 53. Reporte de la concentración de Cobre en la muestra de miel de abejas.	107
Tabla 54. Reporte de la concentración de Potasio en la muestra de miel de abejas.	107
Tabla 55. Reporte de la concentración de Calcio en la muestra de miel de abejas.	108
Tabla 56. Reporte de la concentración de Sodio en la muestra de miel de abejas.	108
Tabla 57. Reporte de la concentración de Hierro en la muestra de miel de abejas.	108
Tabla 58. Reporte de la concentración de Zinc en la muestra de miel de abejas.	108
Tabla 59. Reporte de la concentración de Magnesio en la muestra de miel de abejas.	109
Tabla 60. Reporte resultados de la determinación de Manganeso en la muestra de miel de abejas.	109
Tabla 61. Valores aceptados para cada uno de los criterios.(Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, 2011)	110
Tabla 62. Resultados promedio obtenidos por el analista A durante los 5 días; %CV y %E para tres soluciones.	112
Tabla 63. Resultados promedio obtenidos por el analista B durante los 5 días; %CV y %E para tres soluciones.	113
Tabla 64. Registro de concentración de minerales encontrados en la muestra de miel de abejas analizada.	117

## LISTAS DE GRÁFICAS

	<b>Pág.</b>
<i>Gráfica 1. Curva de calibración N°1 para la determinación de Hidroximetilfurfural en miel de abeja por el método de la AOAC 980.23.</i>	65
<i>Gráfica 2. Curva de calibración N°2 para la determinación de Hidroximetilfurfural en miel de abeja por el método de la AOAC 980.23.</i>	67
<i>Gráfica 3. Comprobación de la curva de calibración.</i>	69
<i>Gráfica 4. Promedio del aumento en la concentración del Hidroximetilfurfural con respecto a la temperatura.</i>	90
<i>Gráfica 5. Concentración versus ángulo de giro de soluciones patrón de sacarosa.</i>	101
<i>Gráfica 6. Curva de calibración para el análisis de Cobre.</i>	107

## 1. RESUMEN

La validación de un método analítico es una verificación de determinados parámetros de un método en la que los requisitos especificados para estos, demuestran que el método es idóneo para un uso previsto (Oficina Internacional de Pesas y Medidas, 2007).

En el presente trabajo se validó el método 980.23 de la AOAC (Horwitz & Latimer, 2011) en miel de abejas para la determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

El hidroximetilfurfural es un compuesto formado por la deshidratación de la fructosa, asociada a factores tales como: el pH ácido, agua, composición rica en monosacáridos, también influye el aumento de la temperatura, la acidez en función del tiempo y la humedad tiene repercusión en menor grado (López, Castillo, & Cano, 2004).

En Colombia la comercialización de la miel de abejas está regulada por la resolución 1057 del 2010 y la NTC 1273, en las que se establece los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que debe cumplir la miel para que pueda ser comercializada.

Una de las principales regiones en el país, que cuenta con un gran número de granjas apícolas, es el eje cafetero; de allí surge la necesidad de que un laboratorio especializado en el análisis de alimentos y certificado bajo la norma ISO 17025, tal como lo es el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, tenga en su portafolio de servicios el análisis de determinación de HMF debidamente validado, ya que en la actualidad las únicas ciudades cercanas al eje cafetero que cuentan con este tipo de laboratorios son: Bogotá, Medellín y Cali. Esto simboliza una gran desventaja para los apicultores de ésta región, puesto que tienen que enviar las muestras a estas ciudades, lo cual produce sobrecostos en el valor de los análisis y además puede llegar a generar errores en los resultados, ya que las muestras durante su transporte y almacenamiento sufriendo alteraciones en su composición y formándose interferencias tanto positivas como negativas.

Por lo anterior, se realizó una revisión bibliográfica para tener conocimientos fundamentales sobre los parámetros a revisar en la validación, la metodología y la técnica espectrofotométrica de absorción ultravioleta (UV).

Después, se inició con la etapa práctica donde se llevaron a cabo las mediciones cuantitativas; y posteriormente, se realizaron los análisis de datos estadísticos, de acuerdo con los parámetros a validar (linealidad, rango de trabajo, límite de

detección, límite de cuantificación, porcentaje de recuperación precisión e incertidumbre).

Finalmente estos parámetros se compararon con los criterios de aceptación establecidos por el Laboratorio de análisis de aguas y alimentos; determinando así que los parámetros son acordes a lo establecido en los instructivos del laboratorio.

## ABSTRACT

The validation of an analytical method is a verification of certain parameters of a method in which the requirements for these show that the method is suitable for an intended use (Oficina Internacional de Pesas y Medidas, 2007).

In this paper the method AOAC 980.23 (Horwitz & Latimer, 2011) in honey for the determination of hydroxymethylfurfural (HMF) in laboratory analysis of water and food at the Technological University of Pereira was validated.

Hydroxymethylfurfural is a compound formed by dehydration of fructose, linked to factors such as acidic pH, water, rich in monosaccharides composition also influences the increase in temperature, acidity function of time and moisture downstream in less (López et al., 2004).

In Colombia the marketing of honey is regulated by Resolution 1057 of 2010 and NTC 1273, in which the physicochemical and microbiological parameters that honey must meet in order to be marketed are established.

One of the major regions in the country, which has a large number of bee farms, is the coffee; there arises the need for a dedicated food testing and certified under ISO 17025 laboratory, as is the Laboratory of Analysis of Water and Food Technological University of Pereira, has in its service portfolio analysis HMF determination properly validated, as currently the only cities near the coffee belt to have such laboratories are: Bogota, Medellin and Cali. This symbolizes a major disadvantage for beekeepers in this region, because they have to send their samples to these cities, which produces about costs in the value of analysis and also can generate errors in the results, since the samples during transportation and storage they may be undergoing changes in its composition, thereby forming positive and negative interference.

Therefore, a literature spectrophotometric technique ultraviolet absorption (UV) review to take fundamental knowledge on the parameters for review on the validation methodology and it performed.

Then began the practice stage where carried out quantitative measurements; and then the analysis of statistical data, according to validate parameters (linearity, working range, detection limit, quantification limit, precision and recovery rate uncertainty) were performed.

Finally these parameters were compared with the acceptance criteria established by the laboratory analysis of water and food; thus determining the parameters are consistent with the provisions of instructional laboratory.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El 5-Hidroximetilfurfural (HMF) es uno de los compuestos formados por la degradación de los productos azucarados, en particular por deshidratación de la fructosa. Su aparición en la miel está directamente relacionada con alteraciones de color, el desarrollo de sabores y olores extraños. Esta conjunción de factores hace que el contenido de dicho aldehído sea considerado uno de los parámetros de calidad más a tener en cuenta.

Para el año 2012 la producción bruta en Colombia de miel de abejas fue de 5'018.850 dólares internacionales según datos estimados por la FAO (FAO, 2012). Según datos recogidos por la cadena apícola en Colombia se puede considerar que en el país existen unos 2100 apicultores que manejan unas 40.000 colmenas. Los principales núcleos de producción están en Santander del Sur, Cundinamarca, Boyacá, el eje cafetero, Sucre, Santa Marta, Antioquia, Cauca y Huila (Espinal & Nieto, 2006). Justamente el eje cafetero al ser una de las regiones de mayor producción de miel de abejas en el país, requiere de laboratorios capaces de determinar todos los parámetros exigidos por la Resolución 1057 del 23 de marzo de 2010 (Palacio Betancourt, 2010) sobre la miel de abejas del Ministerio de Protección Social de Colombia, y la Norma Técnica Colombiana 1273 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (ICONTEC), 2007) ; para poder de ésta manera optimizar la producción de éste alimento en la región.

A través de un sondeo telefónico a los principales laboratorios de análisis de alimentos del eje cafetero, se logró conocer que en la región no existe ningún laboratorio que esté habilitado para brindar el servicio de determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en miel de abejas, por lo que los apicultores se ven obligados a enviar sus muestras a ciudades capitales más lejanas tales como Medellín, Cali y/o Bogotá para poder realizar este análisis. Es por esto, que surge la necesidad de implementar el método 980.23 de la AOAC para la determinación de HMF en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de Universidad Tecnológica de Pereira.

Según todo lo establecido anteriormente se formula la siguiente pregunta ¿Es posible validar el método espectrofotométrico de la AOAC 980.23 para la determinación de HMF en miel de abejas para el Laboratorio de Análisis de Aguas y de alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira?

### 3. JUSTIFICACIÓN

El contenido de Hidroximetilfurfural (HMF) en la miel de abejas es un indicativo de las condiciones en que la misma ha sido almacenada, el tratamiento que ha recibido tanto en su procesamiento como en su transporte y su edad (Jr. Jonathan & W. White, 1978) . El máximo permitido en la normativa actual según la Resolución 1057 del 23 de marzo de 2010 (Palacio Betancourt, 2010) sobre la miel de abejas del Ministerio de Protección Social de Colombia, y la Norma Técnica Colombiana 1273 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.( ICONTEC), 2007) es de 60 ppm, el cual debe ser determinado a través del método de la AOAC 980.23. Valores superiores indican mieles viejas de baja calidad y/o excesivamente calentadas o adulteradas, por lo cual cambian sus propiedades organoléptica (López et al., 2004). De aquí surge la importancia de la determinación de éste compuesto dentro de los parámetros para el control de calidad que se le realizan a la miel.

En el caso del Hidroximetilfurfural (HMF), una de las restricciones más fuertes responde a “la calidad”. En efecto, tanto los consumidores, mayoristas y las industrias procesadoras están exigiendo métodos validados que garanticen la trazabilidad, las características diferenciales y la confiabilidad, al igual que los gobiernos quienes están implementando estas mismas exigencias dentro de las normas que dan permisibilidad a la comercialización de la miel dentro y fuera de cada país. Por otro lado, al ser la miel un producto percibido no sólo como “natural” sino consumido por sus propiedades terapéuticas y sus características nutricionales, los países importadores incrementan sus exigencias al punto de requerir certificados sanitarios, análisis de residuos e incluso la identificación de los apiarios de donde proceden (Fundación Fortalecer. & Ingeniero Gustavo Secilio., 2005).

Una de las técnicas analíticas más usadas por su confiabilidad y practicidad para llevar a cabo la determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en la miel de abejas es la espectrometría de absorción UV-vis, el modo de uso de esta técnica para llevar a cabo el análisis de dicha sustancia se encuentra documentado en el método de la AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) con código 980.23 (Horwitz & Latimer, 2011).

La implementación de éste método en el control de calidad de la miel de abejas trae grandes beneficios, ya que el conocimiento de la composición de un producto antes de que éste sea comercializado, determina si es un procedimiento útil, puesto que se podrían tomar medidas y corregir errores procedimentales para que de esta manera se pueda lograr el cumplimiento de las exigencias legales, asegurar la calidad y eficacia del producto, con el fin de que éste logre salir al mercado; razón por la cual se debe asegurar que el método analítico sea sometido



a un proceso de validación, para que de éste modo se compruebe si el método es lo suficientemente confiable, adecuado para el propósito y aplicación analítica propuesta en determinado laboratorio, que en este caso vendría siendo el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

El laboratorio que implementa un método analítico seleccionado para un propósito determinado, sea este normalizado, no normalizado o desarrollado por el laboratorio, es responsable de verificar su desempeño contra las especificaciones de esa validación, tanto antes de ponerlo en uso como durante su utilización rutinaria, para demostrar que lo domina y usa correctamente (Velandia Castellanos, 2008). Para el cumplimiento del Sistema de Garantía de Calidad, la validación es un factor muy importante a tener en cuenta, ya que es un factor muy apreciado tanto por los productores y/o comercializadores de la miel, como por los entes reguladores en el país (INVIMA e ICA).

La validación del método de la AOAC 980.23 para su posterior implementación en el portafolio de servicios del Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, trae buenos beneficios, ya que el uso de éste método, el cual se basa en la técnica espectrofotométrica de absorción UV-vis para el análisis, resulta más económico que el análisis a través de otras técnicas, además la norma colombiana sólo admite los resultados de los análisis de Hidroximetilfurfural (HMF) realizados por el método de la AOAC 980.30. Es por esto que realizar la validación de este método en el Laboratorio de la Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira se podría considerar como una buena opción tanto para el laboratorio como para los usuarios de éste, los cuales serían los primeros beneficiados, ya que el eje cafetero no cuenta con laboratorios autorizados que presten el servicio para esta determinación. Los apicultores de ésta región del país se ven obligados a enviar las muestras de su producto a ciudades más lejanas tales como Cali, Medellín y Bogotá, puesto que estas son las tres ciudades relativamente más cercanas que cuentan con laboratorios de alimentos que brindan el servicio de determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) en miel de abejas.

El Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira se desempeña como un laboratorio de extensión en el que se realizan análisis fisicoquímicos y microbiológicos para diferentes matrices y el cual ha sido acreditado por el Organismo Nacional de Acreditación ONAC. NTC-ISO / IEC 17025: 2005. Los análisis más relevantes que están dentro del alcance de la acreditación son: pH, alcalinidad total, dureza total, Aluminio, Nitratos, Nitritos, Fluoruros, Turbiedad, Hierro, Hidróxidos, Bicarbonatos, Sulfatos, Conductividad, entre otros (Universidad Tecnológica de Pereira. 2014).

Se pretende que implantando este servicio dentro del portafolio del laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, se pueda suplir la

necesidad de los apicultores de la región cafetera, brindándoles ventajas importantes, tales como una reducción en los costos y tiempo para el análisis previo a la comercialización de la miel exigido por los entes reguladores; y a su vez éste mismo laboratorio pueda entrar a competir dentro del mercado de los análisis bromatológicos de la miel, al proporcionar este servicio y a la vez encontrarse en una posición geográfica estratégica, ya que éste laboratorio se encontraría dentro del llamado “triángulo de oro” del país, lo que en éste caso significaría estar en el centro de las ciudades en donde se presta este servicio, en una región productora de miel.

El proveedor de miel de abeja solicitó quedar en anonimato para su protección legal, y privada.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Validar la determinación de hidroximetilfurfural (HMF) en miel de abejas con base en el método 980.23 de la AOAC para el laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Adoptar, acoplar y documentar el método de la AOAC 980.23 para el análisis de HMF en miel de abejas para el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Planear y desarrollar la validación de la determinación de Hidroximetilfurfural en miel de abejas de acuerdo al método 980.23 de la AOAC siguiendo como guía el instructivo para verificación de los métodos de ensayo 123 – LAA – INT – 17 establecido en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos.
- Elaborar el informe de validación de la determinación de HMF en miel de abejas de acuerdo al método 980.23 de la AOAC siguiendo como guía el instructivo para verificación de los métodos de ensayo 123 – LAA – INT – 17 establecido en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. ¿QUÉ ES LA MIEL?

Según el CODEX norma para la miel dice que se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis melífera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje (Codex Alimentarius, 2001).

Según la Resolución 1057 de 2010, la miel de abejas es una sustancia natural azucarada producida por abejas obreras de diferentes especies, a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o excreciones de insectos chupadores sobre partes vivas, recolectadas por las abejas, transformada por combinación con sustancias específicas propias de las abejas, depositada, deshidratada, almacenada y colocada dentro de celdillas del panal para su madurez (Palacio Betancourt, 2010).

#### 5.1.1 DESCRIPCIÓN

La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente fructosa y glucosa además de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas derivadas de la recolección.

El color de la miel varía de casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, o total o parcialmente cristalizada. El sabor y el aroma varían, pero derivan de la planta de origen (Codex Alimentarius, 2001).

#### 5.1.2. CLASIFICACIÓN

Según la Norma Técnica Colombiana NTC-1273 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.( ICONTEC), 2007) la miel dependiendo su origen se clasifica en:

- **La miel de flores o néctar:** es la miel que procede del néctar de las plantas, en nectarios florales y/o extra florales.

a) Miel mono floral: el producto procede totalmente o en su mayor parte de una sola especie de planta y posee las características organolépticas, fisicoquímicas, microscópicas propias de las mieles de dicha planta.

b) Miel multiflora: del néctar de varias especies vegetales diferentes, y en proporciones muy variables.

- **Miel de mielato:** es la miel que proviene principalmente de las excreciones de los insectos que succionan las partes vivas de las plantas.

- **Miel de mielada:** es la miel que procede principalmente de secreciones de partes vivas de las plantas diferentes a las flores.

- **Miel de abejas nativas:** es la miel producida por especies de abejas originarias de América Tropical presentes en el territorio colombiano, no introducidas, no naturalizadas cuyas características sensoriales y fisicoquímicas son propias de las mieles de cada especie.

### 5.1.3. FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD.

La miel no deberá tener ningún sabor, aroma o contaminación inaceptable que haya sido absorbido de una materia extraña durante su elaboración y almacenamiento. La miel no debe haber comenzado a fermentar o producir efervescencia.

No debe calentarse la miel en medida tal que se menoscabe su composición y calidad esenciales (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.(ICONTEC), 2007).

- **CONTENIDO APARENTE DE AZÚCAR REDUCTOR, CALCULADO COMO AZÚCAR INVERTIDO:** Miel de abejas 65 % como mínimo.

- **CONTENIDO DE HUMEDAD:** Miel de abejas 18 % como máximo.

- **CONTENIDO APARENTE DE SACAROSA:** Miel de abejas 5 % como máximo.

- **CONTENIDO DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA:**

a) Mieles distintas de la miel prensada 0,1 % como máximo

b) Miel prensada 0,5 % como máximo

- **CONTENIDO DE SUSTANCIAS MINERALES (CENIZAS):** Miel de abejas 0,6 % como máximo.

- **ACIDEZ:** 40 miliequivalentes de ácido por 1000 gramos como máximo.

- **ACTIVIDAD DE LA DIASTASA:** 3 como mínimo

- **CONTENIDO DE HIDROXIMETILFURFURAL:** 40 mg/kg como máximo.

- **ADITIVOS ALIMENTARIOS:** No se permite ninguno.  
La miel de abejas no debe contener glucosa comercial

## 5.2. ¿QUÉ ES HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)?

El Hidroximetilfurfural (HMF) (ver figura 1.) es una sustancia común que se produce ampliamente en una variedad de alimentos procesados. Se forma durante el calentamiento y / o almacenamiento de alimentos como resultado de la reacción de Maillard y / o caramelización del azúcar, miel, mermeladas, jugos concentrados, café tostado, caramelos, vinagre balsámico y frutos secos son algunos de los alimentos que contienen cantidades significativas de HMF. El aumento de temperatura también aumenta la tasa de formación de HMF en los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento. Además, las condiciones ácidas aceleran fuertemente la formación de HMF (ver figura 2.). El nivel de HMF se considera generalmente como un índice de la calidad del producto en los alimentos procesados (Gökmen & Morales, 2014).

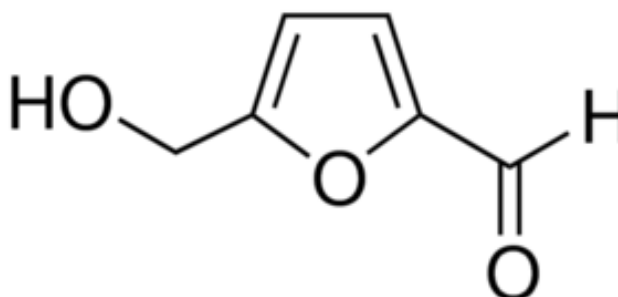


Figura 1. Estructura del 5- (hidroximetil) furfural(ACD/Chem Sketch, 2015).

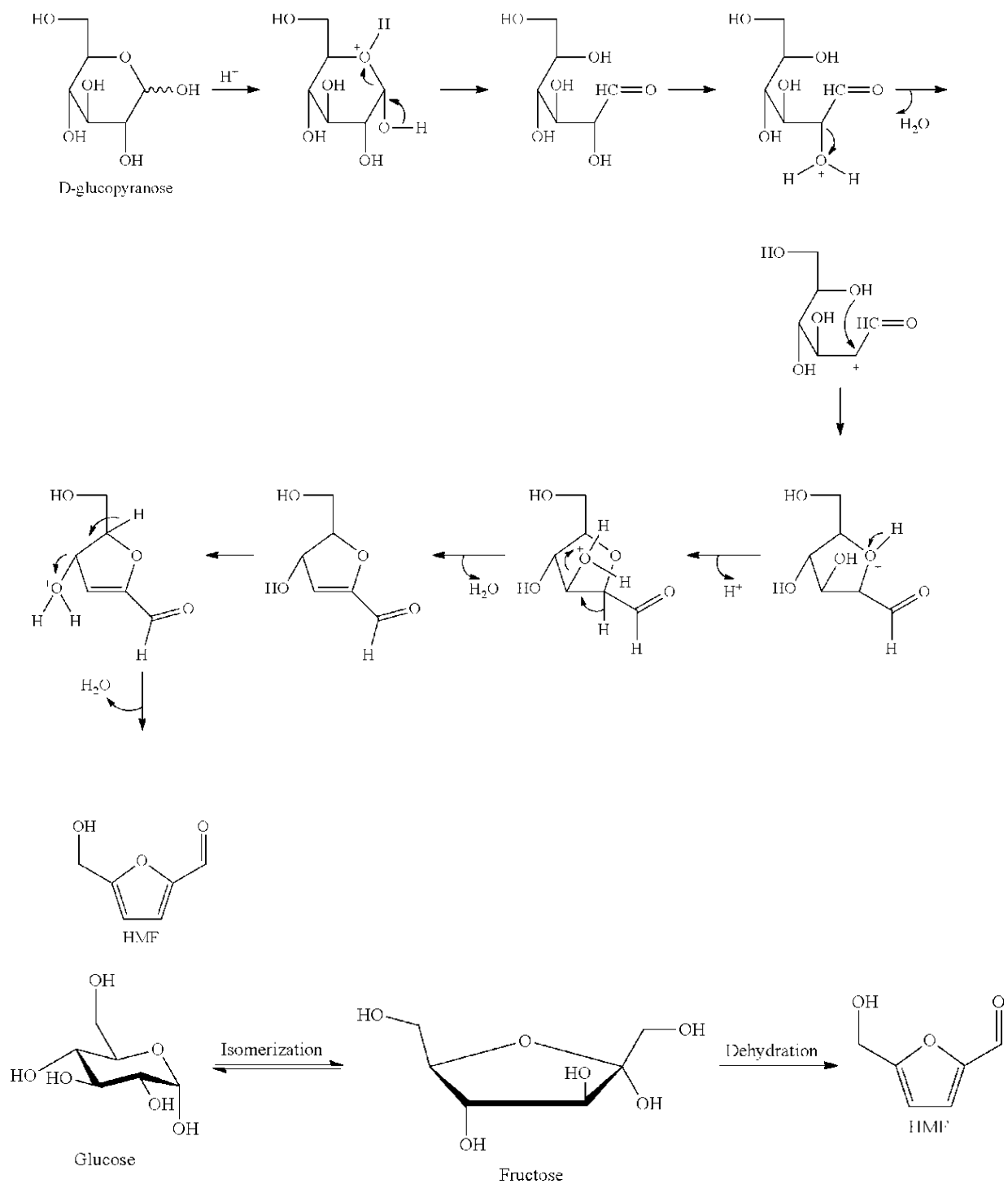


Figura 2. Reacción de formación del HMF (James A. Dumesic, Yomaira J. Pagán Torres, Tianfu Wang, 2014).

### 5.2.1. ETAPAS CRÍTICAS EN LA PRODUCCIÓN DE MIEL DONDE EXISTE EL RIESGO DE FORMACIÓN DE HMF.

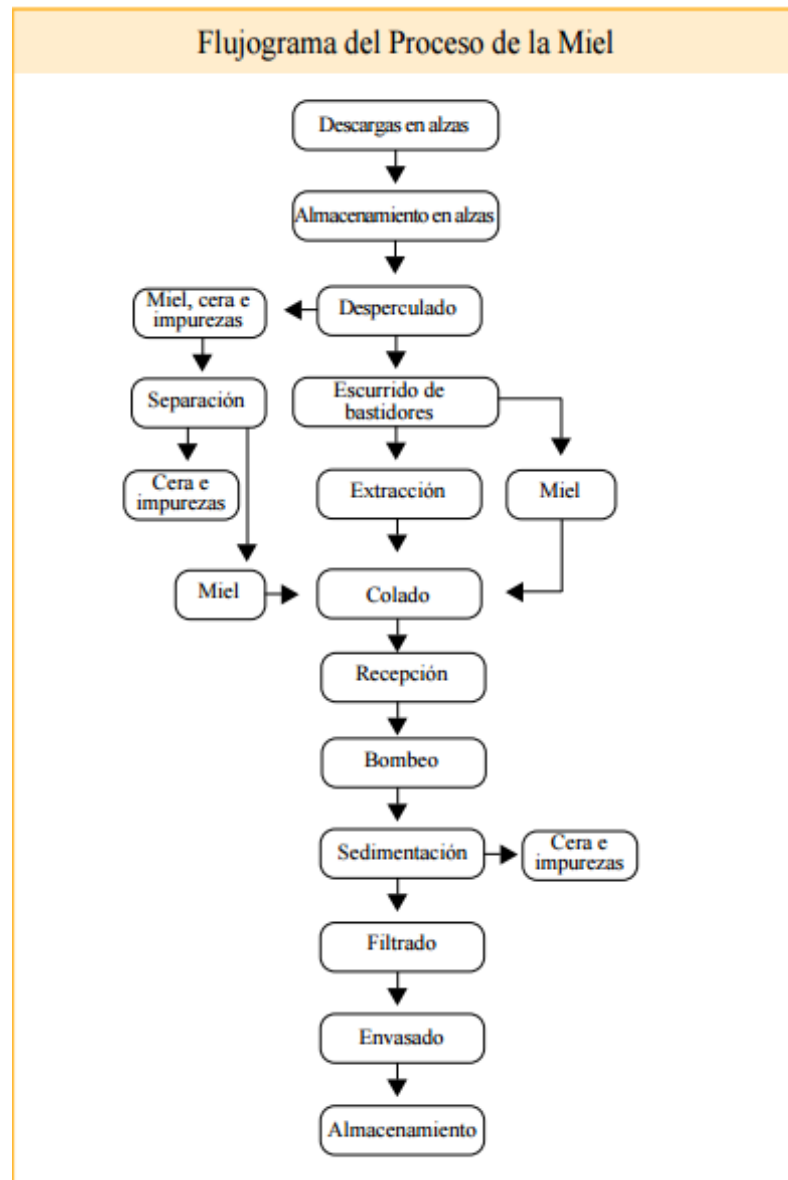


Figura 3. Flujograma del proceso de la miel de abeja (Feldman, Etcheverry, Nimo, Janin, & Pons, 2AD).

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



En la **etapa separación miel – cera**, existen varios tipos de sistemas y modelos de separación de miel y de cera. Dentro de los más difundidos, se encuentran los que actúan mediante calor (fundidores de cera, clarificadores de nivel, etc.).

Estos sistemas presentan la gran desventaja de que su empleo incorrecto produce graves alteraciones en la calidad de la miel. Los niveles de HMF se elevan en gran medida y la disminución de la actividad diastásica también se ve afectada.

En la etapa **almacenamiento de tambores**; las condiciones de almacenamiento son un punto crítico en la cadena. Si no se tiene un local resguardado de los rayos solares, la lluvia, con piso de cemento y una correcta manipulación de tambores, la miel envasada sufrirá modificaciones físicas y químicas que afectarán negativamente su calidad.

Por lo anterior se debe almacenar los tambores en locales que impidan la entrada del agua y no exponerlos a los rayos solares. La acción del sol eleva los valores de HMF y disminuye la actividad diastásica de la miel.

Mantener el lugar de almacenamiento siempre fresco (no superior a los 20°C) a fin de evitar temperaturas altas por periodos prolongados. (Producen elevación de HMF).

**Etapas de fraccionamiento**; durante el licuado es necesario elevar la temperatura de la miel. Para evitar su deterioro se recomienda contar con el asesoramiento de expertos, ya que su eficacia depende del equipo y del equilibrio entre la temperatura y tiempo de exposición al calor.

Como última etapa antes del fraccionado, se realiza **la pasteurización**. La misma consiste en un tratamiento térmico que tiene por objeto disminuir la actividad de mohos y levaduras sin degradar las características esenciales de la miel. Una medida para comprobar el desarrollo de este proceso es la observación de los valores de HMF (Feldman, Etcheverry, Nimo, Janin, & Pons, 2AD).

### **5.3. DEFINICIONES DE ALGUNOS PARÁMETROS Y VOCABULARIO A UTILIZAR EN LA VALIDACIÓN (SEGÚN NTC-2194 E ISO 8402).**

**Metrología-Ciencia de la medición:** la metrología incluye aspectos teóricos y prácticos relacionados con las mediciones, cualquiera que sea su incertidumbre y cualquiera que sea el campo de la ciencia o de la tecnología al cual se aplique.

**Exactitud de la medición:** cercanía del acuerdo entre el resultado de una medición y un valor verdadero de la magnitud por medir.

**Incertidumbre de la medición:** parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza a la dispersión de los valores que en forma razonable se le podrían atribuir a la magnitud por medir.

El resultado de la medición es la mejor estimación del valor de la magnitud por medir, y que todos los componentes de la incertidumbre, incluyendo los ocasionados por efectos sistemáticos, tales como los componentes asociados con correcciones y con patrones de referencia contribuyen a la dispersión (IVM, 1997).

**Instrumento de medición:** dispositivo destinado para efectuar mediciones, solo o en conjunto con uno o varios dispositivos adicionales.

**Patrón de trabajo:** patrón que se utiliza rutinariamente para calibrar o comprobar, instrumentos de medida.

**Calibración:** conjunto de operaciones que establecen bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de las magnitudes que indiquen un instrumento de Medición o un sistema de medición, o valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes determinados por medio de los patrones.

**Trazabilidad:** propiedad del resultado de una medición o el valor de un patrón tal que puede estar relacionado a referencias establecidas, generalmente normas nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones, con todas las incertidumbres declaradas.

## NOTAS

1. El concepto es a menudo expresada por el adjetivo trazable.
2. La cadena ininterrumpida de comparaciones se llama cadena de trazabilidad.

**Calidad:** conjunto de propiedades y de características de un producto o servicio, que le confieren su aptitud para satisfacer unas necesidades explícitas e implícitas.

**Aseguramiento de la calidad:** son todas aquellas acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio satisface los requisitos de calidad establecidos. Para que sea efectivo, el aseguramiento de la calidad requiere, generalmente, una evaluación permanente de aquellos factores que influyen en la adecuación del diseño y de las especificaciones según las aplicaciones previstas, así como también verificaciones y auditorías a las operaciones de producción, instalación e inspección. En una organización, el aseguramiento de la calidad sirve como una herramienta de la gestión.

**Confirmación metrológica:** es necesario tener presente el marco dentro del cual se requiere del proceso de confirmación metrológica, este proceso se entiende como necesario dentro de una organización para: Conocer, controlar, o minimizar el efecto de mediciones erróneas en la calidad resultante de un producto o servicio. Al revisar el concepto de Calidad declarado por ISO 9000 (2000), dice

que es el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple Con los requisitos, esa necesidad o expectativa establecida que conforman el conjunto de especificaciones de un producto o servicio (International Organization For Standardization, 2003).

#### **5.4. REQUISITOS DE LA NORMA NTC/ISO/IEC 17025:2005.**

El numeral 5.4.5 Validación de los métodos, de la norma ISO/IEC/17025:2005 dice que El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto (ISO, 2005).

El numeral 5.4.6 Estimación de la incertidumbre de la medición, de la norma ISO/IEC/17025:2005 dice que Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. En algunos casos la naturaleza del método de ensayo puede excluir un cálculo riguroso, metrológicamente y estadísticamente válido, de la incertidumbre de medición. En estos casos el laboratorio debe, por lo menos, tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, y debe asegurarse de que la forma de informar el resultado no dé una impresión equivocada de la incertidumbre. Una estimación razonable se debe basar en un conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia adquirida y de los datos de validación anteriores.

El numeral 5.6 Trazabilidad de las mediciones, la norma NTC/ISO/IEC/17025:2005 dice que Todos los equipos utilizados para los ensayos y/o las calibraciones, incluidos los equipos para mediciones auxiliares (por ejemplo, de las condiciones ambientales) que tengan un efecto significativo en la exactitud o en la validez del resultado del ensayo, de la calibración o del muestreo, deben ser calibrados antes de ser puestos en servicio. El laboratorio debe establecer un programa y un procedimiento para la calibración de sus equipos.

El numeral 5.9 aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y calibración, de la norma ISO/IEC/17025:2005 dice que el laboratorio debe tener procedimiento de control de calidad de ensayo y calibración, apropiados para el tipo y volumen de trabajo del laboratorio, para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y calibraciones llevados a cabo, registrarlos con el objetivo de

detectar tendencias, y en la medida de lo posible aplicar técnicas estadísticas para la revisión de resultados y puede incluir los elementos siguientes:

- a) Uso regular de materiales de referencia certificados (MRC) o secundarios.
- b) Participación en comparaciones interlaboratorio o ensayos de aptitud.
- c) Repetición de ensayos o calibraciones o de la calibración utilizando el mismo método o métodos diferentes.
- d) Repetición del ensayo o de la calibración de los objetos retenidos.
- e) Correlación de resultados para diferentes características de un instrumento.

## **5.5. ¿QUÉ ES LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANÁLITICO?**

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (Duffau et al., 2010).

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable.

Es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación.

Es esencial, entonces conocer el método a validar y su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración (nivel, LMP, LMR, etc.) y la matriz (o matrices) en las cuales se desea utilizar.

En general, se establece que el laboratorio debe validar:

1. Métodos no normalizados: corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
2. Método normalizado con una modificación significativa.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para

luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines de la son aceptable.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una Validación Prospectiva, generando a través de análisis datos experimentales.

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

1. Métodos normalizados.
2. Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.
3. Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.
4. Cuando se trate de métodos previamente validados, que haya sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser; cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, **cambio analista**, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.

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

En ocasiones, lo que se busca a través de una validación es demostrar que un método es equivalente a otro.

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

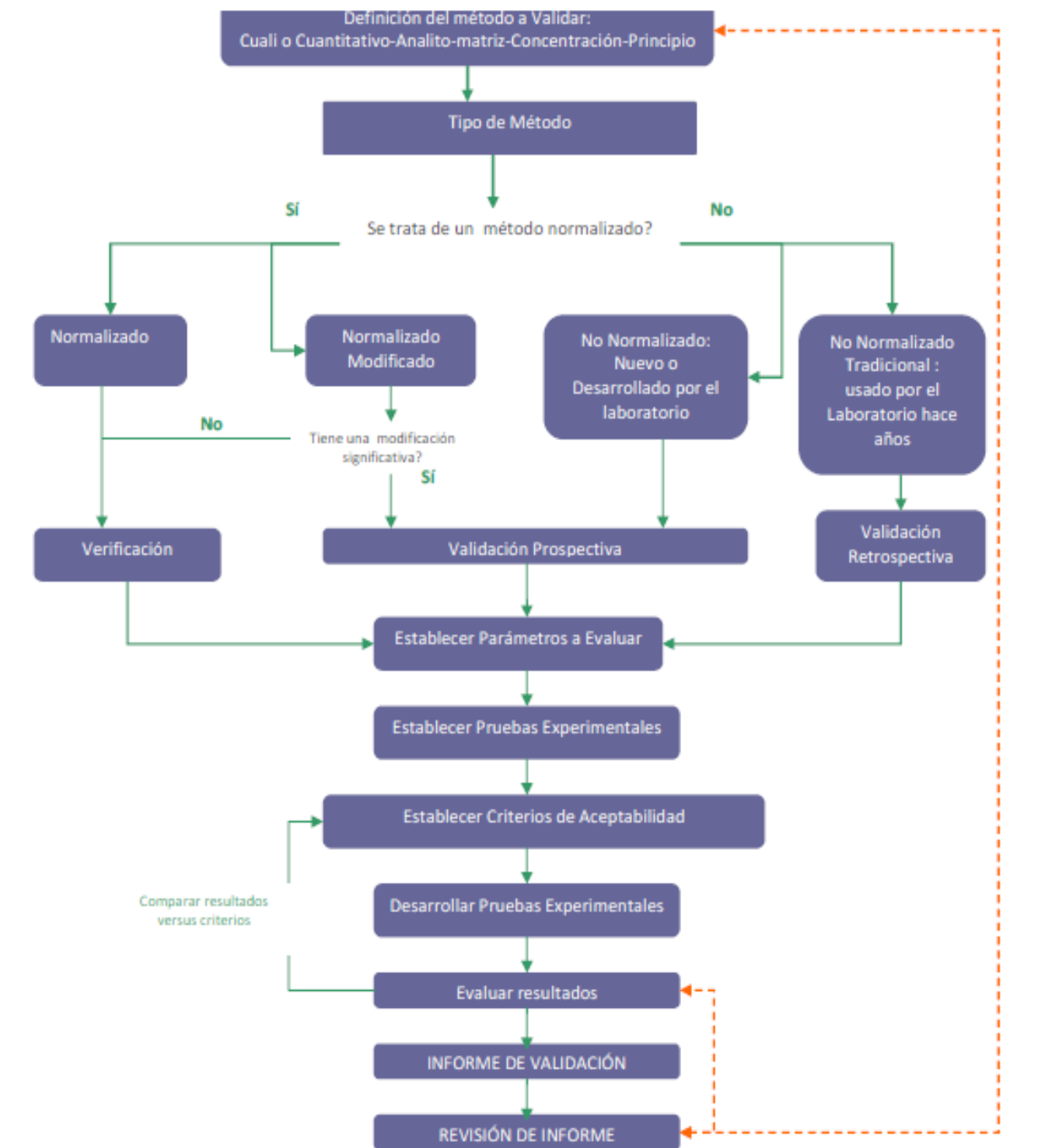


Figura 4. Proceso de validación (Duffau et al., 2010).

- **Validación Prospectiva:** Validación que se lleva a cabo durante la etapa de desarrollo en que se realiza un análisis de riesgo de cada etapa del proceso, el cual se divide en pasos individuales, que son luego evaluados basándose en la experiencia pasada a fin de determinar qué pasos pueden llevar a situaciones críticas (Tapia & Morales, 2013).
- **Validación Retrospectiva:** Involucra la evaluación de experiencias pasadas a través de la documentación de producción, bajo la condición de que la composición, procedimientos y equipos permanezcan sin cambios (Tapia & Morales, 2013).

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

Tabla 1. Parámetros que se deben evaluar según el tipo de método que se pretende utilizar (Duffau et al., 2010).

PARAMETRO A EVALUAR	CARACTERISTICA(S)	METODO CUALITATIVO	METODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
SELECTIVIDAD	Identificación analito Interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
LINEALIDAD	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
SENSIBILIDAD	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
LIMITES	Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
PRECISION	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
VERACIDAD	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
ROBUSTEZ	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
APLICABILIDAD	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

De acuerdo a los antecedentes anteriormente mencionados, el responsable de la validación o verificación deberá así elaborar el Plan de Validación que se va a realizar.

### **5.5.1. ESTABLECER PLAN DE VALIDACIÓN**

Se entiende como Plan de Validación, a un documento (tipo protocolo) en el cual se definen previamente a la experiencia; las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método.

El “Plan de Validación” deberá contener a lo menos:

- Alcance de la validación (método, analito, matrices y requerimientos del método)
- Diseño experimental:

Establecer la(s) muestra(s) a ser analizada(s): testigos reactivos, blanco matriz, material certificados, material control, material(es) de referencia certificado, matrices de las muestras, muestras sin fortificar, muestras fortificadas, etc.

El (los) parámetro(s) y pruebas a desarrollar, en caso, de que la prueba no sea una convencional, sino diseñada por el responsable, también deberá indicarse en el documento.

- Número de análisis requeridos para cada prueba y/o parámetro.
- Criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación.
- Analista(s) responsable de realizar la(s) prueba(s) analítica(s).

### **5.5.2. DESARROLLO DE PRUEBAS DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

Para el desarrollo de las pruebas de validación, los analistas a cargo deberán conocer el procedimiento de método de ensayo y el número de ensayos o mediciones a realizar de acuerdo a lo establecido en el plan de validación.

(IMPORTANTE: El personal responsable de realizar los análisis se encuentre debidamente calificado, y los equipos asociados al método deberían encontrarse calibrados o controlados antes de su uso.)

Los resultados obtenidos en cada prueba deben ser debidamente registrados y almacenados.

Los ensayos o mediciones realizadas serán con el fin de poder realizar las siguientes pruebas de parámetros de validación:

- Selectividad
- Linealidad



- Sensibilidad
- Límites
- Exactitud
- Precisión
- Robustez
- Aplicabilidad

El analista o responsable de la validación deberá con los resultados obtenidos de cada prueba realizar los cálculos matemáticos, comparativos y/o estadísticos correspondientes a cada ensayo para lo cual podrá utilizar para ese fin un software estadístico, calculadora o una planilla de cálculo (ejemplo: Excel).

### 5.5.3. ELEMENTOS DE CALIDAD ANALÍTICA A CONSIDERAR:

Con base en el instructivo de validación 124-LAA-INT-17 del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de Universidad Tecnológica de Pereira, establece que los elementos de calidad analítica a considerar según el método instrumental de espectrofotometría de UV para la determinación del Hidroximetilfurfural (HMF) en miel, son los siguientes:

**Tabla 2. Parámetros que se deben determinar para los análisis hechos por espectrofotometría**  
(Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, 2011).

<b>TÉCNICA DE MEDICIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA</b>		
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>RANGO DE TRABAJO</b>	X	
<b>LÍMITE DE DETECCCIÓN</b>	X	
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>	X	
<b>PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN</b>	X	
<b>PRESICIÓN</b>	X	
<b>INCERTIDUMBRE</b>	X	
<b>LINEALIDAD</b>	X	

#### **5.5.4. EVALUAR RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN**

Se deberá evaluar para cada parámetro de validación, si los resultados de las pruebas son satisfactorios, es decir, si cumplen con los criterios de aceptabilidad establecidos en el plan, se considera que el método es aceptable.

#### **5.5.5. INFORME DE VALIDACIÓN**

El responsable de la validación, deberá realizar un informe en el cual presentará los resultados obtenidos y conclusiones. El informe debe contener la declaración de la aplicabilidad del método.

El laboratorio debe tener disponible el procedimiento usado para la validación, y una declaración acerca de que el método se ajusta para el uso propuesto.

Este informe deberá ser revisado por una tercera persona que tenga conocimiento en el área, y que no haya formado parte del proceso de validación. En dicha revisión se deberá establecer si los criterios de aceptabilidad establecidos en el plan son aceptables, y si el método es idóneo para el fin previsto.

#### **5.5.6. SELECTIVIDAD**

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés.

La prueba de selectividad puede diseñarse de acuerdo al método, en el caso de cromatografía la resolución entrega información sobre la selectividad del método, en el caso de espectrofotometría el espectro de absorción o un espectro de masas entrega información al respecto, en especial cuando es comparado en presencia de una interferencia.

Una prueba de Selectividad comúnmente utilizada, consiste en analizar un mínimo de tres testigo reactivos, tres blancos de matriz y tres muestras o estándares de concentración conocida del analito de interés.

Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los testigos reactivos, blancos de matrices y estándares o muestras con analito. Si se encuentran diferencias significativas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.

#### **5.5.7. LINEALIDAD**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP o al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 5 valores).

Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal (figura 3.). Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la Curva de trabajo o curva de calibración (figura 4.). Graficar los datos de concentración de los estándares de calibración estimados (X) v/s la lectura observada (Y).

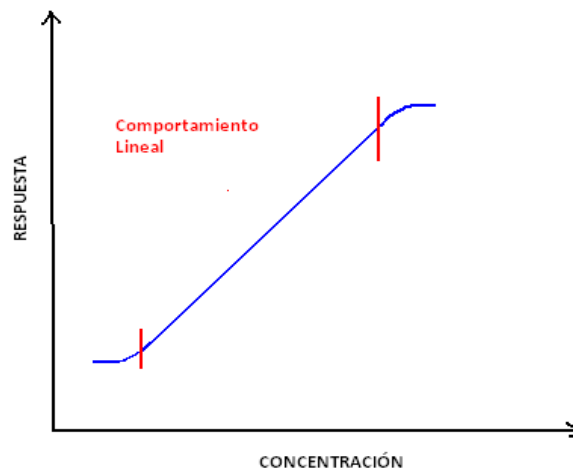


Figura 5. Curva para establecer el rango lineal.

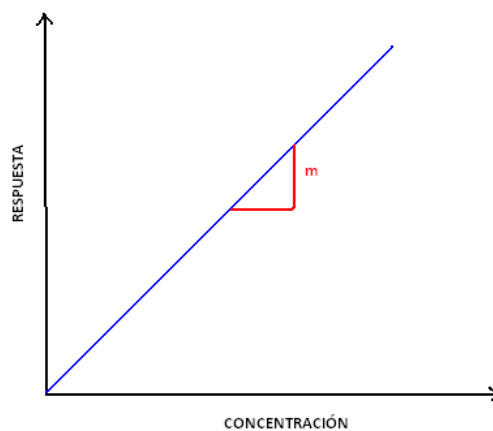


Figura 6. Curva de calibración.

Evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r o r') y el punto de corte (intercepto) con el eje de las Y (L<sub>0</sub>).

$$Y = X x m + L_0$$

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación:

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1. El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando r = 0, no existe correlación alguna, independencia total de los valores X e Y.

En la práctica si r tiene un valor cercano a uno (1), esto significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0.999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0.99.

$$r = - \frac{S_{xy}}{S_x \cdot S_y}$$

$$S_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n X_j \cdot Y_j}{n} - (X_{prom} \cdot Y_{prom})$$

$$S_x = \sqrt{\left( \left( \sum X_i^2 / n \right) - (X_{prom}^2) \right)}$$

$$S_y = \sqrt{\left( \left( \sum Y_i^2 / n \right) - (Y_{prom}^2) \right)}$$

**Dónde:**

**S<sub>xy</sub>**= covarianza de las variable X y Y.

**S<sub>x</sub>**= desviación típica de la variable X.

**S<sub>y</sub>**= desviación típica de la variable Y.

Coeficiente de correlación (r o r'): r > 0.99

Coeficiente de correlación al cuadrado r<sup>2</sup> > 0.99.

### 5.5.8. SENSIBILIDAD

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición.

En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.

Se calcula como:

$$m = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / n)}$$

El valor de sensibilidad obtenido [m] debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración con base a la lectura.

En la figura 5., se puede observar que mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas [m<sub>2</sub>] En el caso de [m<sub>3</sub>] grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura.

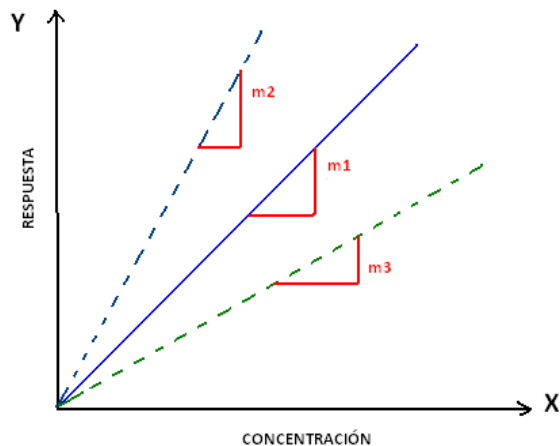


Figura 7. Curva de calibración (regresión lineal).

Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, visualiza cómo se comporta el instrumento.

### 5.5.9. LÍMITES

Se debe tener en consideración los siguientes parámetros: Valor crítico, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

**Valor crítico (LC):** El valor de la concentración o cantidad neta que en caso de superarse da lugar, para una probabilidad de error dada  $\alpha$ , a la decisión de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior a la contenida en el material testigo (Referencia: Codex Alimentarius).

Se recomienda para su cálculo a lo menos seis mediciones de blanco matriz o testigo reactivo.

$$LC = t(1 - \alpha; v) \times S_o \quad \text{Sí: } t(0.05, \infty) \rightarrow 1,645 \quad LC = 1,645 \times S_o$$

Dónde:

$t = \text{analito}$

$1 - \alpha = \text{probabilidad } b$

$V = \text{Grados de libertad}$

$S_o = \text{Desviación estándar de las lecturas del blanco matriz o testigo reactivo.}$

Un resultado inferior al LC que determine la decisión “no detectado” no deberá interpretarse como demostración de que el analito está ausente. No se recomienda notificar tal resultado como “cero” o como  $< \text{LOD}$ . Deberá hacerse constar en todo los casos el valor estimado y su incertidumbre.

### 5.5.10. Límite de detección (LOD)

Concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad  $(1-\beta)$ , a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo (Referencia del Manual del Codex Alimentarius).

Se recomienda para su cálculo a lo menos seis mediciones de blanco matriz, testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.

$$LOD = 2 t(1 - \alpha; v) \times S_o \quad \text{Sí: } t(0.05, \infty) \rightarrow 1.645 \quad LOD = 3.29 \times S_o$$

$LOD = 3.29 S_o$ , cuando la incertidumbre del valor medio (esperado) del material testigo es insignificante,  $\alpha=\beta = 0,05$  y el valor estimado tiene una distribución normal con una varianza constante conocida.

Un criterio de aceptación adecuado es  $LC < LOD < LMP$ . En general también se sugiere, para un  $LMP > 0,1$  ppm un  $LOD < 1/10 LMP$  y para un  $LMP < 0,1$  ppm un  $LOD < 1/5 LMP$ .

#### **5.5.11. Límite de cuantificación (LOQ)**

una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 10 % (o 6 %). El LOQ se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$LOQ = 10 S_o$$

Se recomienda para su cálculo a lo menos seis mediciones de blanco matriz , testigo reactivo o concentración estimada cercana al blanco.

En este caso, el LOQ es exactamente 3,04 veces el límite de detección, dada la normalidad y  $\alpha = \beta = 0,05$ . En el LOQ es posible lograr una identificación positiva con un nivel de confianza razonable.

Un criterio de aceptación adecuado es  $LC < LOD \ll LOQ < LMP$ . En general también se sugiere, para un  $LMP > 0,1$  ppm un  $LOQ < 1/5 LMP$  y para un  $LMP < 0,1$  ppm un  $LOQ < 2/5 LMP$ .

Ejemplo ejercicio de límites:

Para el analito mercurio en marisco fresco el límite máximo permisible es 0,5 mg/Kg. Se realiza la experiencia de medir 10 veces el blanco matriz:

Tabla 3. Ejemplo para la determinación de límites.

Medición	Resultado mg/Kg
1	0,05
2	0,05
3	0,03
4	0,04
5	0,05
6	0,03
7	0,01
8	0,05
9	0,05
10	0,04

La desviación estándar obtenida para los blancos:  $S_o = 0,013$

Por lo cual el LC sería:  $LC = 1,645 \times 0,013 = 0,022 \text{ mg/Kg}$

Por lo cual el LOD sería:  $LOD = 3,29 \times 0,013 = 0,044 \text{ mg/Kg}$

Se puede observar que se cumple que el LC es inferior al LOD, ya que  $0,022 < 0,044$ .

El LMP establecido por el analito es de 0,5 ppm es decir es  $> 0,1 \text{ ppm}$ , por lo cual el LOD debe ser  $< 1/10$  del LMP, es decir, debe ser inferior o igual a una décima parte de 0,5.

$(0,5 \text{ mg/L}/10) = 0,05 \text{ mg/Kg}$

0,044 mg/L es inferior a 0,05 mg/Kg, por lo cual se estaría aceptando el LOD calculado de acuerdo al criterio de aceptación establecido.

Si el LOQ sería:  $LOD = 10 \times 0,013 = 0,13 \text{ mg/Kg}$

Para un LMP de 0,5 ppm un LOQ  $< 1/5$  LMP, es decir, se debe determinar el (LMP/5), que es:  $0,5/5$  de 0,1 mg/Kg.

Por lo cual no se estaría cumpliendo el criterio pues 0,13 mg/Kg es mayor 0,1 mg/Kg. El LOQ no sería aceptable para el campo de aplicabilidad que le quiere dar al método.



En este sentido se puede tomar la decisión de buscar otro método que cumpla con estos requisitos para este fin previsto o aceptar su aplicabilidad, considerando en la declaración de la aplicabilidad estas reservas u observaciones en cuanto a su LOQ.

Es importante realizar posteriormente la experiencia analítica de la determinación del analito en el nivel de concentración determinado para el LOD o LOQ, es decir evidenciar resultados experimentales, que demuestren la validez del resultado obtenido.

### 5.5.12. EXACTITUD

El manual del Codex Alimentarius define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia.

El término “exactitud”, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo.

Cuando se aplica a un método de ensayo, el término “exactitud” se refiere a una combinación de veracidad y precisión. En el siguiente esquema de “Tiro al Blanco”, ampliamente utilizado para ejemplificar esto, los punto u orificios equivaldrían a los resultados analíticos y el círculo rojo al centro el rango en el cual se espera esté el valor de referencia (o verdadero).

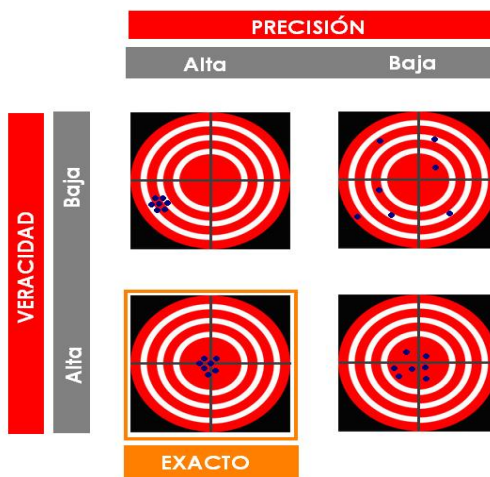


Figura 8. Representación gráfica de la precisión y la veracidad.

Como se puede observar entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, es más exacto.

**VERACIDAD:** determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado.

La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

**a) Sesgo (s):** La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud: Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$s = X - Xa$$

Dónde:

*S* = sesgo

*X* = lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

*Xa* = valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

Para evaluar el sesgo, se debe realizar la prueba t, en la cual el  $t_{obs} < t_{crit}$ :

$$t_{calc} = [Xa - X] / S \times \sqrt{n}$$

Dónde:

*t calc* = *t observado o calculado*

*Xa* = Valor esperado o valor certificado en concentración

*X* = Promedio de valores leídos u observados en concentración

*S* = Desviación estándar

*n* = Número de lecturas o valores observados.

**b) Recuperación (R):** Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación está intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Se recomienda realizar a lo menos 6 mediciones de cada uno en lo posible en tres niveles. Se debe considerar al elegir estos niveles el rango de la curva de calibración del método, el LOD y el LMP establecido. De manera que los niveles seleccionados permiten entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método, en cuanto a estos valores críticos.

Se calcula de la siguiente manera:

$$R = ((C_e - C_o)/C_a)$$

Siendo:

*R* = Recuperación

*C<sub>e</sub>* = es la concentración de analito de la muestra enriquecida.

*C<sub>o</sub>* = es la concentración de analito medida en la muestra sin adicionar.

*C<sub>a</sub>* = es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (%R): se calcula de la siguiente manera:

$$\%R = [ R ] \times 100$$

En caso de evaluar la recuperación, se deberá realizar prueba t, en la cual la t calc < t crit:

$$t_{calc} = [100 - \%R] / S \times \sqrt{n}$$

Dónde:

$t_{calc} = t_{observado \text{ o } calculado}$

$R = \text{Recuperación}$

$S = \text{Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación}$

$n = \text{Nº de lecturas o valores observados}$

**PRECISIÓN:** La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados (Referencia: Manual Codex Alimentarius 18º Ed.).

**a) Repetibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

Se puede determinar registrando a lo menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la Desviación Estándar ( $S_r$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_r\%$ ).

**b) Reproducibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.

Para determinar la precisión de la reproducibilidad intralaboratorio ( $R_i$ ) (es decir, la precisión dentro de un laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones de un Material de Referencia (MRC o material control) una vez por cada semana o el comportamiento de la curva de calibración en 3 días distintos.

También, se puede determinar registrando a lo menos 10 mediciones en días distintos, o en un mismo día cambiando a lo menos una condición analítica (ejemplo: operador, aparato, reactivos y largo intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la desviación estándar ( $S_{R_i}$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_{R_i}\%$ ).

Cuando se desea determinar la reproducibilidad interlaboratorios para fines de validación de un método, deben participar diferentes laboratorios, se debe tener en consideración que estos utilicen el mismo método y misma muestra, en un

intervalo de tiempo preferentemente establecido, se determina de este modo la desviación estándar de los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios (SR).

El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer con base a coeficiente de variación de Horwitz:

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5) \log C} \text{ o también se expresa como; } CV_h\% = 0,02 \times c^{0.8495}$$

Dónde:

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10, ejemplo 1ppm = 1mg/L =  $10^{-6}$

En este sentido se establece para la repetibilidad, el CVr% obtenido debe ser < (CV<sub>h</sub>%/2).

En el caso de la reproducibilidad interlaboratorios el CV<sub>R</sub>% < CV<sub>h</sub>%, para la reproducibilidad interna (intralaboratorio) CV<sub>Ri</sub>% < (2CV<sub>h</sub>%/3).

El Codex menciona que para coeficientes de concentración <  $10^{-7}$ , se aplica la teoría de Horwitz-Thompson, esto es, CV<sub>T</sub>= 22%.

### 5.5.13. ROBUSTEZ

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de estos resultados confiables.

Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones.

Entre las condiciones analíticas que podrían afectar un método se encuentran:

- Analistas
- Equipos
- Reactivos
- pH
- Temperatura
- Tiempo de reacción
- Estabilidad de la muestra
- Otros.

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

1. Identificar las variables que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método.
2. Establecer experimentos para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente, se determina los efectos de cada cambio sobre las condiciones de medida, de ser posible se diseñan controles de calidad para las variables críticas.

Se puede utilizar el análisis de varianza (ANOVA) de las herramientas de Excel, mediante el uso de la aplicación análisis de datos, análisis de varianza de un factor, la cual es utilizada para aislar y estimar las varianzas que contribuyan para el error total de un experimento, para analizar si hay o no diferencia entre los lotes de análisis.

Para estudiar la validez del modelo es necesario confirmar estas hipótesis mediante el estudio de los residuos (valores predichos - valores observados): normalidad, tendencias, etc. y la realización de un contraste de homocedasticidad (homogeneidad de varianzas entre los grupos). Para el estudio de la normalidad de los errores, se puede recurrir al estudio de la normalidad de cada pero no es recomendable, debido a que puede requerir un gran número de pruebas. La solución utilizada habitualmente es el estudio del gráfico de dispersión entre los residuos y los valores predichos (Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, 2011).

#### **5.5.14. APLICABILIDAD**

Se utiliza el término de Aplicabilidad, cuando un método de análisis puede utilizarse satisfactoriamente para los analitos, matrices y concentraciones previstas. La declaración de aplicabilidad (o ámbito de aplicación), además de una declaración del margen de funcionamiento satisfactorio para cada factor, puede incluir también advertencias acerca de la interferencia conocida de otros analitos, o de la inaplicabilidad a determinadas matrices y situaciones.

Es decir, la aplicabilidad consiste en una declaración de las especificaciones del rendimiento del método, que se entrega en el informe de validación y que normalmente incluye la siguiente información:

- La identidad de la sustancia analizada, incluyendo en su caso, de especiación (por ejemplo, "el arsénico total", "metil-mercurio").

- El intervalo de concentraciones cubierto por la validación (por ejemplo, "0-50 ppm")
- Una especificación de la gama de las matrices del material de prueba cubierto por la validación (por ejemplo, "marisco", "productos lácteos", etc.).
- La aplicación prevista y de sus requisitos de incertidumbre críticos. (Ejemplo: análisis de residuos de plaguicidas en frutas cítricas de acuerdo al reglamento sanitario de alimentos).

En este sentido, la prueba de aplicabilidad, consiste en el ámbito de aplicación del método declarado por el responsable de la validación, una vez concluida esta.

En aquellos casos que se trate de un método normalizado u oficializado, esta declaración se realiza de acuerdo a los antecedentes bibliográficos o normativos del método.

#### **5.5.15. INCERTIDUMBRE**

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando.

En este sentido, es importante que para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

##### **a) Muestreo**

**b) Efectos de la muestra:** Tipo de matriz, almacenamiento, etc.

**c) Sesgos Instrumentales:** Las debidas a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura

**d) Pureza de Reactivos:** Materiales de referencia, preparación de estándares.

**e) Analista:** Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralelaje.

**f) Condiciones de medición:** Las debidas al certificado de calibración: en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de  $k$  determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico, etc.

**g) Condiciones de medición:** Temperatura, humedad, etc.

**h) Otras:** Método (por ejemplo al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, etc.

Generalmente para el análisis de las fuentes de incertidumbre se utiliza el diagrama de espina de pescado u otro tipo de diseño esquemático que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico.

La incertidumbre de la medición comprende, en general, muchos componentes. Algunos de estos pueden ser evaluados por tipo.

Para este fin el laboratorio deberá realizar una evaluación de las incertidumbres tipo A y B que están presentes en el método:

**Evaluación de incertidumbre tipo A:** Evaluación de un componente por un análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definidas. Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad.

**Evaluación de incertidumbre tipo B:** Evaluación de un componente incertidumbre de la medición realizada por otros medios distinto a los del tipo A. Ejemplos: La evaluación basada en la información, obtenidos a partir de un certificado de calibración, obtenidos a partir de los límites deducirse a través de personal la experiencia, etc.

En general, la incertidumbre está dada por los errores sistemáticos y aleatorios presentes en el ensayo analítico.

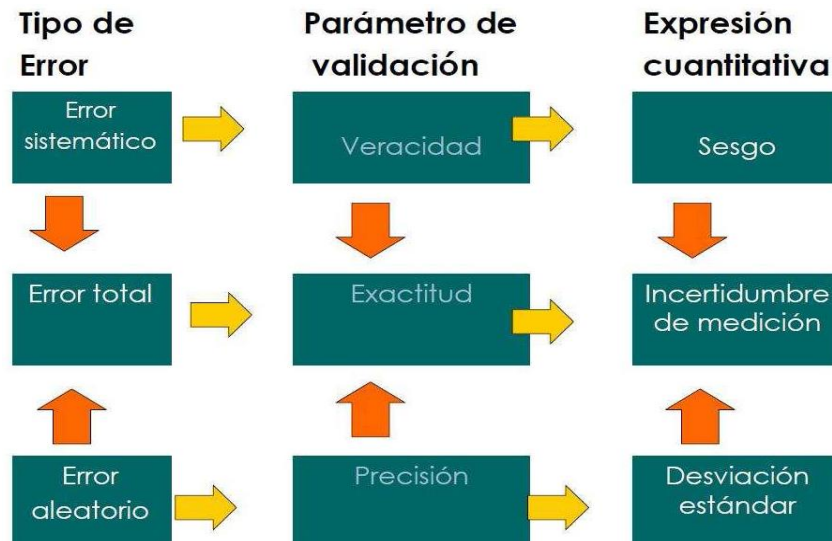


Figura 9. Diagrama para la determinación de la incertidumbre (Duffau et al., 2010).



## 5.6. ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Estas técnicas se basan en la capacidad de los compuestos para absorber energía. El análisis espectrofotométrico puede ser cualitativo o cuantitativo. En el cualitativo se compara el espectro de absorción de la muestra con espectros de patrones de composición conocida para identificar las bandas de absorción coincidentes. Se realiza frecuentemente en el infrarrojo, como por ejemplo en el análisis de cálculos urinarios. Mucho más frecuente es el análisis cuantitativo, basado en la ley de Beer, para calcular la concentración de una sustancia en una muestra.

Si se conoce  $\epsilon$ , que es característico de cada sustancia, se puede calcular la concentración de la sustancia en una solución:

$$c \text{ (mol/L)} = A / (\epsilon \times b), \text{ siendo } b \text{ la anchura de la cubeta en cm.}$$

Otra forma de calcular la concentración de determinada sustancia en una solución consiste en medir la absorbancia de dicha solución ( $A_p$ ) y compararla con la de otra solución de calibración ( $A_c$ ) de concentración conocida ( $C_c$ ). Así:

$$\text{Solución de calibración: } A_c = C_c \times \epsilon$$

$$\text{Solución problema: } A_p = C_p \times \epsilon$$

Por tanto, la concentración de la solución problema se puede calcular como:

$$C_p = C_c \times A_p / A_c = A_p \times K, \text{ siendo } K = C_c / A_c$$

Cuanto mayor sea  $\epsilon$ , mayor será la absorción del compuesto (cromógeno) y más sensible será la determinación. Siempre que sea posible se debe, se ha de medir la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción del compuesto o en su cercanía ya que de este modo se consigue la máxima sensibilidad y menores errores (Hernández, 2010).

## 5.7. CONDUCTIMETRÍA

La conductimetría mide la capacidad de los iones de una solución de transportar la corriente eléctrica cuando se les somete a una diferencia de potencial. Cuanto menor sea la resistencia de la solución, mayor será su conductividad. La conductividad en un medio acuoso depende de varios factores:

1. *Cantidad de iones*: cuando mayor sea la concentración, mayor será la conductividad.
2. *Tipo de iones*: los iones más pequeños y móviles, como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ , conduce mejor la corriente.
3. *Temperatura*: la movilidad de los iones aumenta con la temperatura, aproximadamente el 1-3% por grado Celsius.

Esta técnica se aplica a la determinación de la concentración de cloruro en agua, ya que, cuanto mayor sea la concentración de este ión, mayor será la corriente que puede pasar. No obstante, la conductividad también depende de otras especies iónicas presentes en el espécimen (Hernández, 2010).

## 5.8. POLARIMETRÍA:

La polarimetría se basa en la medida de la rotación óptica que sufre un haz de luz polarizada en un plano al atravesar una sustancia ópticamente activa, y tiene su origen en la asimetría estructural de las moléculas. Las determinaciones polarimétricas se realizan midiendo con un polarímetro el ángulo de desviación que experimenta la luz polarizada al incidir sobre una solución transparente que contenga especies ópticamente activas.

Un polarímetro consta básicamente de una fuente de radiación monocromática, un polarizador (prisma de Nicol), una celda con la disolución, un analizador y por último, un detector que puede ser el ojo humano o un fototubo.

La polarimetría se trata de una técnica no selectiva, pero que es muy útil para la determinación de ciertas sustancias como los azúcares en productos lácteos. La determinación del contenido de sacarosa en leche condensada es **un ejemplo** (Aucejo, Estellés, & Hernández, 2011).

**Sustancia ópticamente activa**: Cuando un rayo polarizado atraviesa ciertas sustancias, ocurre una interacción entre las radiaciones y las moléculas de la sustancia ocasionando un giro del rayo fuera de su plano de oscilación. Sustancias ópticamente activas son aquellas que hacen girar el plano de vibración de la luz polarizada. Se dice que la sustancia es Dextrógira (+ positiva) si el giro ocurre en el sentido de las manecillas del reloj para un observador que mira hacia la fuente de luz, y Levógira (- negativo) si el giro ocurre en sentido contrario.

Análisis cuantitativo: Las mediciones polarimétrica se adaptan fácilmente al análisis cuantitativo de compuestos ópticamente activos. Se emplean gráficas de calibración empíricas que relacionan la rotación óptica con la concentración. Estas gráficas pueden ser lineales, parabólicas o hiperbólicas, frecuentemente se construyen con el ángulo de giro (B) Vs concentración, buscando una relación lineal; el uso más extenso de la rotación óptica para análisis cuantitativo se encuentra en la industria azucarera (Eusse, 2014).

## 5.9. REFRACTOMETRÍA

Cuando la radiación atraviesa un medio transparente, se produce acción recíproca entre el campo eléctrico de la radiación y los electrones de enlace de la materia, como consecuencia la velocidad de propagación del haz es menor que en el vacío. La radiación se refracta cuando al incidir de un medio a otro en forma no perpendicular, se desvía su dirección y cambia su velocidad. En forma experimental, se observa un cambio brusco en la dirección, cuando la radiación incide con un ángulo en la interface de dos medios transparentes que tienen densidades diferentes.

El índice de refracción que se simboliza por la letra (n) es igual a la relación de la velocidad de la radiación en el vacío ( $V_{\text{vacío}}$ ), con la relación a la velocidad de la radiación en el medio i, ( $V_i$ ) valor que es constante a una longitud de onda ( $\lambda$ ) y temperatura dadas. Cuando el medio es el vacío todas las radiaciones se propagan con igual velocidad, dicha velocidad se simboliza con la letra (c) la cual es constante y tiene un valor aproximado  $3 \times 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$ . Esta relación es conocida como constante de refracción:

$$n = \frac{c}{v_t}$$

El índice de refracción no tiene unidades y es mayor o igual a la unidad, varía en líquidos 1,3 y 1,8 y en sólidos entre 1,3 y 2,5, el cual es muy usado para describir una especie química por su pureza; también es empleado para análisis cuantitativo de mezclas o soluciones teniendo en cuenta la concentración. El ángulo formado entre el rayo en el primer medio y la normal se llama ángulo de incidencia, i, mientras que el correspondiente ángulo en el segundo medio se denomina ángulo de refracción, r. El índice de refracción, n, es la razón entre las velocidades de la luz en ambos medios.

La ley de Snell representa a este índice como la razón de los senos de los ángulos de incidencia y refracción.

$$n = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$$

El símbolo del índice de refracción es  $n_D^{20}$ , se refiere a que es medido a 20 °C, con la línea D del sodio y con relación al aire (Echeverri, Henao, & Ramírez, 2009).

## **5.10. ASPECTOS BÁSICOS DE LA METROLOGÍA**

Obtener mediciones exactas y confiables, es un requisito fundamental para toda organización que desee estar entre las más competitivas, “puesto que lo que no se mide no se mejora”. A partir de las mediciones se asegura la calidad de los bienes o servicios que se comercializan, generando gran relevancia al momento de tomar decisiones al interior de las organizaciones.

La metrología es la ciencia de la medición, cuyo objeto de estudio comprende los patrones, las magnitudes y los sistemas de unidades. En ella se realiza una continua búsqueda de tolerancias más reducidas, y se evalúan las implicaciones económicas de mediciones erróneas en un mundo donde se ha vuelto imperante la protección del medio ambiente.

La metrología presenta tres subdivisiones:

- La metrología científica que se encarga de establecer y mantener las unidades de medida.
- La metrología industrial mejora los sistemas de medición que están directamente relacionados con la calidad del producto.
- La metrología legal se ocupa de la protección al consumidor, verificando que los procesos de medición implementados cumplan con los requerimientos técnicos que garanticen que el cliente se encuentre satisfecho con el bien o servicio adquirido.

Las organizaciones cambiaron su percepción hacia la metrología ya que sólo la consideraban relevante para cumplir unos requisitos y así obtener una certificación. Han trascendido de cumplir con unas exigencias sobre los dispositivos de medida a una gestión de las medidas con el fin de que equipos y procesos de medición sean adecuados para su uso previsto.

Para avanzar en un programa de mejoramiento de calidad es necesario contar, entre otras cosas con un sistema de mediciones confiable. Las mediciones y ensayo usualmente requieren de patrones de medición reproducible. Los resultados de las mediciones y ensayos están siempre sujetos a una incertidumbre.

### 5.10.1. METROLOGÍA Y CALIDAD

Un proceso productivo es un conjunto de transformaciones en las que se controlan múltiples variables para lograr un producto final que cumpla con las expectativas requeridas, en el caso de un laboratorio el producto será un dato, por lo anterior no es posible admitir un proceso en el que no se controlen las características del producto a través de las mediciones. Producir y medir son actividades intrínsecas que se deben planear, ejecutar. Controlar y mejorar de manera simultánea.

Para garantizar un Sistema de la Gestión de la Calidad en cualquier tipo de organización es relevante contar con calidad en las medidas, ya que se recopila una cantidad de datos que determinan el cumplimiento de las especificaciones técnicas o criterios de calidad de los productos, a su vez permiten detectar tendencias en los procesos, lo que conduce a su regulación por lo tanto a la búsqueda del mejoramiento continuo, como se observa en la figura 10.

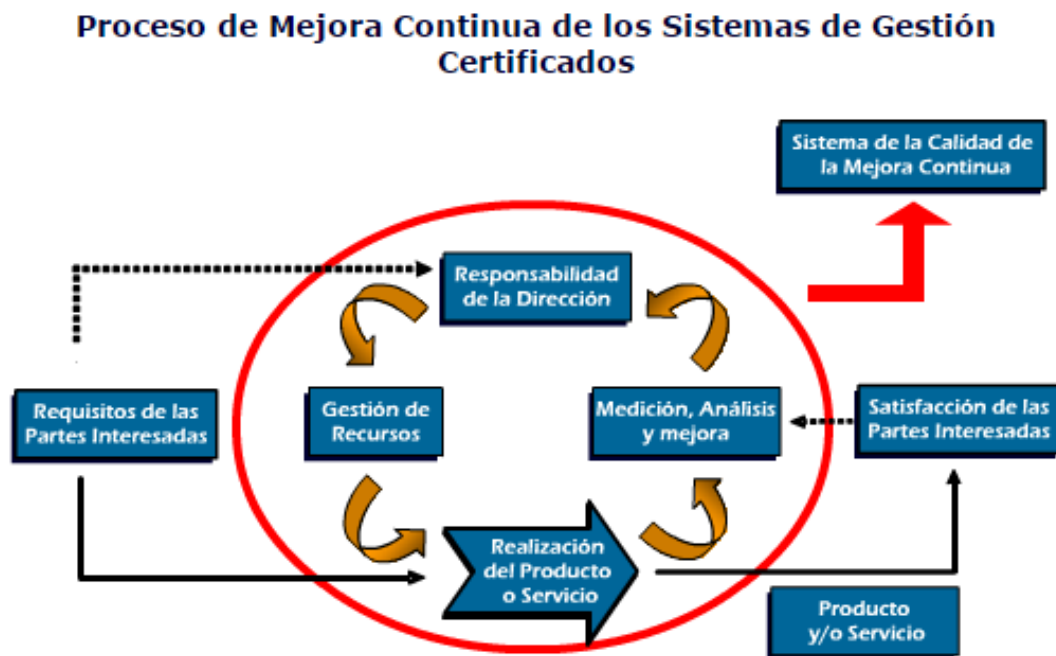


Figura 10. Mejoramiento continuo del Sistema de Gestión de Calidad (CORRALES MONTOYA & MONTOYA CORRALES, 2012).

La calidad de las medidas es exigida por medio de normatividades, referencias, solicitudes directivas y reglamentos internos, esta puede alcanzarse a través de calibraciones, verificaciones de equipos, cálculo de incertidumbres, validación de procesos de medida o control estadístico.

El aseguramiento de la medida tiene como finalidad lograr que los productos y procesos se encuentren exentos de errores significativos, por consiguiente integra

procedimientos de obtención y análisis de datos, con el fin de minimizar la probabilidad de tomar decisiones incorrectas.

Para saber las condiciones en que se encuentra cada uno de los instrumentos utilizados dentro de un proceso industrial, es necesario realizarles la calibración correspondiente a intervalos periódicos de tiempo de tal manera que se pueda contar con la seguridad de que las mediciones realizadas con dichos instrumentos son confiables.

Sin embargo la calibración y ajuste de los instrumentos de medida no garantiza por sí sola la calidad de las medidas ya que esta no actúa sobre: Los posibles errores humanos, los defectos que pueda presentar una pieza o las condiciones ambientales, lo que hace es contribuir al correcto funcionamiento de los instrumentos.

## **5.10.2. METROLOGÍA QUÍMICA**

Cada día se realizan en nuestro país miles de mediciones químicas, muchas de estas mediciones se realizan como parte de procesos industriales. Esto hace que su importancia en la economía sea fundamental.

Los resultados de los análisis químicos permiten desde el aseguramiento de la calidad de nuestros alimentos hasta el control de calidad de las materias primas en los procesos de manufactura en todo el país, pasando por el control de la contaminación ambiental y los aspectos relacionados con la salud.

Las mediciones que se realizan en el campo de la química han mostrado un rápido crecimiento principalmente en el área de la química analítica. Gran parte de este crecimiento se atribuye a diversos problemas relacionados con la contaminación ambiental, el tratamiento de desechos y en general a un mayor compromiso por el mejoramiento en la calidad de los productos siendo este último un factor clave en la competitividad de los mismos.

Los resultados que un laboratorio analítico emite pueden afectar las decisiones que en un momento dado determinaran el éxito o el fracaso de una organización, la aplicación de una política correcta de control ambiental, las decisiones en un litigio en transacciones comerciales ya sea a nivel nacional e internacional, etc.

La metrología química tiene como misión apoyar a los diversos sectores de la sociedad en la satisfacción de sus necesidades metroológicas presentes y futuras, estableciendo patrones nacionales de medición, desarrollando materiales de referencia y disseminando sus exactitudes por medio de servicios tecnológicos de

la más alta calidad, para incrementar la competitividad del país, contribuir al desarrollo sustentable y a mejorar la calidad de vida de la población.

En metrología química se asume que al efectuar mediciones existe un control y aseguramiento efectivos de la calidad de modo que los procesos de medición sean estables y bajo control estadístico tanto como sea posible (CORRALES MONTOYA & MONTOYA CORRALES, 2012).

## **5.11. NORMATIVIDAD DE LA MIEL**

El marco legal técnico de apicultura regula los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abeja para consumo humano. Dentro del ámbito nacional se cita la Norma Técnica Colombiana (NTC) 1273 y la Resolución 1057 de 2010 Ministerio de Protección Social; a nivel internacional existen: directiva 2001/110/CE Comunidad Europea y Codex Alimentarius. (Ver Anexo 1. Comparativo de los límites fisicoquímicos entre las cuatro normas)

### **5.11.1. CODEX STAND-012-1981**

El nivel aconsejable de HMF sigue siendo una cuestión conflictiva y las opiniones continúan divididas, reflejando las prácticas y las condiciones de mercado de los países particulares. El nivel de HMF en la miel depende del tiempo y la temperatura. Una gran cantidad de países ha pedido que el límite de 80 mg/kg que se establece en la presente norma (CODEX STAND-012-1981) se reduzca a 40 mg/kg. No obstante, hay una cantidad similar de países que se opone a toda reducción del nivel de HMF, alegando que eso podría crear una barrera técnica al comercio mundial para la miel producida en países con altas temperaturas ambiente. Por consiguiente, el nivel de 80 mg/kg se ha retenido en la norma, pero entre corchetes (Codex Alimentarius, 2001).

### **5.11.2. RESOLUCIÓN 1057 del 2010**

La presente resolución tiene por objeto establecer el reglamento técnico a través del cual se señalan los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para consumo humano, con el fin de proteger la salud y la seguridad humana y prevenir las prácticas que puedan inducir al error, confusión o engaño a los consumidores (Palacio Betancourt, 2010).

Según lo determina la presente resolución, el contenido de hidroximetilfurfural en la miel de abejas producida y/o comercializada en Colombia debe ser menor o igual a 40 mg/kg, y para mieles de origen tropical debe ser menor o igual a 60 mg/kg. Esta norma también establece otros parámetros fisicoquímicos y

microbiológicos que la miel debe cumplir para poder salir al mercado; estos parámetros están determinados en la siguiente tabla:

**Tabla 4. Valores permisibles para los requisitos exigidos por la resolución 1057 del 2010 para la miel de abejas** (Palacio Betancourt, 2010).

REQUISITOS	VALORES PERMISIBLES
Sólidos insolubles en agua %	≤ 0.1 para miel diferente a la prensada ≤ 0.5 para miel prensada
Contenido de humedad % m/m	≤ 20 ≤ 21 para mieles de origen tropical
Contenido aparente de azúcar reductor, calculado como azúcar invertido % m/m	≥ 45 (miel de mielato) ≥ 60 (miel floral)
Contenido aparente de sacarosa % m/m	≤ 5 ≤ 10 para mieles de origen tropical
Contenido de sustancia minerales (cenizas) % m/m	≤ 0.5
Conductividad eléctrica (mS/cm)	≤ 0.8
Acidez libre Meq de ácido/1000g	≤ 50
Índice de diastasa (escala Shade)	≥ 8
Contenido de Hidroximetilfurfural (mg/Kg)	≤ 40 ≤ 60 para mieles de origen tropical
Determinación de metales pesados (Cu, Cr, Cd, Pb, Hg)	Los límites máximos permitidos, serán los establecidos por el Ministerio de la Protección Social.

**Tabla 5. Requisitos Microbiológicos para la miel de abejas** (Palacio Betancourt, 2010).

REQUISITOS	MIEL DE ABEJAS			
	N	m	M	C
Recuento de esporas de Clostridium Sulfito UFC/g	3	10	100	3
Recuento de Mohos y Levaduras UFC/g	3	10	100	3



### 5.11.3. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC. 1273

Esta norma aplica a todas las mieles producidas por abejas obreras y regula todos los tipos de formas de presentación que se ofrecen para el consumo directo. De igual forma se aplica a la miel envasada en envases no destinados a la venta al por menor (al granel) y destinada al reenvasado en envases para la venta al por menor (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.(ICONTEC), 2007).

## 6. METODOLOGÍA

Para el proceso de validación de la determinación de HMF en miel de abejas a través de la técnica espectrofotométrica UV en el Laboratorio de Análisis de aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira se hizo uso del método de la AOAC 980.23 (Horwitz & Latimer, 2011).

El plan de validación se desarrolló según los parámetros establecidos para la técnica de medición espectrofotométrica dictados por el instructivo para la verificación de los métodos de ensayo con código 123-LAA-INT-17, versión 2 del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

### 6.1. MÉTODOS Y EQUIPOS

- **ESTÁNDAR:** se trabajó con un estándar de Hidroximetilfurfural (HMF) comercial de marca SIGMA-ALDRICH con una concentración del 99%. A partir de este estándar se realizaron las curvas de calibración planteadas y se determinaron los demás parámetros requeridos para la validación del método 980.23 de la AOAC.

### 6.2. MUESTRA DE ANÁLISIS

Se utilizó una miel de abejas fresca comercial con el fin de llevar a cabo la determinación de HMF que esta poseía y de ésta manera lograr poner en uso el método de la AOAC 980.23.

### 6.3. ESPECTROFOTÓMETRO UV

Se hizo uso del espectrofotómetro DR 5000 presente en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

### 6.4. MATERIALES:

Tabla 6. Materiales.

<b>Cantidad</b>	<b>Especificaciones</b>	<b>#</b>
3	Agitador de vidrio	1
2	Vidrio reloj	2
2	Espátula metálica	3
1	Bureta	4
100	Papel filtro Whatman® N°2 o similar.	5
5	Matraces Aforados de 50 mL	6
5	Matraces Aforados de 100 mL	7
10	Vasos de precipitado de 50 mL	8
4	Cubetas de cuarzo con camino óptico de 1 cm.	9
1	Frasco lavador	10
250	Micropipetas de 1 mL y de 5 mL	11
100	Tubos de ensayo de 18 x 150 mm	12
2	Soporte universal	13
6	Pinzas	14

## 6.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO 980.23 DE LA AOAC

Ésta metodología está basada en el método para la determinación de Hidroximetilfurfural HMF en miel 980.23 de la AOAC.

Ésta metodología de análisis de análisis fue empleada para la determinación de los parámetro de validación y para los análisis bromatológicos.

### A. REACTIVOS Y EQUIPOS

**(a) Espectrofotómetro.**- UV. Medir la muestra a 284 y 336 nm.

**(b) Solución Carrez I.**- Disolver 15 g de  $K_4 [Fe (CN)_6] \cdot 3 H_2O$  y diluir con  $H_2O$  hasta 100 mL.

**(c) Solución Carrez II.**- Disolver 30 g de  $Zn (CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O$  y diluir con  $H_2O$  hasta 100 mL.

**(d) Solución de bisulfito de sodio.**- 0.20%. Disolver 0.20 g de  $NaHSO_3$  y diluirlo hasta 100 mL con  $H_2O$ . Diluir 1+1 de la solución de referencia, si es necesario. Realizar la preparación cada vez que se vaya a medir para que se conserve fresca,

### B. DESARROLLO:

Pesar con precisión 5 g de miel en un beaker pequeño, y luego transferirla diluida en 25 mL de  $H_2O$  a un matraz de 50 mL. Añadir 0.50 mL de solución Carrez I, mezclar, y añadir 0.50 mL de solución Carrez II, mezclar bien, y luego se afora con agua hasta 50 mL. Una gota de alcohol puede ser adicionada para evitar la formación de espuma. Filtrar a través de un papel filtro, el cual puede ser P5 O Whatman 2, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Introducir 5 mL del filtrado en cada uno de los dos tubos de ensayo de 18 x 150 mm. Añadir 5 mL de agua al tubo 1 (solución de prueba) y 5 mL de solución  $NaHSO_3$  al otro tubo (blanco). Mezclar bien en el Vortex y proceder a hacer la lectura del primer tubo en el espectrofotómetro a 284 y 336 nm en una celda de 1 cm. Si el resultado de la solución de prueba es  $> 0.6$  diluir con agua y el blanco con  $NaHSO_3$  al 0.1% debe diluirse al mismo grado de la solución de prueba.

Lectura en Espectrofotómetro UV

**-Cálculo de resultados:**

$$HMF \left( \frac{mg}{100g} \right) = \frac{(A_{284nm} - A_{336nm}) \times 14,97 \times 5}{Porción\ ensayada\ (g)}$$

Dónde:

**14,97** =  $(126/16830) \times (1000/10) \times (100/5)$

**126** = *Peso molecular del HMF en g/mol*

**16830** = *Coeficiente de extinción molar de HMF a 284 nm (cm – 1 x mol – 1 x L)*

**1000** = *mg/g*

**10** = *centilitros/L*

**100** = *gramos (g) de miel informados*

**5** = *porción de ensayo nominal (g).*

Debe informarse la concentración de HMF en la muestra como mg/Kg de producto. (Horwitz & Latimer, 2011)

#### **- Control de Calidad**

Se efectuarán controles sistemáticos y periódicos para comprobar la validez de los ensayos realizados con el método analítico recogido en este procedimiento, según disponibilidad.

**a) Nivel I:** Ensayos de intercomparación ó utilización de materiales de referencia certificados ó patrones de referencia certificados, según disponibilidad.

**b) Nivel II:** Durante el desarrollo de la serie de trabajo se incluye:

- Ajuste del cero del equipo.

- Control de blanco al inicio de las lecturas (para estándar de referencia).

- Control de estándar de concentración conocida. (Laboratorio, Aditivos, & Chile., 2011)

## 6.6. ACTIVIDADES PRINCIPALES PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.

Tabla 7. Actividades realizadas para llevar a cabo la determinación de cada parámetro.

PARÁMETRO	ACTIVIDAD PRINCIPAL
<b>LINEALIDAD</b>	<p>Para llevar a cabo la determinación de éste parámetro, se prepararon diez patrones de HMF, partiendo desde una concentración mínima aproximada de diez partes por millón hasta llegar a una máxima aproximada de cien partes por millón. Luego de que cada uno de los patrones fueran tratados por el método 980.23 de la AOAC; con los valores obtenidos de la Absorbancia y los valores teóricos de la concentración de cada uno de los patrones, se construyó una curva de calibración, ubicando los valores de las concentraciones teóricas en el eje de las abscisas y los valores de las absorbancias en el eje de las ordenas. De éste modo se logró determinar el coeficiente de correlación que determina la linealidad.</p>
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN /LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>	<p>Para poder llevar a cabo la determinación de éste parámetro, se procedió a preparar con el estándar de HMF, diez soluciones de concentraciones teóricas aproximadas a 10 ppm. Posteriormente y haciendo uso del método 980.23 de la AOAC se le estableció a cada solución, su concentración experimental.</p> <p>Con los datos tanto teóricos como experimentales obtenidos, se procedió a calcular el promedio de los resultados y su respectiva desviación estándar. De este modo y haciendo uso de las ecuaciones ya establecidas en el instructivo de validación del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira 123-LAA-INT-17, se llevó a cabo la determinación de cada uno de los límites.</p>
<b>SELECTIVIDAD /ESPECIFICIDAD</b>	<p>Para determinar la selectividad/especificidad, se tomó una muestra de miel comercial y se determinó su contenido inicial de Hidroximetilfurfural (HMF), luego de conocer su concentración, se procedió a preparar una solución madre de 50 ppm aproximadamente, con el reactivo patrón de HMF. Posteriormente se pesaron 5 g aproximadamente de la miel de abejas comercial y 5 g aprox. de la solución madre de HMF, y se mezclaron. Después de obtenida esta mezcla se procedió a hacer el tratamiento a la muestra según lo dicta el método 980.23 de la AOAC, para poder de este modo hallar la</p>

	<p>concentración total de HMF en ésta solución.</p> <p>Teniendo conocimiento de la concentración de la muestra no fortificada, de la muestra fortificada y la concentración de la fortificación se pudo determinar el % de recuperación del método.</p>
<b>ROBUSTEZ</b>	<p>Se identificó teóricamente que variables pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método y se determinó que las condiciones de humedad, acidez y calor pueden afectar el contenido de Hidroximetilfurfural (HMF) en una muestra de miel. Es por esto que se tomaron 6 muestras de miel y se agruparon en tres parejas; cada una de éstas parejas fue sometida a una condición de afectación diferente.</p> <p>El contenido de humedad, acidez e Hidroximetilfurfural (HMF) en cada muestra de miel se determinó previo a su manipulación.</p> <p>para simular el aumento de la acidez en la miel, se le adicionó a la muestra una cantidad determinada de ácido acético al 15% v/v, se dejó en reposo durante sesenta minutos y posteriormente se determinó la concentración de HMF presente en la muestra.</p> <p>Para la modificación de la humedad en la miel, se le adicionó a la muestra una cantidad determinada de agua destilada, y a las 12 horas se determinó su contenido de HMF.</p> <p>Para modificar las condiciones de temperatura, se sometió la miel de muestra a un baño maría, hasta que su temperatura se elevó a unos 80°C aproximadamente durante quince minutos, después de pasado éste tiempo se determinó el contenido de Hidroximetilfurfural (HMF) en la muestra.</p>
<b>EXACTITUD (%E)</b>	<p>Con el fin de evaluar la exactitud del método se analizaron diariamente 2 réplicas de tres concentraciones diferentes, durante 5 días, de estándares a concentraciones teóricas de 100 ppm, 50 ppm y 5 ppm.</p>
<b>PRECISIÓN (%CV)</b>	<p>Para evaluar la precisión del método se analizaron diariamente por dos analistas diferentes durante cinco días y por duplicado, tres soluciones del patrón de Hidroximetilfurfural (HMF) de una concentración alta de 100 ppm, una media de 50 ppm y otra baja de 5 ppm. Estas concentraciones están dentro del rango de aplicación del método.</p> <p>La precisión se evaluó en términos de Reproducibilidad y Repetibilidad.</p>

## 6.7. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE LA MIEL.

Se realizaron los análisis fisicoquímicos exigidos por la Resolución colombiana 1057 del 2010 para la miel de abejas, en la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para consumo humano.

Pero, se tomó una muestra real con elevada concentración de Hidroximetilfurfural para comprobar si la fundamentación teórica respecto a la alteración de los parámetros relacionados con una elevada concentración de este compuesto se hacía evidente en la muestra de miel de abejas de estudio de la validación.

### 6.7.1. Determinación de sólidos insolubles en miel

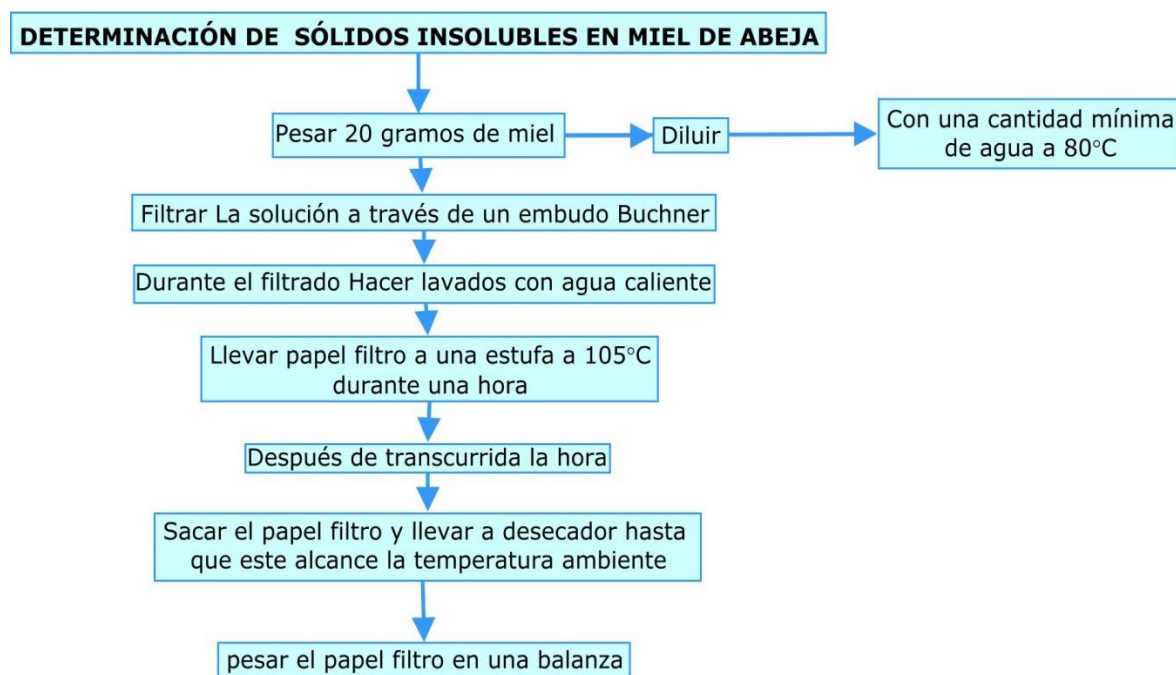


Figura 11. Procedimiento para la determinación de sólidos insolubles en miel de abejas (Navarrete, 2013).

Los sólidos insolubles en agua se calculan con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de sólidos insolubles en agua: } \frac{\text{masa retenida en el papel}}{\text{masa total de miel}} \times 100$$

## 6.7.2. Determinación del contenido aparente de sacarosa

### 6.7.2.1. Preparación de patrones:

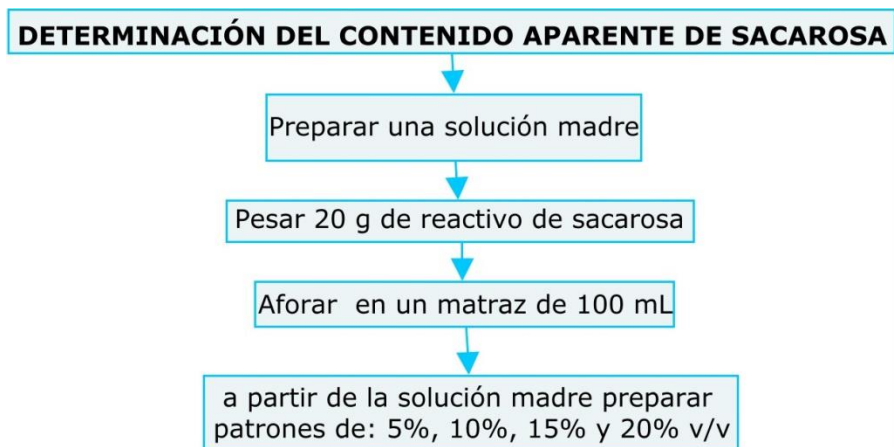


Figura 12. Procedimiento para la preparación de patrones para la determinación del contenido aparente de sacarosa (Navarrete, 2013).

### 6.7.2.2. Tratamiento de la muestra

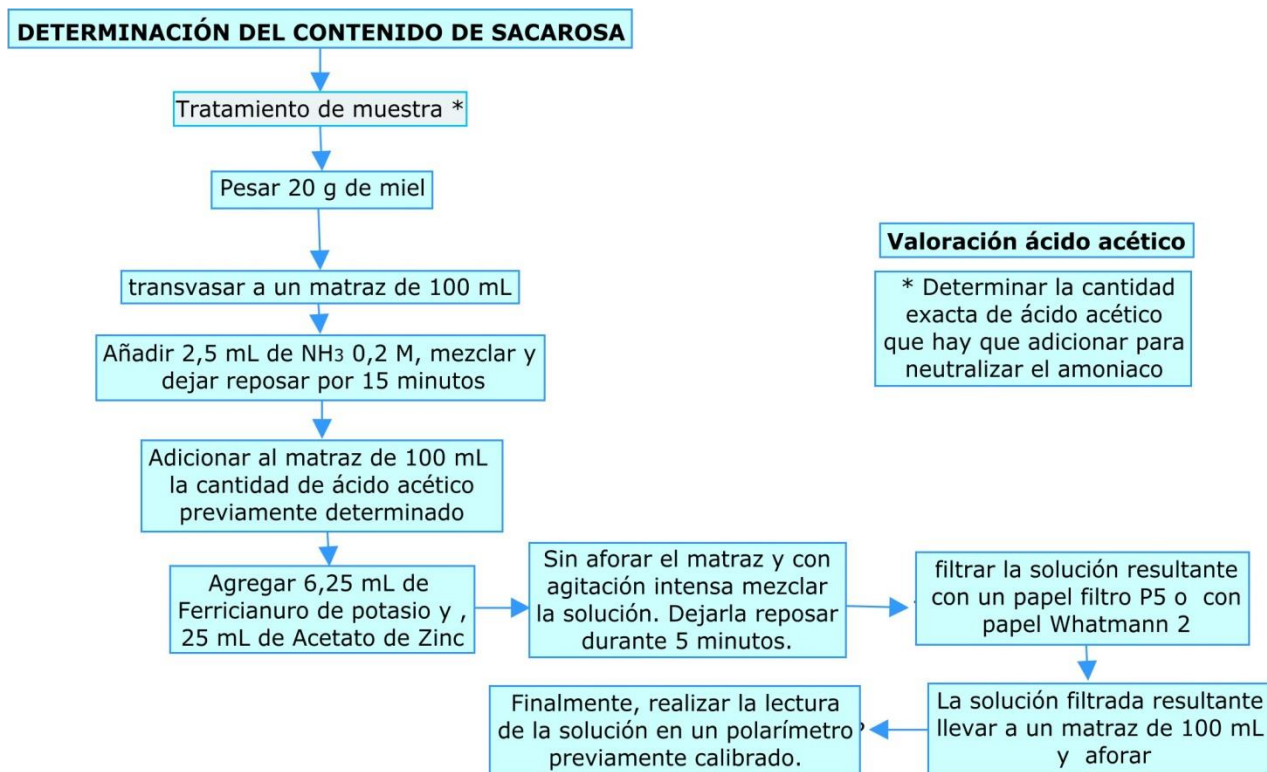


Figura 13. Procedimiento para la determinación del contenido aparente de sacarosa (Navarrete, 2013).



### Lectura en el polarímetro

Efectuar las lecturas polarimétricas, corregirlas a 20°C.

### CONCENTRACIÓN DE SACAROSA ( $C_m$ ):

$$\frac{A_m \times C_1}{A_1} = C_m$$

**Dónde:**

**Am:** ángulo de giro de la miel.

**C1:** concentración del primer patrón.

**A1:** ángulo de giro de la solución patrón.

### 6.7.3. Determinación del contenido de humedad.



Figura 14. Procedimiento para determinar el contenido de humedad en miel de abejas (Navarrete, 2013) .

Si la temperatura a la cual se realiza la lectura es > 20°C, se debe realizar una corrección de la temperatura añadiendo un valor al resultado 0.00023 por cada °C que sobrepasaba los 20°C. El porcentaje de humedad se calculó en la tabla 44. La cual relaciona el índice de refracción contra humedad a 20°C.

Tabla 8. Valores de índice de refracción para la determinación del % de humedad en miel de abejas (Navarrete, 2013).

<b>INDICE DE REFRACCIÓN A 20°C</b>	<b>% HUMEDAD</b>	<b>INDICE DE REFRACCIÓN A 20°C</b>	<b>% HUMEDAD</b>
1.5041	13	1.494	17
1.5035	13.2	1.4935	17.2
1.503	13.4	1.493	17.4
1.5025	13.6	1.4925	17.6
1.502	13.8	1.492	17.8
1.5015	14	1.4915	18
1.501	14.2	1.491	18.2
1.5005	14.4	1.4905	18.4
1.5	14.6	1.490	18.6
1.4995	14.8	1.4895	18.8
1.499	15	1.489	19
1.4985	15.2	1.4885	19.2
1.498	15.4	1.4880	19.4
1.4975	15.6	1.4876	19.6
1.497	15.8	1.4871	19.8
1.4965	16	1.4866	20
1.496	16.2	1.4862	20.2
1.4955	16.4	1.4858	20.4
1.495	16.6	1.4853	20.6
1.4945	16.8	1.4849	20.8

#### 6.7.4 Determinación del contenido de cenizas y metales pesados

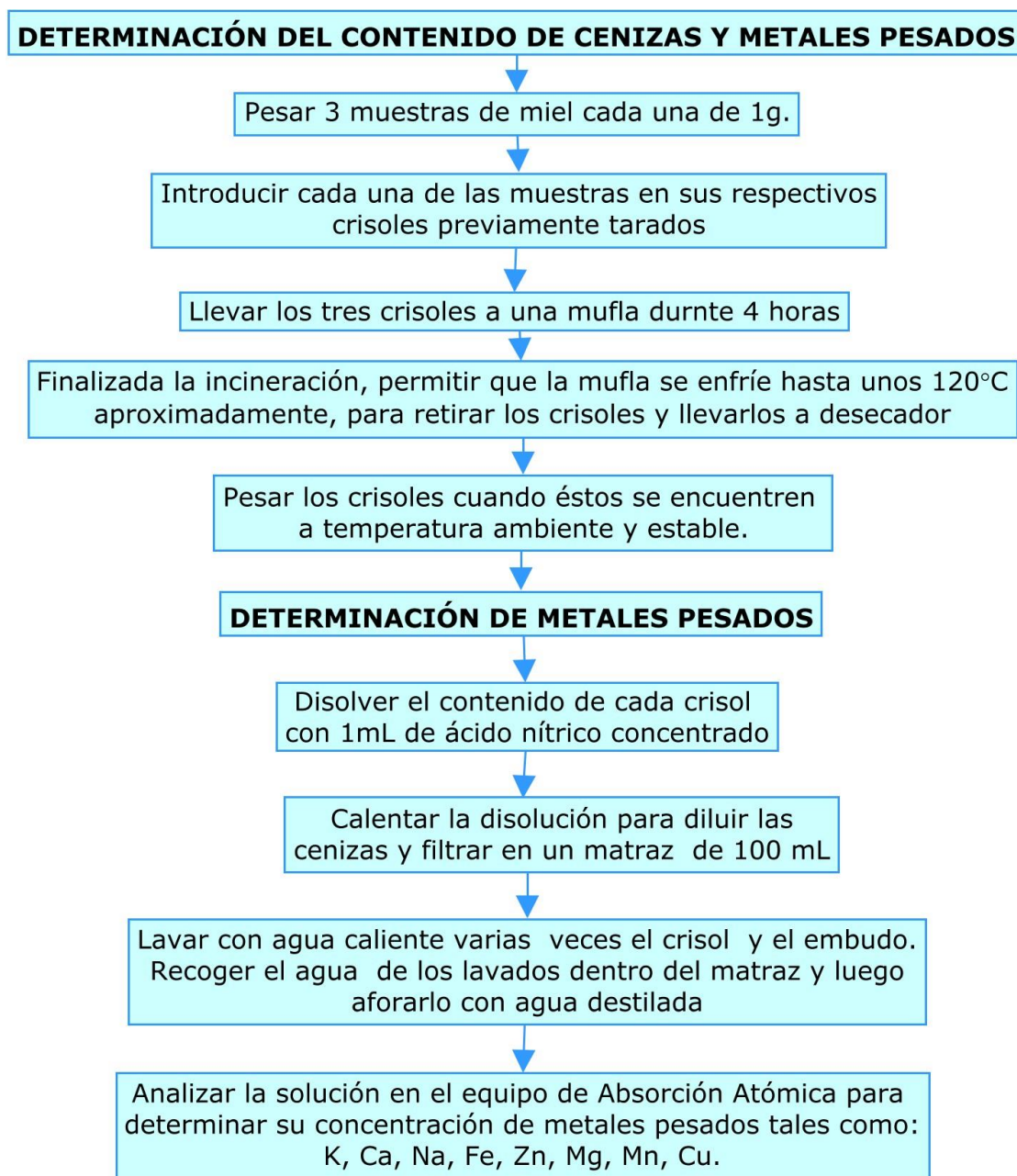


Figura 15. Procedimiento para determinar cenizas y metales pesados en miel de abejas (Navarrete, 2013).

### 6.7.5. Determinación de conductividad



Figura 16. Procedimiento para la determinación de la conductividad en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).

### 6.7.6. Determinación de acidez libre

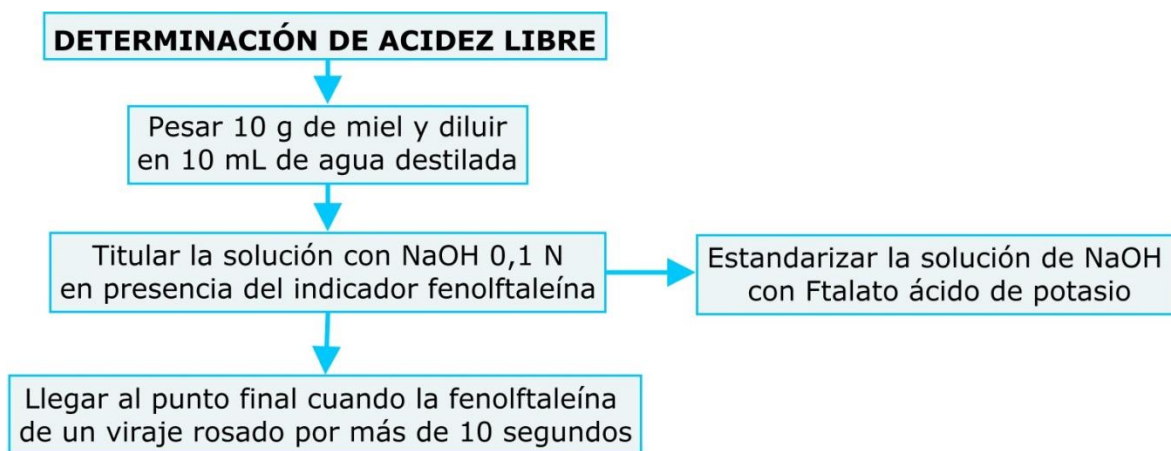


Figura 17. Procedimiento para la determinación de acidez libre en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).

### 6.7.7. Determinación de azúcares reductores

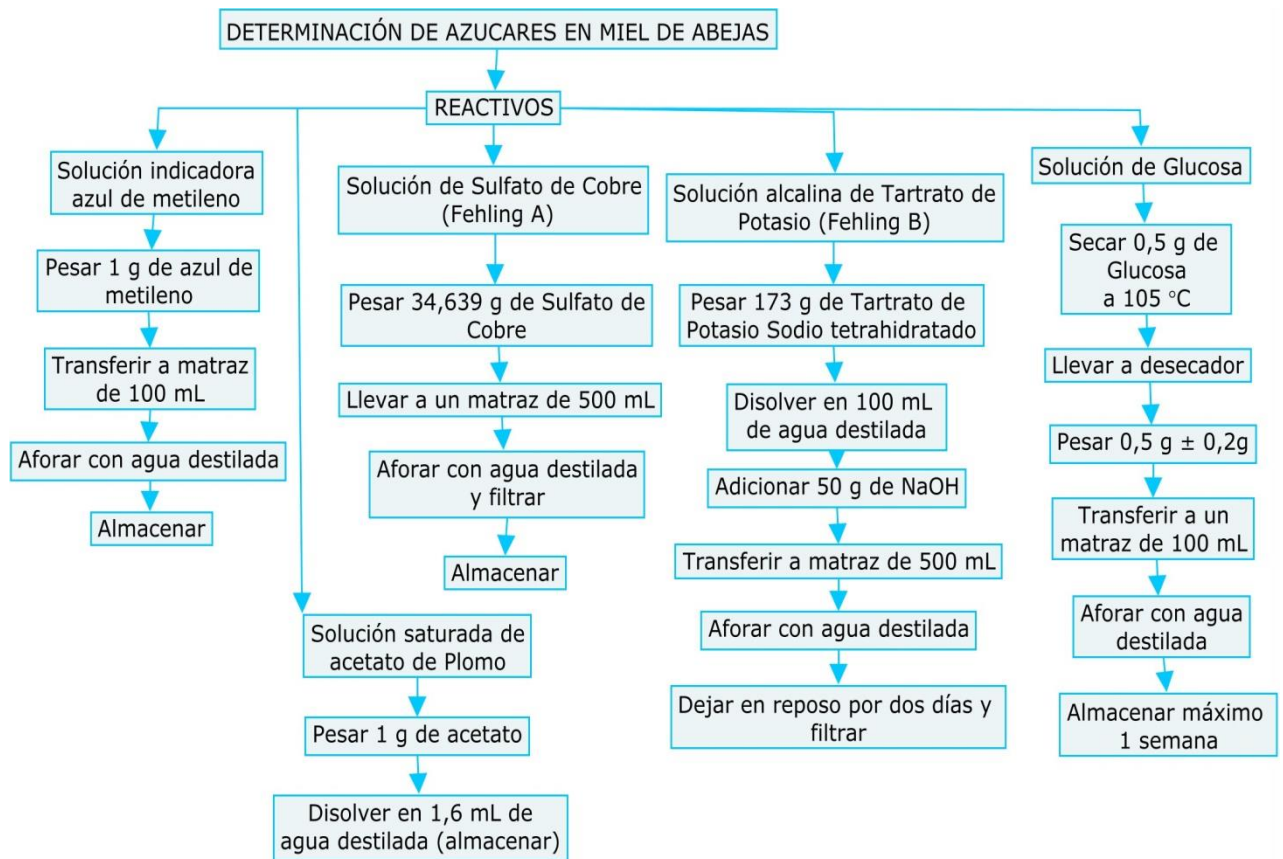


Figura 18. Procedimiento para la preparación de los reactivos necesarios en la determinación de azúcares en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).

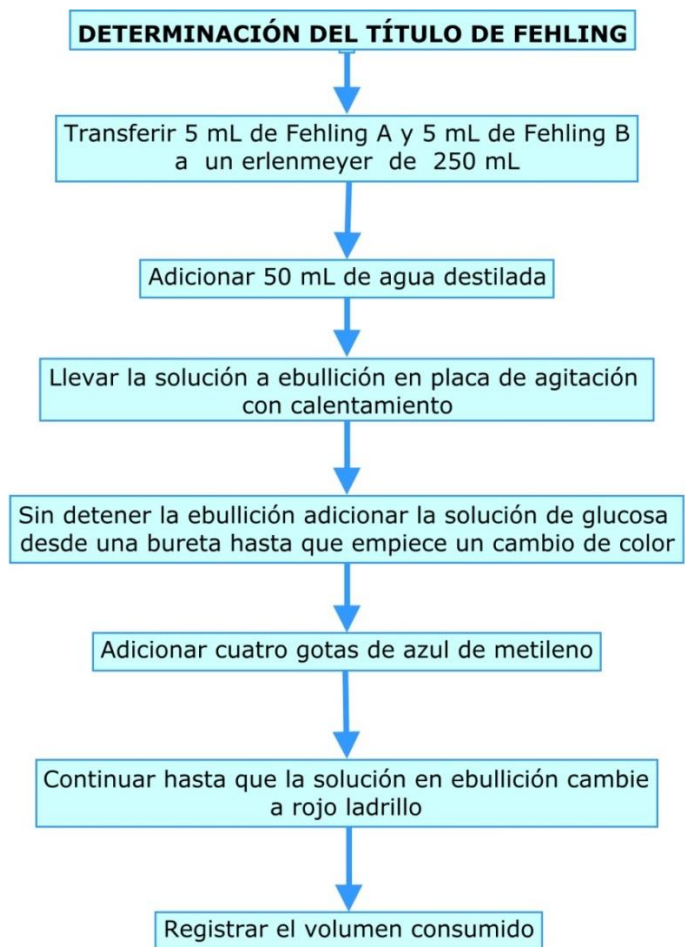


Figura 19. Procedimiento para determinar el título de Fehling (Navarrete, 2013).

### Título de Fehling

$$mg \text{ de glucosa} = \frac{A \times B}{100 \text{ mL de solución de glucosa}}$$

$A = mg \text{ de glucosa (promedio)}$

$B = ml \text{ consumidos de solución de glucosa en la titulación (promedio)}$

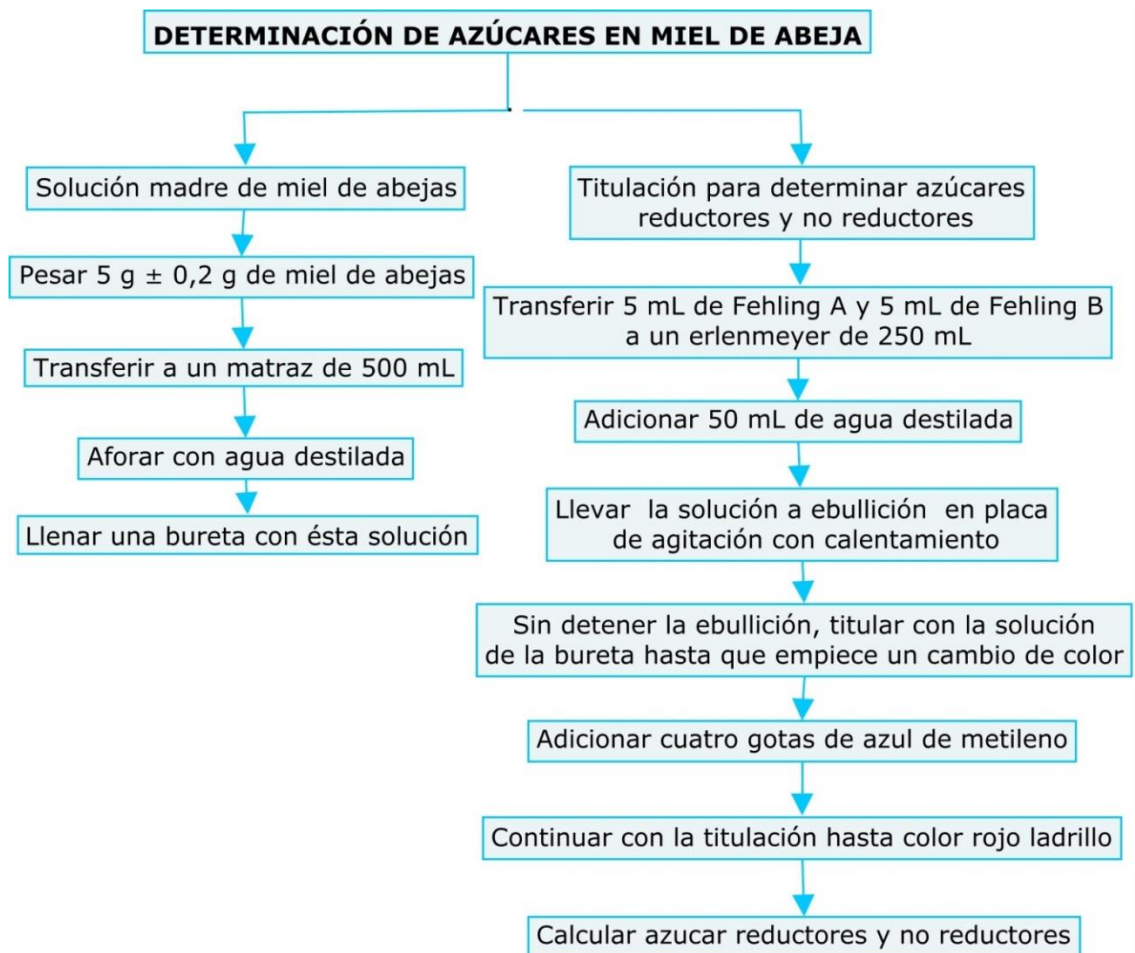


Figura 20. Procedimiento para la determinación de azúcares en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).

### Azúcares reductores

$$\frac{g \text{ de glucosa}}{100 \text{ g o mL de muestra}} = \frac{\text{título de Fehling} \times A \times 100}{B \times C \times 1000}$$

Título de Fehling = mg de glucosa

$A$  = mL de volumen de aforo de la solución madre de miel

$B$  = mL consumidos de la solución madre en la titulación (promedio)

$C$  = g ó mL de muestra tomados para la preparación de la solución madre

### Azúcares no reductores

Azúcares no reductores = (azúcares reductores totales - azúcares reductores) x 0,95

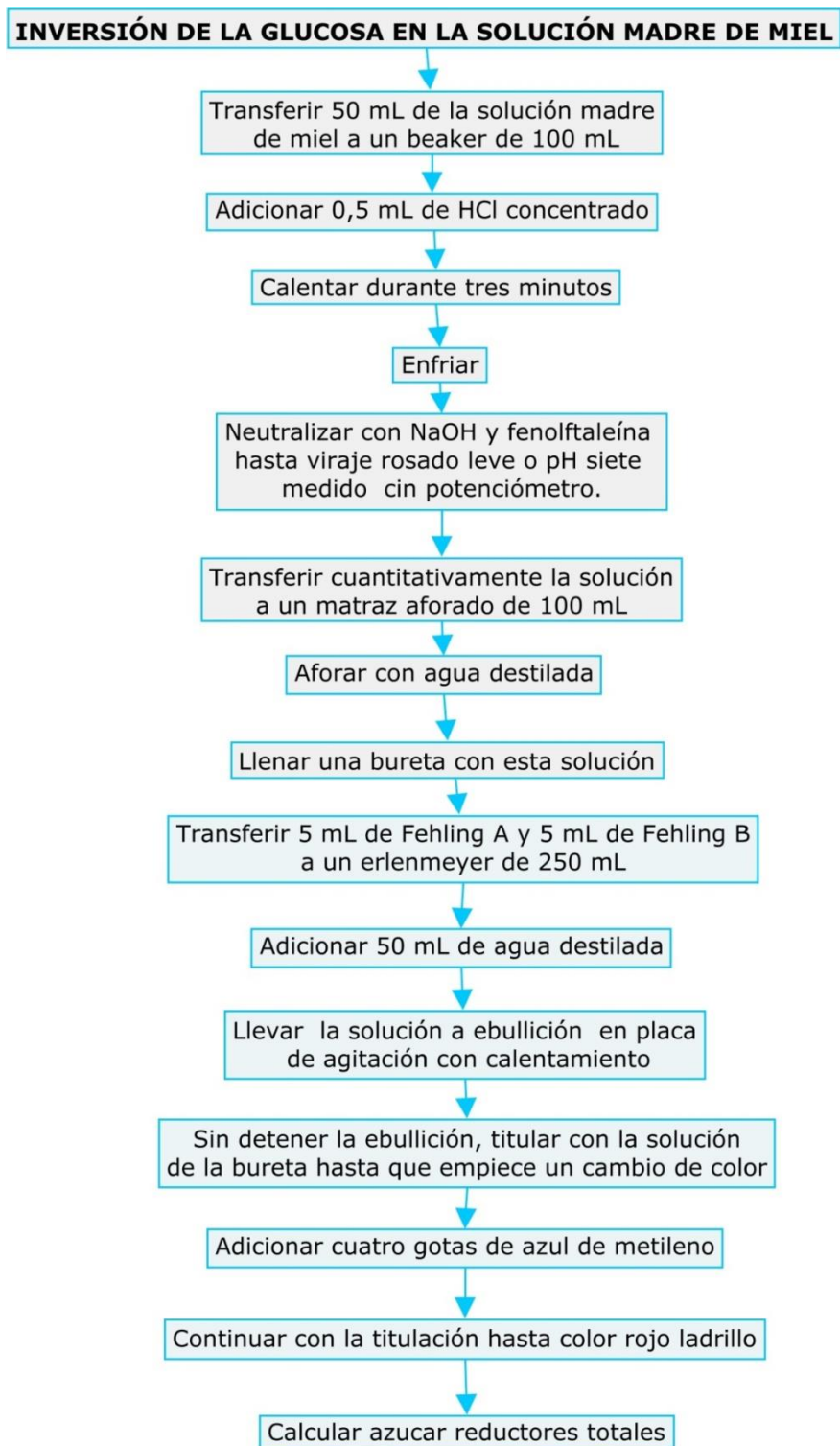


Figura 21. Procedimiento para la determinación de azúcares invertidos en una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).



## Azúcares reductores totales

$$\frac{g \text{ de glucosa}}{100 \text{ g o mL de muestra}} = \frac{\text{título de Fehling} \times A \times FD \times 100}{B \times C \times 1000}$$

Título de Fehling = mg de glucosa

*A* = mL de volumen de aforo de la solución después de la inversión de la glucosa

*B* = mL consumidos de la solución invertida en la titulación (promedio)

*C* = g ó mL de muestra tomados para la preparación de la solución madre

*FD* = factor de dilución para la inversión

### 6.7.8. Determinación de pH

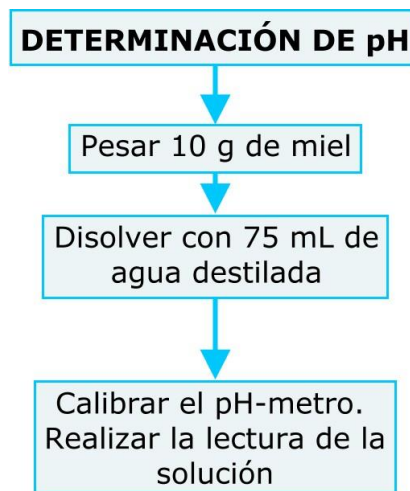


Figura 22. Procedimiento para determinar el pH de una muestra de miel de abejas (Navarrete, 2013).

**Nota:** Registrar la temperatura a la cual se determina el pH.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. LINEALIDAD

Para determinar la linealidad se siguió el procedimiento de la tabla N.

#### 7.1.1. Datos de la curva 1:

- **Concentración de la madre 1:**

**Masa de Hidroximetilfurfural:** 0,09305 g

$$C_m = \frac{0,09305 \text{ g} \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 92,1105 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

- **Concentración real :**

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

**Dónde:**

**V<sub>1</sub>:** Volumen de solución madre (mL)

**V<sub>2</sub>:** Volumen final de solución (mL)

**C<sub>1</sub>:** Concentración real solución madre (mg/L)

**C<sub>2</sub>:** Concentración final de la muestra fortificada (mg/L)

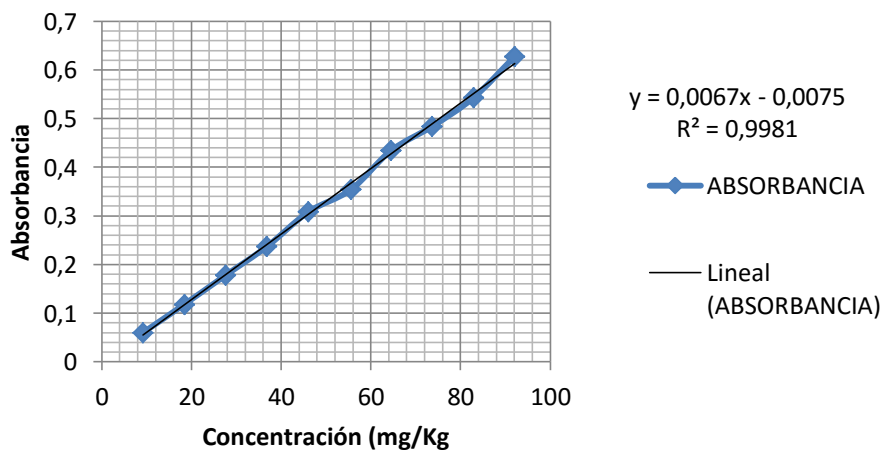
$$C_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 92,1105 \text{ mg/L}}{50 \text{ mL}} = 9,2110 \text{ mg/L}$$

Tabla 9. Patrones de Hidroximetilfurfural para la determinación de la linealidad.

PATRÓN	CONCENTRACIÓN REAL (mg/Kg)	Volumen (mL) de la solución madre *	ABSORBANCIA
1	9,2110	5	0,06
2	18,4221	10	0,118
3	27,6331	15	0,178
4	36,8442	20	0,237
5	46,0552	25	0,308
6	55,5663	30	0,354
7	64,4773	35	0,434
8	73,6884	40	0,484
9	82,8994	45	0,543
10	92,1105	50	0,628

- Se lleva a 50 mL

### Curva de Calibración N° 1



Gráfica 1. Curva de calibración N°1 para la determinación de Hidroximetilfurfural en miel de abeja por el método de la AOAC 980.23.

### 7.1.2. Datos de la curva 2:

- **Concentración de la madre 2:**

**Masa de Hidroximetilfurfural:** 0,0982 g

$$C_m = \frac{0,0982g \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 97.218 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

- **Concentración real:**

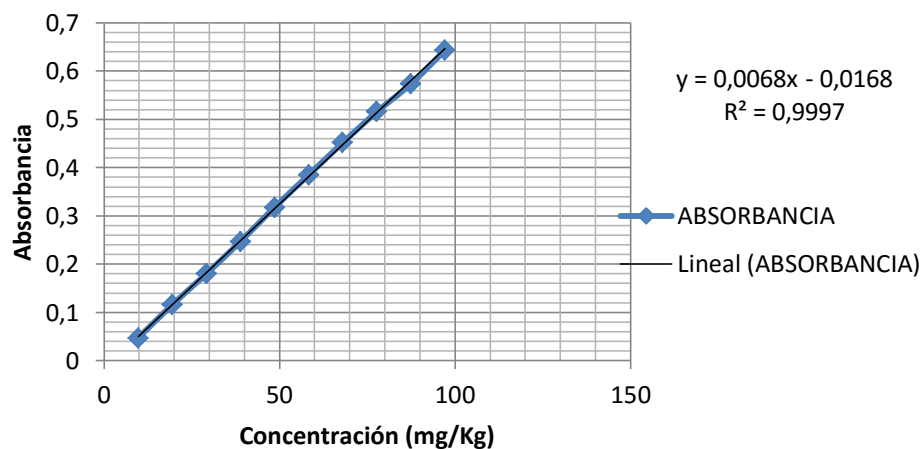
$$C_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 97.218 \text{ mg/L}}{50 \text{ mL}} = 9,7218 \text{ mg/L}$$

Tabla 10. Patrones y absorbancias para la determinación de la linealidad.

PATRÓN	CONCENTRACIÓN REAL (mg/Kg)	Volumen (mL) de la solución madre	ABSORBANCIA
1	9,7218	5	0,047
2	19,4436	10	0,116
3	29,1654	15	0,18
4	38,8872	20	0,247
5	48,609	25	0,318
6	58,3308	30	0,385
7	68,0526	35	0,452
8	77,7744	40	0,516
9	87,4962	45	0,574
10	97,218	50	0,644

- Se lleva a 50 mL

## Curva de calibración N° 2



Gráfica 2. Curva de calibración N°2 para la determinación de Hidroximetilfurfural en miel de abeja por el método de la AOAC 980.23.

### 7.1.3 CONFIRMACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN:

Un mes después de la realización de las dos curvas de calibración anteriores, se realizó una repetición de la curva de calibración; con el objetivo de ratificar esta curva en contextos diferentes, tales como el tiempo, las concentraciones de los patrones empleados y las condiciones ambientales.

La forma de proceder para la realización de ésta tercer curva, fue la misma que se empleó para el desarrollo de las dos curvas preliminares, la única diferencia radicó en que los patrones que se emplearon en esta última curva tenían valores intercalados respecto a los patrones de las curvas anteriores, ya que como se puede observar en las gráficas 1 y 2, estas dos curvas estaban compuestas por diez patrones, cuyas concentraciones comenzaban a partir de 10 ppm y así seguían sucesivamente de 10 en 10 hasta llegar a 100 ppm, mientras que en esta curva de confirmación se emplearon nueve patrones que comenzaban en 15 ppm aproximadamente, y seguían así, aumentando progresivamente en 10 ppm hasta llegar a 95 ppm.

- **Concentración de la solución madre:**

**Masa de Hidroximetilfurfural:** 0,1044 g

$$\text{Concentración de la madre} = \frac{0,1044 \text{ g} \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 103.356 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

**Concentración teórica:**

$$C2 = \frac{V1 \times C1}{V2}$$

**Dónde:**

**V1:** Volumen de solución madre (mL)

**V2:** Volumen final de solución (mL)

**C1:** Concentración real solución madre (mg/L)

**C2:** Concentración final de la muestra fortificada (mg/L)

**Nota:** Los patrones no tienen valores enteros en sus concentraciones, debido a que los volúmenes requeridos para la obtención de concentraciones más fieles, eran de difícil medición, por tal motivo se diluyeron cantidades instrumentalmente más medibles y exactas.

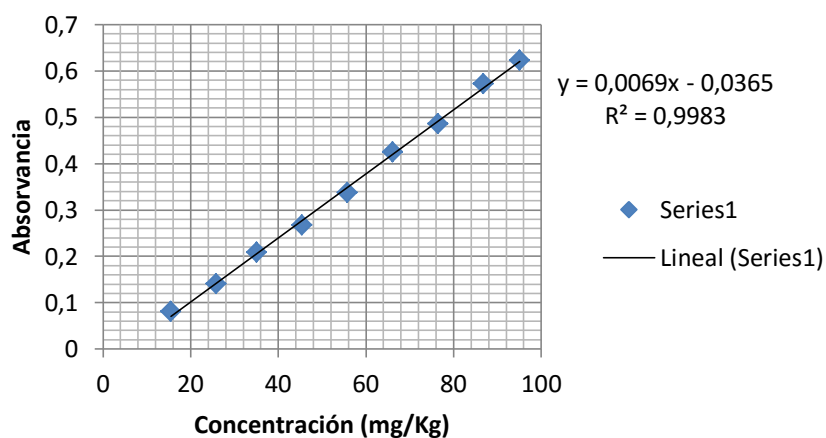
$$\text{Concentración 1} = \frac{7.5 \text{ mL} \times 103.356 \text{ mg/L}}{50 \text{ mL}} = 15.5034 \text{ mg/L}$$

Tabla 11. Datos de las absorbancias y las concentraciones teóricas de los patrones de la curva de comprobación.

PATRÓN	Volumen (mL) de la solución madre	CONCENTRACIÓN TEÓRICA (mg/Kg)	MASAS (g)	ABSORBANCIA
1	7.5	15.5034	5.0064	0.081
2	12.5	25.8390	5.0013	0.141
3	17	35.1410	5.0015	0.208
4	22	45.4766	5.0023	0.267
5	27	55.8120	5.0195	0.337
6	32	66.1478	5.0918	0.425
7	37	76.4834	4.9994	0.486
8	42	86.8190	5.0040	0.562
9	46	95.0875	5.0021	0.623

- Se lleva a 50 mL

### Curva de calibración 3



Gráfica 3. Comprobación de la curva de calibración.

Haciendo uso de la ecuación que arrojó la curva, se determinó la concentración de cada uno de los patrones con el objetivo de realizar una comparación entre los valores de las concentraciones obtenidos a través de la ecuación de la curva y a través de la fórmula que se encuentra en el método de la AOAC 980.23.

**Ecuación de la curva:**

$$Y = 0.006x - 0.036$$

**Dónde:**

Y: la absorbancia de cada patrón arrojada por el equipo.

X: concentración en mg/L de cada patrón.

**Por lo tanto:**

$$X = \frac{Y + 0.036}{0.006}$$

**Patrón 1:**

$$X = \frac{0.081 + 0.036}{0.006} = 19.5 \text{ mg/L}$$

**Ecuación del método 980.23:**

$$\text{Concentración de Hidroximetilfurfural} = \frac{ABS \times 14.97 \times 5}{\text{masa de muestra (aprox. 5g)}} \times 10$$

**Patrón 1:**

$$P1 = \frac{0.081 \times 14.97 \times 5}{5.0064} \times 10 = 12.11 \text{ mg/L}$$



Tabla 12. Relación entre la concentración teórica y la concentración experimental obtenida a partir de la ecuación según el método 980.23 de la AOAC.

Patrón	Concentración teórica (mg/Kg)	Concentración según ecuación del método 980.23 (mg/Kg)	Porcentaje de error (%)
1	15.5034	12.1	21.9
2	25.8390	21.1	18.2
3	35.1410	31.1	11.3
4	45.4766	39.9	12.1
5	55.8120	50.2	10.0
6	66.1478	62.4	5.5
7	76.4834	72.7	4.8
8	86.8190	84.0	2.7
9	95.0875	93.2	1.8
<b>Promedio</b>			<b>9.8</b>

Tabla 13. Relación entre la concentración teórica y la concentración experimental obtenida a partir de la ecuación de la curva de verificación.

Patrón	Concentración teórica (mg/Kg)	Concentración según ecuación de la curva (mg/Kg)	Porcentaje de error (%)
1	15.5	19.5	25.8
2	25.8	29.5	15.5
3	35.1	40.6	15.6
4	45.4	50.5	11.2
5	55.8	62.1	11.2
6	66.1	76.8	16.1
7	76.4	87.0	13.8
8	86.8	99.6	14.7
9	95.0	109.8	15.5
<b>Promedio</b>			<b>15.4</b>

## 7.2 SELELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

7.2.1. Para determinar la selectividad se tomó una muestra de miel por duplicado y se les halló su contenido de HMF. Posteriormente se preparó una solución madre con el patrón de HMF; ésta solución quedó con una concentración aproximada de 40 ppm; todo esto se hizo con el objetivo de fortificar cada una de la muestras de miel con cierta cantidad de la solución madre y de esta manera determinar la selectividad/ especificidad de este método.

### 7.2.2. Cálculos y resultados:

- **Concentración teórica de la madre:**

**Masa de Hidroximetilfurfural:** 0,04009 g

$$C_m = \frac{0,04009 \text{ g} \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 40,09 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Para poder tener mayor seguridad sobre la concentración real de la solución madre, se hizo una determinación espectrofotométrica del contenido real de HMF en la solución, utilizándose la ecuación de determinación de HMF del método de la AOAC 980.23, obteniéndose los siguientes resultados.

- **Concentración experimental de la solución madre:**

**Absorbancia de la solución madre:** 0,256

**Masa medida de la solución madre:** 5,0444 g

$$C_m = \frac{0,03879 \text{ g} \times 14,97 \times 5}{5,0444 \text{ g}} \times 10 = 37,99 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

En ésta etapa se mezclaron aproximadamente 5 g de miel pura y 5 g de solución madre para poder de esta manera aumentar la concentración de HMF en la muestra de miel, obteniéndose así una miel fortificada.

Tabla 14. Concentración ponderada de la muestra de miel fortificada.

Masa de la solución madre (g)	Masa de miel (g)	Absorbancia	Concentración (mg/Kg)
5,0108	5,0102	0,386	57,66
5,0040	5,0061	0,389	58,16
—	—	<b>Promedio de la concentración de HMF en miel fortificada</b>	57,91

Tabla 15. Concentración de Hidroximetilfurfural en miel sin fortificar.

Masa de miel (g)	Absorbancia	Concentración (mg/Kg)
5,0659	0,108	15,96
5,0740	0,116	17,11
—	<b>Promedio de la concentración de HMF en miel NO fortificada</b>	16,53

Ecuación para la determinación del porcentaje de recuperación:

$$\%RECUPERACIÓN = \frac{C1 - C2}{C3}$$

Dónde:

**C1:** Promedio de la concentración determinada en la muestra fortificada.

**C2:** Promedio de la concentración determinada en la muestra no fortificada.

**C3:** concentración de fortificación.

$$\%R = \frac{57,91 \frac{mg}{Kg} - 16,53mg/Kg}{37,99 mg/Kg} \times 100 = 108,92 \%$$

### 7.3. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN

**7.3.1** El procedimiento experimental para la determinación del límite de cuantificación y límite de detección fue el mismo, lo que cambia, son las ecuaciones que se utilizaron para determinar cada parámetro.

Para hacer las determinaciones cuantitativas se tomaron 10 réplicas de una solución madre de 10 ppm aproximadamente; preparada a partir de un patrón de HMF. A cada una de estas réplicas se les realizó el mismo pretratamiento; el cual está dictado por el método 980.23 de la AOAC para la determinación de HMF (Hidroximetilfurfural) en miel.

#### 7.3.2 Cálculos y resultados:

Tabla 16. Absorbancia y concentración de los patrones de hidroximetilfurfural.

NÚMERO	MASA (g)	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN REAL (mg/Kg)
1	5,0045	0,042	6,2817
2	5,0459	0,051	7,5652
3	5,0121	0,051	7,6162
4	5,0159	0,053	7,9089
5	5,0477	0,053	7,8591
6	5,0438	0,053	7,8652
7	5,0311	0,057	8,4801
8	5,0272	0,053	7,8911
9	5,5098	0,056	7,6053
10	5,0042	0,045	6,7308
<b>PROMEDIO</b>		<b>0,051</b>	<b>7,5803</b>

- **Concentración del patrón 1:**

$$C1: \frac{0,042 \times 14,97 \times 5}{5,0045 \text{ g}} \times 10 = 6,2817 \text{ ppm}$$

- **Masa de Hidroximetilfurfural en solución madre: 0,00872 g**

$$Cm = \frac{0,00872 \text{ g} \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 8,6328 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

- Ecuación para la desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$S = 0,6309$$

- **LÍMITE DE DETECCIÓN:**

$$LD = B + 3,3 S_B$$

**B:** valor promedio de los resultados obtenidos.

**S<sub>B</sub>:** valor de la desviación estándar.

$$LD = 7,5803 + 3,3 (0,6309) = 9,6626 \text{ mg/Kg}$$

- **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC):**

$$LC = B + (5,6 \text{ o } 10) * S_B$$

**B:** valor promedio de los resultados obtenidos

**(5,6 o 10):** número de muestras analizadas.

**S<sub>B</sub>:** valor de la desviación estándar.

$$LC = 7,5803 + (10 \times 0,6309) = 13,8901 \text{ mg/Kg}$$

- **PRECISIÓN:**

**Desviación estándar relativa (coeficiente de variación %CV):**

$$RSD = (S/X) \times 100$$

$$RDS = \frac{0,6309}{7,5803} \times 100 = 8,32 \%$$

- **EXACTITUD:**

$$\%e = \frac{|xi - \bar{X}|}{xi} \times 100$$

La veracidad del método se aplicó a los resultados obtenidos en repetibilidad y reproducibilidad y observándose en las tablas de cálculos de los resultados de cada una de las analistas.

## 7.4. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

7.4.1. Para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad se siguió el procedimiento establecido en la tabla 7.

A través de la medición de la repetibilidad y la reproducibilidad se pretende determinar los parámetros de exactitud y precisión del método.

### 7.4.2. Cálculos y resultados:

- **Soluciones madre:**

✓ **Madre 1:** se pesó 0,0872 g del patrón de Hidroximetilfurfural y diluyéndolo en 1 L de agua destilada.

$$Cm = \frac{0,0872g \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 86,328 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

✓ **Madre 2:** se pesó 0,0456 g del patrón de Hidroximetilfurfural y diluyéndolo en 1 L de agua destilada.

$$Cm = \frac{0,0456g \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 45,144 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

✓ **Madre 3:** se pesó 0,0109 g del patrón de Hidroximetilfurfural y diluyéndolo en 2 L de agua destilada.

$$Cm = \frac{0,0109g \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 5,3955 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Los resultados arrojados por el analista A para la determinación de la repetibilidad fueron tomados en cuenta también para la determinación de la reproducibilidad.

➤ **DIA 1:**

**Tabla 17. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 1.**

<b>N° solución madre</b>	<b>N° Repetición</b>	<b>Absorbancia Solución madre</b>	<b>Concentración experimental (mg/Kg)</b>	<b>Concentración Teórica (mg/Kg)</b>
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,036	5,3820	5,3955
	2	0,037	5,5122	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,293	43,8366	45,1440
	2	0,289	42,5476	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,517	77,0313	86,3281
	2	0,521	77,8116	

**Tabla 18. Cálculos de los resultados de de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 1.**

<b>N° solución madre</b>	<b>Concentración experimental (mg/Kg)</b>	<b>S</b>	<b>%CV</b>	<b>%E</b>	<b>Concentración Teórica (mg/Kg)</b>
<b>1</b>	5,4471	0,0920	1,68%	0,95%	5,3955
<b>2</b>	43,1921	0,0911	0,21%	4,32%	45,1440
<b>3</b>	77,4214	0,0551	0,071%	10,31%	86,3281



Tabla 19. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 1.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,042	5,8350	5,3955
	2	0,037	5,4993	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,298	44,4650	45,1440
	2	0,288	43,0352	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,551	82,1511	86,3281
	2	0,563	83,6919	

Tabla 20. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 1.

N° solución madre	Concentración experimental (mg/Kg)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	5,6671	0,2373	4.1873%	5.00%	5,3955
<b>2</b>	43,7501	1.0110	2.3108%	3,08%	45,1440
<b>3</b>	82.9215	1.0895	1.3108%	3.94%	86,3281

➤ **DIA 2:**

**Tabla 21. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 2.**

<b>N° solución madre</b>	<b>N° repetición</b>	<b>Absorbancia Solución Madre</b>	<b>Concentración experimental (mg/Kg)</b>	<b>Concentración Teórica (mg/Kg)</b>
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,034	5,0491	5,3955
	2	0,033	4,9196	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,293	43,6751	45,1440
	2	0,297	44,3889	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,569	84,9313	86,3281
	2	0,561	83,8107	

**Tabla 22. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 2.**

<b>N° solución madre</b>	<b>Concentración experimental (mg/Kg)</b>	<b>S</b>	<b>%CV</b>	<b>%E</b>	<b>Concentración Teórica (mg/Kg)</b>
<b>1</b>	4.9844	0,0916	1.84%	7.62%	5,3955
<b>2</b>	44.0320	0,5048	1.15%	2.46%	45,1440
<b>3</b>	84.3710	0.7924	0.94%	2.27%	86,3281

Tabla 23. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 2.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (ALTA)</b>	1	0,033	4,9399	5,3955
	2	0,031	4,6033	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,293	43,2829	45,1440
	2	0,287	42,5174	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,552	82,4974	86,3281
	2	0,551	81,2817	

Tabla 24. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 2.

N° solución madre	Concentración experimental (mg/Kg)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	4.7716	0,2380	4.98%	11.56%	5,3955
<b>2</b>	42.9001	0,5412	1.26%	4,97%	45,1440
<b>3</b>	81.8895	0.8596	1.05%	5.14%	86,3281

➤ **DÍA 3:**

Tabla 25. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 3.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,039	5,5873	5,3955
	2	0,034	5,0444	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,288	43,0326	45,1440
	2	0,292	43,5720	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,542	80,7948	86,3281
	2	0,554	82,7682	

Tabla 26. Cálculo de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 3.

N° solución madre	Concentración experimental (mg/Kg)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	5.3155	0,383	7.20%	7.62%	5,3955
<b>2</b>	43.3023	0,381	0.87%	2.46%	45,1440
<b>3</b>	81.7815	1.395	1.70%	2.27%	86,3281

En la tarde del tercer día, se pudo observar mediante análisis espectroscópicos que la concentración de las tres soluciones patrón que se venían analizando, cambiaron su concentración, notándose una evidente descomposición de las mismas, por este motivo y para evitar cambios bruscos en el resultado de la exactitud del procedimiento, se optó por volver a preparar tres soluciones patrón de concentraciones similares a las anteriores (alta, media y baja).

- **Soluciones madre:**

✓ **Madre 1 (alta):** se pesó 0,0737 g del patrón de Hidroximetilfurfural y diluyéndolo en 1 L de agua destilada.

$$Cm = \frac{0,0737g \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 73.0220 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

✓ **Madre 2 (media):** se pesó 0,0385 g del patrón de Hidroximetilfurfural y diluyéndolo en 1 L de agua destilada.

$$Cm = \frac{0,0385 \text{ g} \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 38,1940 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

✓ **Madre 3 (baja):** se preparó pesando 0,0044 g del patrón de Hidroximetilfurfural y diluyéndolo en 2 L de agua destilada.

$$Cm = \frac{0,0044g \times 0,99 \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}}{1 \text{ L}} = 4.4056 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Tabla 27. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 3.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,027	4,0271	4,4056
	2	0,025	4,7212	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,244	36,1701	38,1940
	2	0,252	37,4316	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,468	69,4360	73.0220
	2	0,469	69,9393	

Tabla 28. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 3.

N° solución madre	Concentración experimental (ppm)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	4.3742	0,4908	11.22%	2.98%	4.4056
<b>2</b>	36.8008	0,8920	1.03%	3.64%	38,1940
<b>3</b>	69.6876	0.3560	2.00%	4.56%	73.0220

➤ **DÍA 4:**

**Tabla 29. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 4.**

<b>N° solución madre</b>	<b>N° repetición</b>	<b>Absorbancia Solución Madre</b>	<b>Concentración experimental (mg/Kg)</b>	<b>Concentración Teórica (mg/Kg)</b>
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,028	4,1830	4.6056
	2	0,028	4,1651	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,248	36,9078	40.1940
	2	0,252	37,6453	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,477	70,9346	76,0220
	2	0.485	72.7100	

**Tabla 30. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 4.**

<b>N° solución madre</b>	<b>Concentración experimental (mg/Kg)</b>	<b>S</b>	<b>%CV</b>	<b>%E</b>	<b>Concentración Teórica (mg/Kg)</b>
<b>1</b>	4.1740	0,012	0.29%	5.26%	4.4056
<b>2</b>	37.2765	0,521	1.40%	2.40%	38,1940
<b>3</b>	71.8223	1.255	1.75%	1.64%	73.0220

Tabla 31. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 4.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,027	4,0101	4.4056
	2	0,030	4,4851	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,247	36,8675	38.1940
	2	0,246	36,2991	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,465	68,8844	73.0220
	2	0,468	69,8946	

Tabla 32. . Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 4.

N° solución madre	Concentración experimental (mg/Kg)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	4.2476	0.3358	7.90%	3.59%	4.4056
<b>2</b>	36.5833	0.4019	1.10%	4.22%	38,1940
<b>3</b>	69.3895	0.7143	1.03%	4.97%	73.0220



➤ **DÍA 5:**

Tabla 33. Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 5.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,024	4.5830	4.4056
	2	0,023	4.4356	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,229	34.2030	38.1940
	2	0,237	35.4456	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,458	69.5240	73.0220
	2	0,466	69.1842	

Tabla 34. Cálculo de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 5.

N° solución madre	Concentración experimental (mg/Kg)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	4.5093	0.1042	2.97%	2.19%	4.4056
<b>2</b>	36.8243	0.8787	2.52%	3.59%	38,1940
<b>3</b>	69.6541	0.4875	0.70%	4.61%	73.0220

Tabla 35. . Resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista B en el día 5.

N° solución madre	N° repetición	Absorbancia Solución Madre	Concentración experimental (mg/Kg)	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1 (BAJA)</b>	1	0,023	4,4310	4.4056
	2	0,023	4,4353	
<b>2 (MEDIA)</b>	1	0,229	34,2586	38.1940
	2	0,237	35,3424	
<b>3 (ALTA)</b>	1	0,439	69,6880	73.0220
	2	0,452	70,4122	

Tabla 36. Cálculos de los resultados de la determinación de la concentración de hidroximetilfurfural por el analista A en el día 5.

N° solución madre	Concentración experimental (mg/Kg)	S	%CV	%E	Concentración Teórica (mg/Kg)
<b>1</b>	4.4331	0.0030	0.067%	0.62%	4.4056
<b>2</b>	34.8005	0.7663	2.20%	8.88%	38,1940
<b>3</b>	70.0501	0.5120	0.73%	4.07%	73.0220

## 7.5. ROBUSTEZ

Cuando se llegó a la determinación de este parámetro, se comenzó a trabajar con una miel que tenía una concentración de Hidroximetilfurfural distinta, ya que ésta provenía de un lote de miel diferente.

La concentración de Hidroximetilfurfural en esta nueva miel era de: 98,7895 (mg/Kg).

**7.5.1.** Según la bibliografía los factores que pueden generar cambios en la concentración de HMF presente en la miel, son el aumento de la humedad, la acidez y la temperatura, por este motivo para llevar a cabo la determinación del parámetro de robustez, se sometió la miel a distintas condiciones para poder originar modificaciones en las variables que podían generar un efecto significativo en el desempeño del método.

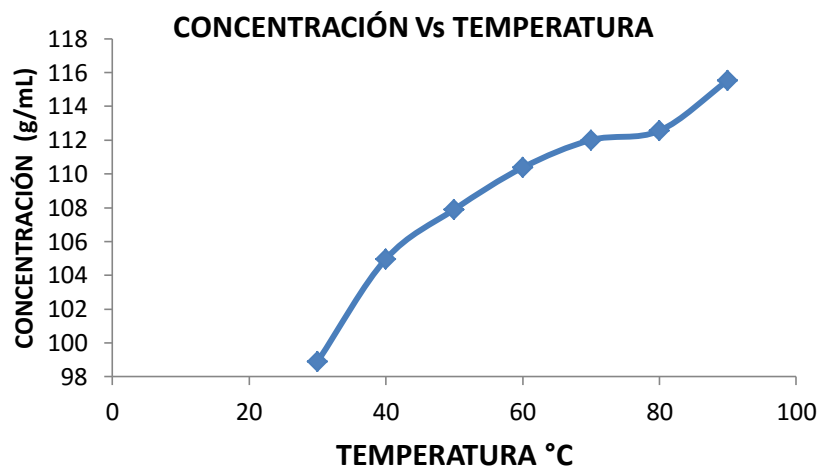
Para poder determinar la robustez, es fundamental la determinación del análisis de varianza de los resultados, los cuales se hicieron a través de la herramienta de Excel ANOVA, la cual es utilizada para aislar y estimar las varianzas que contribuyan al error total de un experimento, para analizar si hay o no varianzas entre los lotes de análisis.

**7.5.1.1.** *Sometimiento de la miel a siete temperaturas diferentes para observar cambios en la concentración de Hidroximetilfurfural presente en la miel.*

Siguiendo la metodología consignada en la tabla 7, se obtuvieron los siguientes resultados (este análisis se realizó por duplicado):

**Tabla 37. Resultados de dos repeticiones del calentamiento de la miel a siete temperaturas diferentes para lograr una modificación en el aumento del contenido de Hidroximetilfurfural.**

TEMPERATURA °C	CONCENTRACIÓN (1) (mg/Kg)	CONCENTRACIÓN (2) (mg/Kg)	PROMEDIO
30	99,678	98,118	98,898
40	104,692	105,245	104,968
50	107,130	108,675	107,902
60	110,770	109,987	110,378
70	111,995	112,023	112,009
80	112,095	113,021	112,558
90	115,051	116,015	115,5333



Gráfica 4. Promedio del aumento en la concentración del Hidroximetilfurfural con respecto a la temperatura.

### 7.5.1.2. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) a partir de los datos de la TABLA 38.

Tabla 38 Análisis de varianza de un factor ANOVA, temperatura en Hidroximetilfurfural..

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	2	197,796	98,898	1,2168
Columna 2	2	209,937	104,9685	0,1529045
Columna 3	2	215,805	107,9025	1,1935125
Columna 4	2	220,757	110,3785	0,3065445
Columna 5	2	224,018	112,009	0,000392
Columna 6	2	225,116	112,558	0,428738
Columna 7	2	231,066	115,533	0,464648

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	371,44161	6	61,906935	115,143881	1,23E-06	3,865968853
Dentro de los grupos	3,7635395	7	0,5376485			
Total	375,2051495	13				

### 7.5.1.3 HUMEDAD

Siguiendo la metodología consignada en la tabla 7, se obtuvieron los siguientes resultados (este análisis se realizó por duplicado):

**Tabla 39. Datos y resultados obtenidos para la observación del efecto de la humedad en la concentración del Hidroximetilfurfural en miel de abejas.**

#	Masa de agua Adicionada (g)	Concentración de agua (%)	Promedio de humedad (%)	masa de la solución (g)	absorbancia	Concentración Experimental (mg/Kg)	Promedio (mg/Kg)
1a	1,2623	25,20	25,54	5,0090	0,454	67,7740	67,3808
1b	1,2987	25,89		5,0145	0,448	66,9876	
2a	1,0219	20,37	20,13	5,0108	0,519	77,2373	77,6643
2b	1,0024	19,90		5,0365	0,526	78,0913	
3a	0,7614	15,16	13,55	5,0203	0,559	83,5402	83,2762
3b	0,6014	11,94		5,0354	0,558	83,0123	

**7.5.1.4. Análisis de varianza de un factor (ANOVA) a partir de los datos de la TABLA 40.**

**Tabla 40. Análisis de varianza de un factor ANOVA, humedad en Hidroximetilfurfural.**

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Columna 1	2	134,7616	67,3808	0,30921248		
Columna 2	2	155,3286	77,6643	0,364658		
Columna 3	2	166,5525	83,27625	0,1393392		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	259,939791	2	129,969895	479,470047	0,00017416	9,552094496
Dentro de los grupos	0,81320969	3	0,2710699			
Total	260,753	5				

**7.5.1.4. Acidez**

Siguiendo la metodología consignada en la tabla 7, se obtuvieron los siguientes resultados (este análisis se realizó por duplicado):

**Tabla 41. Datos de miel de abejas con la variable acidez sin fortificar.**

<b>Masa miel de abejas (g)</b>	<b>Acidez inicial(ppm)</b>	<b>absorbancia</b>	<b>Concentración de HMF inicial (mg/Kg)</b>
<b>5,0763</b>	57.12	0,265	3,90
<b>5,0138</b>	55,84	0,262	3,99
<b>5,0300</b>	57,64	0,263	3,91

**Tabla 42. Datos miel de abejas con la variable acidez fortificada.**

<b>Masas miel de Abejas (g)</b>	<b>Acidez con fortificación (ppm)</b>	<b>absorbancia</b>	<b>Concentración de HMF final (mg/Kg)</b>
<b>5,0703</b>	254.12	-0,001	-0,14
<b>5,0459</b>	255.29	-0,017	-2,52
<b>5,0176</b>	256.42	-0,043	-6,41

## 7.6. RESULTADOS BROMATOLÓGICOS

**7.6.1.** De acuerdo a la resolución 1057 del 2010 del ministerio de la protección social, la cual establece los requisitos que debe cumplir la miel de abejas para ser comercializada en el país, se realizaron los análisis fisicoquímicos generales que se le realizan a la miel y además también los exigidos por dicha resolución, entre los cuales se encuentran:

- Cenizas
- Humedad
- Acidez
- pH
- Sólidos solubles
- Sólidos Insolubles
- Contenido aparente de azúcar reductor
- Contenido de sacarosa
- Azúcares reductores
- Conductividad eléctrica
- Metales pesados

La determinación de estos parámetros se hizo con el objetivo de controlar que la miel de estudio fuera la adecuada para llevar a cabo la validación, y además observar la relación posible entre los parámetros fisicoquímicos y el contenido de HMF (Hidroximetilfurfural) presente en la miel de abejas analizada.

## 7.6.2 RESULTADOS:

Tabla 43. Resultados de análisis bromatológicos.

PARÁMETROS	RESULTADOS	VALORES PERMSIIBLES
CONDUCTIVIDAD	0.365 mS/cm	≤ 0.6 mS/cm
HUMEDAD	19%	≤ 20 % ≤ 21 % para mieles tropicales
SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA	0.1318%	≤ 0.1 para miel diferente a la prensada ≤ 0.5 para miel prensada
pH	3.95	N.E
CONTENIDO DE SACAROSA	1.46 %	≤ 5 % ≤ 10% para mieles de origen tropical
CONTENIDO DE SUSTANCIAS MINERALES (CENIZAS)	0.0715 %	≤ 0.5 %
AZÚCARES REDUCTOR (calculado como azúcar invertido)	39,5976 %	≥ 45 % (miel de mielato) ≥ 60% (miel floral)
ACIDÉZ LIBRE	44.067 meq/Kg	≤ 50 meq/Kg
CONTENIDO DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	105.90 ppm	≤ 40 mg/Kg ≤ 60 mg/Kg para mieles de origen tropical
SÓLIDOS SOLUBLES	77.9 ° Brix	N.E

- N.E: No Especifica

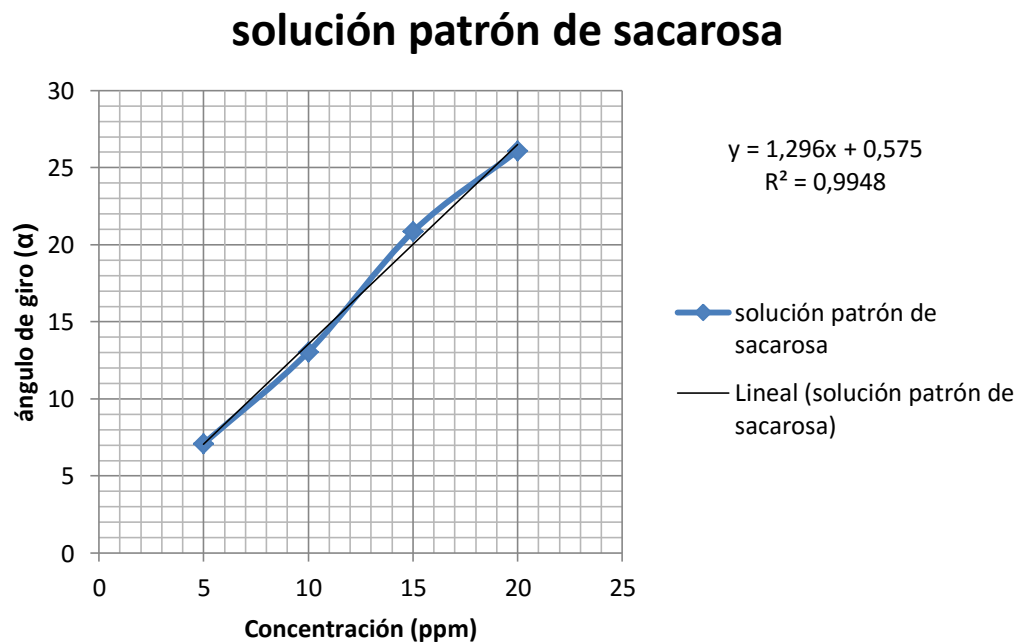


### 7.6.3 CÁLCULOS Y RESULTADOS:

#### 7.6.3.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO APARENTE DE SACAROSA:

Tabla 44. Relación concentración Vs ángulo de giro de soluciones patrón para la determinación del contenido de sacarosa en miel.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁNGULO DE GIRO ( $\alpha$ )
5	7,1
10	13,05
15	20,85
20	26,1



Gráfica 5. Concentración versus ángulo de giro de soluciones patrón de sacarosa.

### 7.6.3.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS:

Para llevar a cabo la determinación del contenido de cenizas en la miel de abejas se llevó a cabo el procedimiento de la figura 15.

Tabla 45. Resultados de la determinación del contenido de cenizas en miel de abejas.

	Masa miel de abejas (g)	Masa crisol vacío con tapa (g)	Masa crisol con cenizas y tapa (g)	Contenido de cenizas (%)
Contenido de cenizas crisol 1	1,2383	45,4411	45,4431	0,16
Contenido de cenizas crisol 2	1,2701	41,7029	41,7036	0,055
<b>Promedio del contenido de cenizas (%)</b>				<b>0,1075</b>

### 7.6.3.3 DETERMINACIÓN DE ACIDÉZ LIBRE:

Para llevar a cabo la determinación del contenido de acidez libre en miel de abejas se siguió el procedimiento de la figura 17, por triplicado.

Tabla 46. Resultados de la valoración de la acidez en la miel.

NÚMERO DE ENSAYO	MASA DE ANALITO	VOLUMEN DE NaOH CONSUMIDO	Concentración de acidez ( $\frac{meq}{Kg}$ )
1	5.0110 g	2.25 mL	45.23
2	5.0112 g	2.20 mL	44.22
3	5.0661 g	2.15 mL	42.75
<b>Promedio de la concentración de acidez</b>			<b>44.067</b>

#### 7.6.3.4 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD:

Para poder realizar la determinación del contenido de humedad en la miel se siguió el procedimiento establecido en la figura 14. La lectura en el refractómetro se realizó por triplicado.

Tabla 47. Resultados del índice de refracción de la miel de abejas.

	INDICE DE REFRACCIÓN ( $\alpha$ ) a 22.5 °C	INDICE DE REFRACCIÓN ( $\alpha$ ) a 20°C	HUMEDAD (%)
ENSAYO 1	1.4895	1,4897	18,72
ENSAYO 2	1.4855	1,4857	20,44
ENSAYO 3	1.4890	1,4892	18,92
PROMEDIO	<b>1.4880</b>	<b>1.4882</b>	<b>19,36</b>

#### 7.6.3.5 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA:

Esta determinación se realizó siguiendo la metodología del numeral 6.7.9.

$$\% \text{ de sólidos insolubles en agua} = \mathbf{0.1318\%}$$

#### 7.6.3.6 DETERMINACIÓN DE CONDUCTIVIDAD:

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de la figura 16.

El resultado arrojado por el conductímetro para la muestra de miel de abejas fue: 0.365 mS/cm.

#### 7.6.3.7 DETERMINACIÓN DE pH:

Para realizar ésta determinación se siguió el procedimiento de la figura 22.

El valor de pH de en la miel de abejas fue: 3.95

#### 7.6.3.8 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES:

Se empleó un refractómetro de ABBE calibrado y se realizó el mismo procedimiento que el empleado para determinar el contenido de Humedad. Se dejó caer sobre los prismas unas gotas de miel y se determinó el porcentaje de sólidos solubles en la escala de los grados Brix.

Resultado de los ° Brix: 77.9

### 7.6.3.9 DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL:

El procedimiento y los cálculos que se llevaron a cabo para la determinación de Hidroximetilfurfural en la miel que se designó para que se llevaran a cabo los análisis bromatológicos han sido exactamente los mismos que se han mencionado en todo el transcurso del documento. El análisis se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 48. Resultados de los ensayos de la determinación de HMF para bromatología.

ENSAYO	MASA DE MUESTRA (g)	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN DE HMF (mg/Kg)
1	5,0146	0,708	105,680
2	5,0348	0,717	106,593
3	5,0606	0,713	105,457
<b>PROMEDIO</b>	5,03666667	0,71266667	105,91

### 7.6.3.10 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES:

El procedimiento llevado a cabo para la determinación de azúcares reductores se encuentra en el numeral 6.7.7. A continuación se muestran los resultados obtenidos al realizar cada una de las titulaciones por triplicado.

**Masa de miel para la solución patrón = 5,1465 g**

Tabla 49. Título de Fehling.

ENSAYO	masa de glucosa (g)	Volumen (mL) consumido de solución de glucosa
1	0,5095	10,2
2	0,5060	10,3
3	0,5071	10,5
<b>PROMEDIO</b>	0,5075	10,3333

Tabla 50. Azúcares reductores.

ENSAYO	Volumen (mL) consumido de solución madre de miel
1	11,75
2	13,15
3	13,7
<b>Promedio</b>	<b>12,8666</b>

Tabla 51. Azúcares reductores totales.

ENSAYO	Volumen (ml) consumido de solución madre de miel
1	17,15
2	17,8
3	17,3
<b>Promedio</b>	<b>17,4166</b>

Las concentraciones de azúcares en la miel de abejas fueron:

#### Título de Fehling

$$mg \text{ de glucosa} = 52,4415 \text{ mg}$$

#### Azúcares reductores

$$Azúcares \text{ reductores} = 39,5976 \frac{g \text{ de glucosa}}{100 \text{ g de miel}}$$

#### Azúcares reductores totales

$$Azúcares \text{ reductores totales} = 58,5059 \frac{g \text{ de glucosa}}{100 \text{ g de miel}}$$

#### Azúcares no reductores

$$Azúcares \text{ no reductores} = 17,9628 \frac{g \text{ de sacarosa}}{100 \text{ g o mL de muestra}}$$

### 7.6.3.11 DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS:

Mediante el procedimiento descrito en el numeral 6.7.4. utilizando el método de espectroscopia de absorción atómica se realizó por duplicado la determinación de los siguientes metales: K, Ca, Na, Fe, Zn, Mg, Mn, y Cu presentes en la muestra de miel de estudio, y se obtuvieron los siguientes resultados.

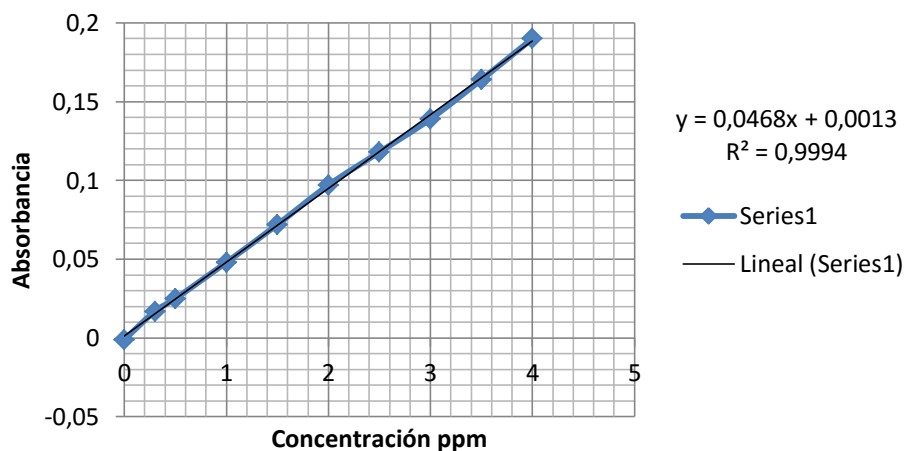
Para cada metal se realizó una curva de calibración, por el método de espectroscopia de absorción atómica, como ejemplo se reporta los resultados para la curva de calibración del Cu:

#### Determinación de Cu:

Tabla 52. Reporte resultados de la determinación de Cobre en la muestra de miel de abejas.

Curva de Cu		
Muestra	Señal	Concentración (mg/L)
Blanco	-0,001	0
1	0,009	0,1
2	0,017	0,3
3	0,025	0,5
4	0,048	1
5	0,072	1,5
6	0,097	2
7	0,118	2,5
8	0,139	3
9	0,164	3,5
10	0,19	4

## Curva de calibración de Cu



Gráfica 6. Curva de calibración para el análisis de Cobre.

### 7.6.3.11.1. Concentración de Cobre:

Tabla 53. Reporte de la concentración de Cobre en la muestra de miel de abejas.

muestra	concentración (mg/L)
Miel 1	0
Miel 2	0
Promedio	Ausencia de Cu

### 7.6.3.11.2. Concentración de Potasio:

Tabla 54. Reporte de la concentración de Potasio en la muestra de miel de abejas.

muestra	concentración (mg/L)
miel 1	4,5086
miel 2	3,7237
Promedio	4,11615

### 7.6.3.11.3. Concentración de Calcio:

Tabla 55. Reporte de la concentración de Calcio en la muestra de miel de abejas.

<b>muestra</b>	<b>concentración (mg/L)</b>
Miel 1	0,8305
Miel 2	0,669
Promedio	0,74975

### 7.6.3.11.4. Determinación de Sodio:

Tabla 56. Reporte de la concentración de Sodio en la muestra de miel de abejas.

<b>muestra</b>	<b>concentración (mg/L)</b>
Miel 1	1,0781
Miel 2	0,081
Promedio	0,57955

### 7.6.3.11.5. Determinación de Hierro:

Tabla 57. Reporte de la concentración de Hierro en la muestra de miel de abejas.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
Miel 1	-0,1935
Miel 2	-0,3457
Promedio	Ausencia de Fe

### 7.6.3.11.6. Determinación de Zinc:

Tabla 58. Reporte de la concentración de Zinc en la muestra de miel de abejas.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
Miel 1	-0,09
Miel 2	-0,0585
Promedio	Ausencia de Zn



### 7.6.3.11.7. Determinación de Magnesio:

Tabla 59. Reporte de la concentración de Magnesio en la muestra de miel de abejas.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
Miel 1	0,4592
Miel 2	0,4394
Promedio	0,4493

### 7.6.3.11.8. Determinación de Manganeso:

Tabla 60. Reporte resultados de la determinación de Manganeso en la muestra de miel de abejas.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
Miel 1	-0,0336
Miel 2	-0,0135
Promedio	Ausencia de Mn

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los criterios establecidos para determinar si el método cumple con las características establecidas para cada parámetro se registran en la siguiente tabla:

Tabla 61. Valores aceptados para cada uno de los criterios.(Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, 2011)

CARACTERÍSTICAS	EXPRESADA EN	ACEPTACIÓN DEL RESULTADO
<b>PRESICIÓN</b>	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	$\leq 10\%$
<b>EXACTITUD</b>	PORCENTAJE DE ERROR	$\leq 5\%$
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>	UNIDADES DEL MÉTODO	Debe ser mucho menor a lo que piden las respectivas normas ( HMF < 60 mg/Kg)
<b>LINEALIDAD</b>	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	0,9900 – 1
<b>ROBUSTEZ</b>	COEFICIENTES CALCULADOS	No se deben encontrar diferencias significativas entre los resultados reportados.
<b>SELECTIVIDAD/ ESPECIFICIDAD</b>	PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN	$80\% < \% R < 120\%$

## 8.1 LINEALIDAD

Utilizando el método de la AOAC 980.23 y mediante regresión lineal con el procedimiento descrito en la TABLA 7. Se realizaron dos curvas de calibración como se observa en la gráfica 1. Y gráfica 2. Obteniendo como resultados que las concentraciones de HMF son proporcionales a la absorbancia entregada por el equipo. Además, se encontraron unos coeficientes de correlación de 0,9981 (gráfica 1.) y 0,9997 (gráfica 2.); cumpliendo con el rango establecido para este parámetro en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la U.T.P que es de 0,9900 – 1 establecido en el instructivo para verificación de los métodos de ensayo (123 – LAA – INT – 17).

Para las curvas de calibración se determinó un rango de concentraciones que fueron de aproximadamente  $\frac{9 \text{ mg de HMF}}{\text{Kg miel de abejas}}$  a  $\frac{90 \text{ mg de HMF}}{\text{Kg miel de abejas}}$  debido a que las normativas actuales como lo son la Resolución 1057 del 23 de marzo de 2010 (Palacio Betancourt, 2010) y la NTC 1273 (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.(ICONTEC), 2007) determinan que las mieles deben tener una concentración máxima de  $\frac{60 \text{ mg de HMF}}{\text{Kg miel de abejas}}$ .

## 8.2. SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

Los resultados expresados en la tabla 61. del presente trabajo, señalan que el método presenta una selectividad/ especificidad expresada cuantitativamente en porcentaje de recuperación de 108,92%; lo cual indica que se encuentra en el rango establecido en el instructivo para verificación de los métodos de ensayo (123 – LAA – INT – 17) del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira es de 80% < %R < 120% (TABLA 61.).

## 8.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Para establecer los valores del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se aplicó la metodología descrita en la TABLA 9; obteniéndose que el LD = 9,8582 mg/Kg y el LC = 13,8893 mg/Kg con un coeficiente de variación de 8,32% que está dentro de los límites aceptados por el criterio del laboratorio, el cual establece que el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 10% (TABLA 61.). Pero en cuanto al porcentaje de error este método no presenta buena exactitud para los estándares de baja concentración ya que el error fue de 20,67% y el porcentaje de error de aceptación en el laboratorio es menor o igual al 5%.

Además el límite de detección es cuatro veces menor a lo establecido por las normas, las cuales hacen referencia a que el límite máximo permitido de HMF en miel de abejas es de 60 mg/Kg, por lo que indica que sirve para verificar que la concentración de HMF es reglamentaria o no lo es para cada tipo de miel a analizar en el Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

## 8.4. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

### 8.4.1. REPETIBILIDAD

Como se explica en la tabla 7., la repetibilidad fue llevada a cabo por el analista A durante 5 días y el análisis se realizó a tres soluciones las cuales representaban respectivamente concentración baja (aproximadamente 5 mg/Kg), media (aproximadamente 41 mg/Kg) y alta (aproximadamente 70 mg/Kg). A continuación se tabulan los promedios de porcentajes de coeficiente de variación y porcentajes de error de los resultados obtenidos en cada una de las soluciones como producto de los 5 días de la determinación por el analista A (ver tablas 18, 22, 26, 30 y 34).

**Tabla 62. Resultados promedio obtenidos por el analista A durante los 5 días; %CV y %E para tres soluciones.**

SOLUCIONES	% CV	% E
MADRE 1	4,982 %	4,272 %
MADRE 2	1,156 %	3,294 %
MADRE 3	1,0822 %	4,123 %

En la TABLA 62. Se observa unos porcentajes de coeficiente de variación ( $\leq 10$  %) bajos, lo que indica buena precisión y que existe un grado de concordancia entre las concentraciones y las mediciones de absorbancia del HMF; bajo las mismas condiciones de medición. El porcentaje de error está dentro de los criterios de aceptación ( $\leq 5$ %) lo que demuestra que el método es exacto dentro de las condiciones de repetibilidad.

### 8.4.2. REPRODUCIBILIDAD

Como se explica en la tabla 7, la reproducibilidad se ejecutó durante un lapso de 5 días, para tres soluciones las cuales representaban respectivamente concentración baja (aproximadamente 5 ppm), media (aproximadamente 41 ppm) y alta (aproximadamente 70 ppm) y por dos analistas A y B; modificando las condiciones de medición de las concentraciones de HMF y obteniéndose los siguientes resultados de los promedios de porcentajes de coeficiente de variación y porcentajes de error de cada una de las soluciones organizados en la TABLA 62. Y TABLA 63.

**Tabla 63. Resultados promedio obtenidos por el analista B durante los 5 días; %CV y %E para tres soluciones.**

<b>SOLUCIONES</b>	<b>% CV</b>	<b>% E</b>
<b>MADRE 1</b>	5,6708 %	4,750 %
<b>MADRE 2</b>	1,5802 %	4,958 %
<b>MADRE 3</b>	1,2241 %	4,536 %

Tanto en la TABLA 62. Como en la TABLA 63. Todos los porcentajes de coeficiente de variación están por debajo del límite de aceptación que es  $\leq 10 \%$ , y todos los porcentajes de error se encuentra bajo el límite de porcentaje de error que es  $\leq 5 \%$ , según los requerimientos estipulados en el instructivo para verificación de los métodos de ensayo del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, lo que señala que el método 980.23 de la AOAC es exacto y preciso en cuanto a su reproducibilidad.

## **8.5. ROBUSTEZ**

### **8.5.1. Aumento del contenido de HMF por elevación de temperatura en una muestra de miel de abejas.**

Al someter la miel a las siete diferentes temperaturas se observó que hubo aumento en la concentración de HMF a medida que aumentaban estas; pero para saber si realmente este factor influía en el desempeño del método se realizó un análisis de varianza mediante la herramienta ANOVA en la cual se obtuvo la TABLA 38., con un valor de alfa 0,05 y proponiéndose las siguientes hipótesis.

Ho (Hipótesis nula) = la concentración de HMF no varía de acuerdo al aumento de la temperatura.

Ha (Hipótesis alterna) = la concentración de HMF varía de acuerdo al aumento de la temperatura.

En la cual se concluía que si p (probabilidad) es menor que alfa se rechaza la hipótesis nula pero si p es mayor que alfa se acepta la hipótesis nula.

Teniendo como resultado que el valor p es igual a  $1,23 \times 10^{-06}$  se concluye que la hipótesis nula es rechazada ya que el valor p es menor a alfa (0,05) o sea que la temperatura influye en la concentración de HMF a medir.

Lo anterior indica que las muestras de miel se deben almacenar en un recipiente y ambiente adecuado en el laboratorio mientras se analiza la concentración de HMF; donde la temperatura no se eleve, ya que podría alterar la concentración de esta en la miel de abejas y dar un resultado erróneo para este análisis.

### **8.5.2. Aumento del contenido de HMF por aumento en la humedad en una muestra de miel de abejas.**

Para medir este factor se adicionó agua a tres muestras de miel y se observó que la concentración de HMF encontrada disminuyó con respecto a la concentración medida a la miel sin variaciones inicial como se muestra en la TABLA 40. Pero para saber si realmente este factor influía en el desempeño del método se realizó un análisis de varianza mediante la herramienta ANOVA en la cual se obtuvo la TABLA 40., con un valor de alfa 0,05 y proponiéndose las siguientes hipótesis.

Ho (Hipótesis nula) = la concentración de HMF no varía de acuerdo al aumento de la humedad.

Ha (Hipótesis alterna) = la concentración de HMF varía de acuerdo al aumento de la humedad.

En la cual se concluía que si p (probabilidad) es menor que alfa se rechaza la hipótesis nula pero si p es mayor que alfa se acepta la hipótesis nula.

Teniendo como resultado que el valor p es igual a 0,00017416 se concluye que la hipótesis nula es rechazada o sea que se acepta la hipótesis alterna en la que se propone que la concentración de HMF varía de acuerdo al aumento de la humedad como se observa en las determinaciones tiende a disminuir como lo indica los datos registrados en la TABLA 39.

Por lo tanto las muestras de miel de abejas deben mantenerse a unas condiciones de almacenamiento óptimas para no alterar su composición.

### **8.5.3. Acidez**

En el procedimiento realizado para medir la variable acidez que inducía el aumento de HMF, no se obtuvo resultados relevantes para afirmar esta hipótesis; ya que después de aumentar la acidez con un ácido débil como lo es el ácido acético, se aplicó la metodología 980.23 de la AOAC para la determinación de HMF y no se produjo lectura de absorbancia por parte del espectrofotómetro, como se expone en las tablas 41 y 42; por lo que el ácido adicionado se pudo haber convertido en un interferente para la determinación por este método en estudio.

La acidez es un factor importante en la formación de HMF pero sólo en conjunto con la elevación de la temperatura, actuando así la acidez como un catalizador en el aumento de HMF. Además, quizás la proporción entre los mismos tipos de ácidos propios de la composición de la miel, dan las características de la acidez requerida para que el HMF aumente.

Muchos autores reportan que la acidez libre se incrementa con el tiempo, y como resultado de procesos de fermentación, ya que los azúcares de la miel y los compuestos alcohólicos se transforman en ácidos por la presencia de levaduras (Bath & Singh, 2000).

Algunos estudios como: "Formación y reducción de 5-hidroximetilfurfural al elevar la temperatura en un sistema de modelo en función de aminoácidos y azúcares de composición"; muestra que la formación de HMF se incrementa por la reducción del pH, o sea por un aumento de acidez, altas temperaturas y en presencia de azúcares y aminoácidos en el sistema, en particular la presencia de glutamina, ácido glutámico y ácido aspártico (Kavousi, Mirhosseini, Ghazali, & Ariffin, 2015).

## **8.6. ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS**

A continuación se discuten los resultados obtenidos para los parámetros de la Resolución 1057, aplicados a una muestra de miel de abeja con elevada concentración de Hidroximetilfurfural.

### **8.6.1. CONTENIDO APARENTE DE SACAROSA**

El resultado de contenido aparente de sacarosa para una muestra de miel de abejas fue 1,46% revisando el límite de permisibilidad para este factor, muestra que debe ser menor o igual a 5 % (Palacio Betancourt, 2010), lo que indica que esta cumple con este parámetro.

### **8.6.2. CONTENIDO DE CENIZAS**

El contenido de cenizas encontrado en la muestra de miel de abejas fue 0,0715 % y según el límite aceptable es menor o igual a 0,6% (Palacio Betancourt, 2010) por lo que cumple con este parámetro, el cuál mide el contenido total de minerales presentes en el alimento.

### **8.6.3. ACIDÉZ LIBRE**

En esta propiedad se registró un valor de 44,067 meq / Kg de acuerdo con los límites de la normatividad, el límite aceptable es menor o igual a 50 meq /Kg (Palacio Betancourt, 2010) por lo que la miel se encuentra dentro de este rango.

#### **8.6.4. HUMEDAD**

Para esta característica se encontró un valor de 19% y lo estipulado en la norma es  $\leq 20$  % (Palacio Betancourt, 2010) por consiguiente se encuentra en este rango.

#### **8.6.5. SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA**

El contenido de sólidos insolubles en agua fue 0,1318 % pero la normativa exige que debe ser menor o igual a 0,1 % (Palacio Betancourt, 2010) por lo que se encontró que éste parámetro está un poco elevado.

#### **8.6.6. CONDUCTIVIDAD**

La conductividad registró un dato de 0,365 ms/cm, y la norma indica que debe ser menor o igual a 0,8 ms/cm (Palacio Betancourt, 2010) por lo que la muestra de miel en estudio está dentro del rango establecido.

#### **8.6.7. PH**

El pH de la muestra fue 3,95 pero la norma no registra límite alguno. La miel contiene ácidos orgánicos que se encuentran parcialmente disociados en el agua, lo cual ocasiona un aumento de los iones  $H^+$  y un consecuente descenso del pH (Owenn R. Fennema, 1996).

#### **8.6.8. SÓLIDOS SOLUBLES**

La muestra de miel de abejas presenta 77,9 % de sólidos solubles. Pero las normas no especifican límite para este parámetro, que evalúa la concentración de azúcar, sales, ácidos y demás compuestos solubles en agua presentes en la miel.

#### **8.6.9. HIDROXIMETILFURFURAL**

La muestra de miel de abejas estudiada en los análisis fisicoquímicos reportó una concentración de HMF de 105,91 mg/Kg para poder realizar la fundamentación del análisis de una muestra real; lo que señala que esta miel no es fresca ya que el límite establecido para HMF es menor o igual a 40 mg/Kg.

#### **8.6.10. AZÚCARES REDUCTORES**

La concentración de azúcares reductores para esta muestra de miel de abejas fue 39,5976 %, y el límite de aceptación para este requisito es mayor o igual a 45 % (Palacio Betancourt, 2010), por lo que se deduce que los azúcares reductores (la glucosa y la fructosa) están dando un indicador de que la miel está teniendo un proceso de fermentación, o sea se está degradando, y va directamente relacionado con la elevada concentración de HMF que presenta la miel de abejas.



### 8.6.11. METALES PESADOS

En productos apícolas como la miel, la proporción de sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc, son los elementos mayoritarios y son considerados parámetros complementarios en la denominación de origen (Lachman, J., 2007). El contenido mineral en la miel puede dar una indicación de su origen geográfico (Rodríguez-Otero, J., 1992), actualmente no se incluyen valores del contenido de minerales en la normatividad. La miel tiene un contenido promedio de minerales entre 0.1-0.2% en mieles florales y 1% o más en mielatos; el elemento dominante es el potasio, seguido por cloro, sodio, fósforo, magnesio, silicio, hierro y cobre (La Serna, I., 1999).

**Tabla 64. Registro de concentración de minerales encontrados en la muestra de miel de abejas analizada.**

<b>Mineral</b>	<b>Promedio de Concentraciones ppm</b>
Potasio	0,0412
Calcio	0,0075
Sodio	0,0058
Hierro	0
Zinc	0
Magnesio	0,0045
Manganeso	0
Cobre	0

## 9. CONCLUSIONES

Se validó el método de la AOAC 980.23 para la determinación de Hidroximetilfurfural en miel de abejas por espectrofotometría ultravioleta, a través de la lectura del estándar de HMF (99%), patrones y muestras de miel; y con esto se demostró que el método sirve para determinar Hidroximetilfurfural en miel de abejas; ya que cumplió con todos los límites de aceptación de los parámetros requeridos en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

La validación del método de la AOAC 980.23 es muy importante para el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira ya que se pretende que implantando este servicio dentro del portafolio del laboratorio, se pueda suplir la necesidad de los apicultores de la región cafetera, brindándoles ventajas importantes, tales como una reducción en los costos y tiempo para el análisis previo a la comercialización de la miel exigido por los entes reguladores.

Se elaboró el informe de validación del método de la AOAC 980.23 según los instructivos del Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. (ANEXO 2.).

Se desarrolló el plan de validación de la determinación de HMF en miel de abejas de acuerdo al método 980.23 de la AOAC siguiendo como guía el instructivo establecido en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos. (ANEXO 3.).

## 10. RECOMENDACIONES

1. Se debe tener en cuenta que el lugar de almacenamiento de la miel debe ser fresco y seco, puesto que someterla a un aumento de temperatura y/o humedad, genera una alteración considerable en la concentración de HMF en la miel de abejas.
2. Con este trabajo se abren temáticas para otros trabajos de grado, tales como:
  - 2.1. Determinación de diastasa por un método estandarizado.
  - 2.2. Determinar a través de cual ruta de cálculo, resulta más confiable aplicar, para la obtención de los valores de las concentraciones de HMF en miel de abejas; si la ecuación de la curva de calibración o la ecuación del método 980.23 de la AOAC.
  - 2.3. Estudio para conocer la incidencia de las variables: temperatura, humedad y acidez en la formación de hidroximetilfurfural en miel de abejas.
  - 2.4. Experimentar si la metodología utilizada para la determinación de HMF en miel de abeja, puede ser aplicada de igual manera en la determinación de HMF en otros alimentos ricos en carbohidratos de los cuales se tenga sospecha que contenga esta sustancia.
3. Se propone revisar otras metodologías para medir la importancia de la variable acidez en la formación de HMF.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- ACD/Chem Sketch. (2015). Estructura del Hidroximetilfurfural.
- Aucejo, dela M., Estellés, M. J. L., & Hernández, R. H. (2011). *Laboratorio de análisis instrumental*. (Universidad de Valencia, Ed.). Valencia, España. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?id=YDvLEZ3AdLQC&pg=PA139&dq=polarimetria+analisis+instrumental&hl=es&sa=X&ved=0CCEQ6AEwAWoVChMI0YOP57z8yAlVwnkmCh2XCQG3#v=onepage&q=polarimetria analisis instrumental&f=false](https://books.google.com.co/books?id=YDvLEZ3AdLQC&pg=PA139&dq=polarimetria+analisis+instrumental&hl=es&sa=X&ved=0CCEQ6AEwAWoVChMI0YOP57z8yAlVwnkmCh2XCQG3#v=onepage&q=polarimetria%20analisis%20instrumental&f=false)
- Bath, P., & Singh, N. (2000). A research note chemical changes in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey during storage. *Journal of Food Quality*, 23, 443–451.
- Codex Alimentarius, C. (2001). CODEX STANDARD FOR HONEY CODEX STAN 12-1981, 1–8.
- CORRALES MONTOYA, D., & MONTOYA CORRALES, L. F. (2012). VALIDACIÓN, CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE Y DETERMINACIÓN DE LA TRAZABILIDAD PARA LOS ENSAYOS DE NITROGENO KJELDAHL Y NITROGENO AMONIAICAL EN EL LABORATORIO DE QUIMICA AMBIENTAL EN LA UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., ... Sandoval, S. (2010). *“Aspectos generales sobre la validación de métodos.” Instituto de Salud Pública Chile*. Chile.
- Echeverri, L. F., Henao, F. Á., & Ramírez, F. J. (2009). *ELABORACIÓN DE NUEVE GUÍAS COMPLEMENTARIAS DE LABORATORIO PARA LA EJECUCIÓN DE PRÁCTICAS DE APLICACIÓN ANALÍTICA EN LA ASIGNATURA LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL I*. Universidad Tecnológica de Pereira. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1829/1/54308H565.pdf>
- Espinal, C. F., & Nieto, C. M. S. (2006). CADENA DE LAS ABEJAS Y LA APICULTURA EN COLOMBIA. *Ministerio de Agricultura Y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.*, 124, 16. Retrieved from

<http://www.agrocadenas.gov.co>

- Eusse, F. C. (2014). *Análisis instrumental 1: Manual de prácticas de laboratorio*. (Universidad Tecnológica de Pereira, Ed.) (4th ed.). Cámara Colombiana del libro Agencia ISBN, Bogotá D.E. Retrieved from <http://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/02/Manual-de-pr%C3%A1cticas-de-Laboratorio-de-An%C3%A1lisis-Instrumental-I.pdf>
- FAO. (2012). FAOSTAT (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICA). Retrieved from <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QV/S>
- Feldman, P., Etcheverry, M. L., Nimo, M., Janin, A., & Pons, G. Guía de Aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura: Miel (2AD).
- Fundación Fortalecer., & Ingeniero Gustavo Secilio. (2005). Miel: Superando Barreras para Acceder al Mercado Internacional. *Banco Interamericano de Desarrollo. Buenos Aires, Argentina.*, 41. Retrieved from [www.fortalecer.com.ar](http://www.fortalecer.com.ar)
- Gökmen, V., & Morales, F. (2014). *Encyclopedia of Food Safety. Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00209-2>
- Hernández, A. G. (2010). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Barcelona, España. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?id=v7asFduLUFsC&pg=PA23&dq=conductimetría&hl=es&sa=X&ved=0CDAQ6AEwBGoVChMI3qP5\\_Zj8yAIVhD8-Ch0ZWQtz#v=onepage&q=conductimetría&f=false](https://books.google.com.co/books?id=v7asFduLUFsC&pg=PA23&dq=conductimetría&hl=es&sa=X&ved=0CDAQ6AEwBGoVChMI3qP5_Zj8yAIVhD8-Ch0ZWQtz#v=onepage&q=conductimetría&f=false)
- Horwitz, W., & Latimer, G. W. (2011). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.). Estados Unidos.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.( ICONTEC). (2007). NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 1273. *Bogotá, D.C., 2da actual*, 8.
- International Organization For Standardization. (2003). ISO 10012 Measurement management systems – Requirements for measurement processes and measuring equipment.
- ISO. (2005). ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 1–8.
- IVM. (1997). NTC - 2194 Vocabulario de Términos básicos y generales en Metrología. *International Vocabulary of Basic and General Terms in*

*Metrología. (ISO).*

- Jr. Jonathan, & W. White. (1978). Honey. *Food Research*, 24, 287–374. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3)
- Kavousi, P., Mirhosseini, H., Ghazali, H., & Ariffin, A. A. (2015). Formation and reduction of 5-hydroxymethylfurfural at frying temperature in model system as a function of amino acid and sugar composition. *Food Chemistry*, 182, 164–170. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.135>
- La Serna, I., B. M. (1999). Aplicación de nuevas tecnologías en mieles canarias para su tipificación y control de calidad. In *Servicio de Publicaciones de la Caja General de ahorros de Canarias*. Tenerife, España.
- Laboratorio, Aditivos, de N., & Chile., y C. G. de C. I. de S. de. (2011). DETERMINACION DE HIDROXIMETILFURAL EN MIELES. Método de espectrofotometría UV, 5–9.
- Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. Instructivo para verificación de los métodos de ensayo del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. Segunda versión. (2011). Pereira.
- Lachman, J., D. K. (2007). Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. In *Food chemistry*.
- López, M. J. S., Castillo, A., & Cano, A. (2004). Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles del Nordeste Argentino. *Agrotecnia*, 12(3400), 2–4. Retrieved from [http://baunne.unne.edu.ar/revista\\_agrotecnia/pdfs/AG\\_12\\_04\\_Subovskyetal.pdf](http://baunne.unne.edu.ar/revista_agrotecnia/pdfs/AG_12_04_Subovskyetal.pdf)
- Oficina Internacional de Pesas y Medidas. (2007). Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales de Metrología.
- Owenn R. Fennema. (1996). *Food chemistry*. University of Wisconsin Madison, New York: Inc., Marcel Dekker. Retrieved from <http://cst.ur.ac.rw/library/Food Science books/batch1/Marcel Dekker,.Food Chemistry, 3rd Edition..pdf>
- Palacio Betancourt, D. Resolución 00001057 de 2010 Miel de abejas.pdf (2010). Colombia.
- Rodríguez- Otero, J., P. P. (1992). Determination of Sodium, Potassium, Calcium, Magnesium, Copper, Iron, Manganese and total cationic milliequivalent in

Spanish commercial honey. *Journal of Apicultural Research* 31 : 65 - 69.

Tapia, M. S. R., & Morales, C. B. (2013). *Validación de procesos*. Agencia Nacional de Medicamentos Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia.Chile. Retrieved from [http://www.ispch.cl/sites/default/files/Validaci%C3%B3n de procesos productivos \(MSR y CBM\).pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/Validaci%C3%B3n%20de%20procesos%20productivos%20(MSR%20y%20CBM).pdf)

Velandia Castellanos, J. C. (2008). Validación del Método Analítico para la cuantificación de Bacitracina en el Laboratorio de Control de Calidad de una Industria Farmacéutica Veterinaria.

Normativa	Humedad	Contenido de azúcares	Cenizas	Conductividad eléctrica	Nivel de HMF	Acidez
Codex alimentarius	En general: no más del 20% Miel de brezo "Calluna" y miel para uso industrial: no más del 23%	Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas) En general: no menos de 60 g/100g Mieles de mielada: no menos de 45 g/100g  Contenido de sacarosa En general: no más de 5 g/100g Alfalfa (Medicago sativa), Citrus spp., Falsa acacia (Robinia pseudoacacia), Madre Selva francesa (Hedysarum), Menzies Banksia (Banksiamenziesii), "Red Gum" (Eucalyptus camaldulensis), "Leatherwood" (Eucryphia lucida), Eucryphia milligani: no más de 10 g/100g Espliego (Lavandula spp.), borraja (Borago officinalis): no más de 15 g/100g	No hace referencia	En general: máximo 0.8 mS/cm Miel de mielada y miel de castaño: mínimo 0.8 mS/cm	En general: máximo 40 mg HMF/kg miel Mieles tropicales: máximo 80 mg HMF/kg miel	Máximo 50 miliequivalentes de ácido por 1000g de miel
Directiva 2001/110/CE Comunidad Europea	En general: no más del 20% Miel de brezo "Calluna" y miel para uso industrial: no más del 23% Miel de brezo "Callunavulgaris" para uso industrial: no más del 25%	Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas) Miel de flores: no menos de 60 g/100 g Miel de mielada, mezclas de miel de mielada con miel de flores: no menos de 45 g/100 g  Contenido de sacarosa En general: no más de 5 g/100 g Falsa acacia (Robinia pseudoacacia), alfalfa (Medicago sativa), Banksia de Menzies (Banksiamenziesii), Sula (Hedysarum), Eucalipto rojo (Eucalyptus camaldulensis), Eucryphia lucida, Eucryphia milligani, Citrus spp.: no más de 10 g/100 g Espliego (Lavandula spp.), borraja (Borago officinalis): no más de 15 g/100 g	No hace referencia	En general: máximo 0.8 mS/cm Miel de mielada y miel de castaño: mínimo 0.8 mS/cm	En general: máximo 40 mg HMF/kg miel Mieles tropicales: máximo 80 mg HMF/kg miel	En general: máximo 50 miliequivalentes de ácido por 1000g de miel Miel para uso industrial: máximo 80 miliequivalentes de ácido por 1000g de miel



Norma Técnica Colombiana 1273	Máximo 20%	<p>Contenido aparente de azúcar reductor: mínimo 60% miel floral, mínimo 45% miel de mielada</p> <p>Contenido aparente de sacarosa: máximo 5%</p>	Máximo 0.6%	No hace referencia	Máximo 40 mg HMF/kg miel	Máximo 50 miliequivalentes de ácido por 1000g de miel
Resolución 1057 de 2010 Ministerio de Protección Social	<p>En general: máximo 20%</p> <p>Mieles de origen tropical: máximo 21%</p>	<p>Contenido aparente de azúcar reductor: mínimo 60% miel floral, mínimo 45% miel de mielato</p> <p>Contenido aparente de sacarosa: En general: máximo 5%</p> <p>Mieles tropicales: máximo 10%</p>	Máximo 0.6%	Máximo 0.8 mS/cm	<p>En general: máximo 40 mg HMF/kg miel</p> <p>Mieles tropicales: máximo 60 mg HMF/kg miel</p>	Máximo 50 miliequivalentes de ácido por 1000g de miel

**ANEXO 1.** Comparativo de los parámetros fisicoquímicos de la miel de abejas por las normatividades expuestas en el presente documento.

