



METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y DE CALIDAD EN MIEL

Adaptado:

Pablo A. Ulloa Fuentes

Unidad de Postcosecha

Tecnología de Alimentos

Área de Alimentos del Futuro

Numero de Registro DDI: 2022-A-2981

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVO GENERAL	6
3. PROCEDIMIENTOS	9
3.1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR HPLC	9
3.2. ACIDEZ LIBRE	9
3.3. ACTIVIDAD DIASTÁSICA	10
3.4. CENIZAS	13
3.4.1. Método gravimétrico.....	13
3.4.2. Método predictivo.....	13
3.5. COLOR	14
3.6. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	14
3.7. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	15
3.7.1. Método espectrofotométrico (White)	15
3.7.2. Método HPLC para HMF	16
3.8. HUMEDAD	16
3.9. pH	17
3.10. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS INSOLUBLES	17
4. REFERENCIAS	18
5. ANEXOS	19

1. INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento natural producido por las abejas *Apis mellifera* L. a partir del néctar de las flores (miel floral) o de las secreciones de plantas o excreciones de insectos chupadores de partes vivas de las plantas (mielatos), que transforman y combinan con sustancias propias específicas, que luego depositan en el panal para su maduración. Siendo los componentes principales una mezcla de azúcares (85-95%) y agua (16-18%), y compuestos minoritarios (proteínas, aminoácidos libres, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, vitaminas y minerales) (Da Silva et al. 2016). Su composición está influenciada por la fuente floral visitadas por las abejas, junto con las condiciones ambientales y climáticas, como también los procesos de extracción desde los cuadros. Por lo cual, la composición de la miel es diferente para cada región del planeta. Sin embargo, existe la tendencia de diferenciar la miel según sus fuentes florales con el objetivo de obtener un estándar en su calidad y autenticidad del producto, lo que le permitirá obtener un producto más competitivo en el mercado.

La Unión Europea (2001) establece que la fuente floral, junto con el origen regional, territorial o topográfico debe especificarse en la etiqueta del producto, y alienta el uso de procedimientos analíticos para determinar la autenticidad de las mieles (Marcazzan et al., 2018). Los métodos más utilizados, y más reconocidos por los legisladores, son las propiedades fisicoquímicas y el análisis de polen (melisopolinología). Siendo estos los que se han utilizado para caracterizar las muestras de miel para identificar su fuente u origen floral, así como para establecer su calidad. Miel monoflorales donde la predominancia floral es única, poseen una gran demanda en su consumo, lo que significa que también tienen un mayor valor comercial para sus productores. Por lo tanto, la caracterización de la miel es necesaria para mejorar nuestra respuesta a la actual demanda del consumidor. En general, las mieles monoflorales son más caras que las multiflorales (sin predominancia floral) y algunas mieles monoflorales se aprecian más que otras debido a sus características organolépticas o sus propiedades funcionales.

Un aumento en el consumo global, en los últimos años, puede atribuirse al aumento general en los niveles de vida y un mayor interés por el consumo de productos naturales y que presenten propiedades benéficas para la salud. A nivel mundial, la miel comercial varía mucho en calidad, y es evaluada principalmente en función del color, aroma, sabor y recientemente, por la presencia de compuestos relacionados con los beneficios para la salud (ej. compuestos polifenólicos). Diversos estudios han demostrado que algunos compuestos presentes en la miel proporcionan compuestos bioactivos, los cuales poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

La miel comercial debe cumplir con una serie de parámetros regulados tanto por organismos nacionales (NCh616-2007) como internacionales (Unión Europea, 2002). Una vez hecho esto, la miel comercial aparece en las grandes superficies comerciales (retail), con el objetivo principal de vender lo más posible. Hoy, el interés del consumidor se orienta a la búsqueda de miel y sus derivados de tipo orgánico (Serra Bonvehi et al., 2019). Para la Comisión Europea (2002) establece que la clasificación de la miel y otros productos apícolas como productos "orgánicos" está estrechamente relacionada con las características de los tratamientos realizados a la colmena, así como la calidad del medio ambiente en el cual está inserta.

Las exportaciones de miel nacional se han incrementado cada año, llegando a ser el 70% de la producción nacional (7 a 11mil ton/año) lo que lo ubica a Chile en la posición 29° del ranking mundial; esto debido a la producción de diversos tipos de miel gracias a la presencia de flora nativa endémica. La miel obtenida parece tener importantes propiedades funcionales, heredadas de fuentes florales específicas (Bridi & Montenegro 2017). El mercado Europeo es uno de los principales consumidores de miel del mundo; siendo Alemania (71%) y Francia (7%) entre los países con mayor consumo de miel chilena (ODEPA, 2018). Sin embargo, la miel producida en Chile desafortunadamente se exporta a granel (tambores 300 kg), no detallando ninguna información sobre su origen floral, ni menos sobre sus parámetros fisicoquímicos o de calidad. Por lo tanto, se comercializa a un valor relativamente bajo (3,49 USD/kg) en comparación a mieles que poseen información en sus etiquetas y que sus valores son muy superiores (28 USD/kg). Un claro ejemplo es la miel de Nueva Zelanda, miel de Manuka; producto que es muy apetecido y valorizado por sus propiedades funcionales y características que la hacen única (Alvarez-Suarez et al., 2014). El alto precio de la miel exportada desde Nueva Zelanda; está relacionado con la investigación científica que respalda sus atributos y que además son informadas en las prácticas comerciales.

La detección de propiedades fisicoquímicas y organolépticas según el origen floral, junto con la identificación de compuestos bioactivos para cada tipo de miel ha permitido establecer precios muy superiores al promedio. Siendo una estrategia que puede imitarse en nuestro país, dada la similitud en los recursos de miel, la distancia a los mercados de destino y la cantidad exportada (ODEPA, 2018). Investigaciones sobre la miel obtenida y sus productos en Chile son limitadas y se dividen en sectores, lo que se vuelve especialmente importante cuando se consideran estas determinaciones para agregar valor a la importancia de la miel y establecer parámetros de calidad; por ejemplo, si se trata de una miel orgánica o libre de sustancias tóxicas.

2. OBJETIVO GENERAL

- El presente documento presenta y describe las diferentes metodologías y técnicas analíticas las cuales permiten determinar parámetros fisicoquímicos y parámetros de calidad para muestras de mieles. Todos los procedimientos están acorde a la Legislación Nacional (NCh-616-2007) e Internacional (Codex, 2011; International Honey Commission (ICH), 2009).

A continuación, se presentan algunos parámetros fisicoquímicos y de calidad, los cuales son determinados para evaluar la calidad de la miel. Además, se adjuntan los límites establecidos para algunos de estos, junto con el método o técnica utilizada y la normativa bajo la cual se realizan los ensayos.

Tabla 1. Conjunto de parámetros fisicoquímicos y de calidad utilizados para establecer características de la miel.

Parámetro	Límite	Método o Técnica	Norma	
Acidez total	<50 meq/kg	Titulación	IHC-2009	NCh3019
Actividad Diastásica (AD)	> 8 Gothe	Espectrofotométrico	IHC-2009	NCh3087
Azúcares reductores	>60%, exp. gluc + fruc	HPLC	IHC-2009	NCh574
Cenizas	-	Predictiva ec. $f(EC)$		
Color	Escala Pfund	Espectro	IHC-2009	
Conductividad Eléctrica (CE)	<0.8 mS/cm	Conductividad	IHC-2009	NCh3064
Contenido Sacarosa	<5%		IHC-2009	NCh574
Hidroximetilfurfural (HMF)	<40 mg/kg	Espectro	IHC-2009	NCh3046
		HPLC		
Humedad	<20%	Índice de refracción	IHC-2009	NCh3026
pH	-	pHmetro	IHC-2009	NCh3019
Sólidos insolubles	<0,1%	Gravimétrico	IHC-2009	NCh3047
	<0.5% (prensada)			

Fuente: International Honey Commission (IHC, 2009); Norma Chilena NCh-616:2007.

Se han establecido diferentes relaciones entre los parámetros fisicoquímicos y de calidad, de manera de predecir y establecer: i) diferentes estados de la evaluación de frescura y madurez en la miel, ii) la posibilidad de conocer e identificar si una miel fue adulterada, iii) sí podrían ocurrir fenómenos de cristalización y iv) evaluar y establecer el origen floral de las muestras de miel.

Tabla 2. Relación de parámetros fisicoquímicos y de calidad, en función de diferentes estados de la miel.

Estado relativo	Parámetros
Preservación	Humedad pH Acidez libre y acidez total
Frescura	Actividad Diastásica Actividad Invertasa Hidroximetilfurfural (HMF)
Madurez	Prolina Humedad Sacarosa
Origen floral	Contenido cenizas Humedad Color Conductividad Eléctrica Rotación específica Relación glucosa/fructosa Relación glucosa/humedad pH Acidez libre y acidez total Prolina Composición de azúcares
Adulteración	Sacarosa Perfil fructosa-glucosa-sacarosa Prolina HMF
Cristalización	Relación glucosa/fructosa Relación glucosa/humedad

Fuente: Pita-Calvo et al. (2017).

3. PROCEDIMIENTOS

3.1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR HPLC

La miel esta constituida principalmente por monosacáridos como son la glucosa y fructosa (1,2:1; p/p). Sacarosa se encuentra alrededor de 1% (peso seco). Para la determinación de los tres principales azúcares se debe pesar 5 g de miel, diluir en 40 mL de agua en un vaso precipitado. Posteriormente, pipetear 25 mL de metanol dentro de un balón volumétrico de 100 mL, transferir la solución acuosa de miel dentro del balón y aforar con agua. Luego pasar la solución por un filtro de membrana (0,45 μ m) y recolectar el filtrado.

Fase móvil: Acetonitrilo:Agua (80:20, v/v)

Detector IR: (temperatura detector y columna 30°C)

Volumen de inyección: 10 μ L.

Soluciones Standard (fructosa, glucosa y sacarosa):

- Fructosa (F): 2,00 g
- Glucosa (G): 1,50 g
- Sacarosa (S): 0,25 g

Pipetar 25 mL de metanol en un balón volumétrico de 100 mL. Disolver la cantidad de cada standard* (F, G y S) en 40 mL de agua y transferir al frasco volumétrico siendo aforado con agua.

**Estas soluciones son estables durante 4 semanas a 4°C y seis meses a -18°C.*

3.2. ACIDEZ LIBRE

La determinación de la acidez libre total se realiza mediante procedimiento de titulación potenciométrica. Los ácidos orgánicos de la miel se encuentran en equilibrio con los correspondientes lactonas. Los ácidos presentes representan menor al 0,5% del total de los sólidos, siendo importantes en las características de sabor, aroma, color y preservación (De Melo et al., 2017). Para la determinación de su acidez las muestras de miel deben ser homogenizadas en un baño termostático (40°C), previo a su análisis (principalmente aquellas muestras que se encuentren cristalizadas).

Pesar 10 g de miel y disolver en 75 mL de agua destilada libre de CO₂, en un matraz volumétrico de 250 mL; agitar y homogenizar la solución. A la solución se le adiciona NaOH (0,1M) hasta alcanzar

un valor de pH de 8,5 (acidez libre); registrando el gasto de base. Inmediatamente, 10 mL de 0.05 N de NaOH es añadida; para posteriormente volver a titular con 0,05 N de HCl hasta alcanzar un valor de pH de 8,3 (acidez láctónica); registrando el gasto de ácido. Para la acidez total, será el resultado de la suma de ambas anteriores (libre + láctónica); siendo expresado los resultados como meq/kg. La acidez láctónica (glucolactonas principalmente) es considerada como una acidez de reserva cuando la miel se vuelve alcalina (De Melo et al., 2017).

3.3. ACTIVIDAD DIASTÁSICA

La actividad diastásica es definida como la cantidad de enzima presente en la miel, la cual es capaz de convertir 0,01 g de almidón durante 1 hora a 40°C. El resultado es expresado en unidades Gothe (Schade) por gramo de miel.

REACTIVOS:

Cloruro de sodio: disolver 2,9 g de cloruro de sodio en agua y diluir en 100 mL.

Buffer acetato solución (pH 5.3): disolver 43,5 g de acetato de sodio en agua, ajustando el pH a 5,3 con una solución de ácido acético glacial (aprox. 5 mL); llevar a dilución a 250 mL con agua.

3.3.1. Determinación peso seco del almidón

Pesar aproximadamente 2.2 a 2.5 g de almidón soluble en una cápsula para secar (crisol). Dejar el almidón en una estufa a 130°C durante 90 min. Posteriormente, llevar a desecador y esperar que se estabilice hasta alcanzar peso constante.

3.3.2. Preparación de solución de almidón*

Pesar en un balón cónico de 250 mL la cantidad de 2,0 g de almidón previamente seco (sección 3.3.1). Añadir 90 mL de agua, con agitación constante para mejorar la mezcla. Llevar la suspensión de almidón rápidamente a ebullición, agitando constantemente durante 3 minutos. Inmediatamente transferir la solución a un balón volumétrico de 100 mL, enfriar rápidamente hasta temperatura ambiente, y aforar con agua destilada (100 mL).

***La solución debe ser preparada el día de uso.**

3.3.3. Solución stock de yodo*

Disolver 11 g de yodo doble sublimado y 22 g de yoduro de potasio en 30 a 40 mL de agua, y diluir a 500 mL.

****Esta solución puede mantenerse durante 1 año en una botella cerrada y en oscuridad.***

3.3.4. Solución de iodo diluida*

Disolver 20 g de ioduro de potasio en agua, agregar 2 mL de la solución stock de iodo y diluir para 500 mL.

****Esta solución debe ser utilizada durante el día, debiendo ser protegida del aire.***

3.3.5. Calibración de la solución de almidón:

Este procedimiento es realizado para determinar la cantidad de agua que es necesaria agregar a la mezcla de solución de iodo almidón, la cual deberá tener un valor de absorbancia a los 660 nm entre 0,745 – 0,770 nm.

Pipetear dentro de 6 tubos tubo de vidrio, y agregar a cada uno los siguientes volúmenes de agua: 20, 21, 22, 23, 24 y 25 mL, y adicionar 5 mL de la solución de iodo diluida (sección 3.3.4).

Empezar con el primer tubo que contiene (20 mL de agua + 5 mL de solución iodo diluida), adicionar 0.5 mL de las mezcla que contiene 10 mL de agua y 5 mL de solución de almidón (sección 3.3.2), mezclar bien y leer inmediatamente la absorbancia a 660 nm utilizando celda de 1 cm; realizando previamente el blanco con agua destilada.

Proceder de la misma forma con los siguientes tubos, hasta conseguir la absorbancia con un rango de 0,745 a 0,770.

La cantidad de agua seleccionada y adicionada a los tubos, debe ser la misma que se utiliza para la dilución de los estándares en cada determinación.

3.3.6. Preparación muestra de miel:

Pesar 10 g de miel en un vaso precipitado de 100 mL, disolver completamente con 15 mL de agua y agregar 5 mL de buffer acetato (sin calentamiento). Transferir la solución a un balón volumétrico de 50 mL, el cual contiene 3 mL de la solución de cloruro de sodio, la solución debe ser aforada con agua (solución muestra).

3.3.6.1. Determinación de la actividad en la solución muestra:

Pipetear 10 mL de la solución de la muestra obtenida en la (sección 3.3.6) en un frasco de 50 mL y llevar a un baño termorregulado a 40°C; en paralelo un segundo frasco adicionar 10 mL de la

solución de almidón (sección 3.3.2). Transcurridos 15 min, retirar 5 mL de la solución de almidón y adicionarlos dentro de la solución muestra, mezclar y comenzar a contar el tiempo desde este instante. Posteriormente, en intervalos de tiempo de 5 min (verificar tabla); retirar 0,5 mL de la solución (muestra + almidón) en un tubo de 50 mL y adicionar rápidamente a 5 mL de la solución de iodo diluida (sección 3.3.4). Posteriormente, adicionar la cantidad de agua determinada en la calibración de solución de almidón (sección 3.3.5); mezclar bien y leer inmediatamente su absorbancia a los 660 nm en una celda de 1 mL, previamente se debe haber realizado el blanco con agua.

Tabla de tiempo de acuerdo a la absorbancia 660 nm.

Absorbancia a t=5 min	Intervalo de tiempo
Abs > 0.658	10 min o más
0.658 > Abs > 0.523	5 a 10 min
0.523 > Abs > 0.456	2 a 5 min

Si la absorbancia a los t=5 min es inferior a 0.350, es recomendable que el tiempo de reacción para la primera determinación sea reducido.

3.3.7. Reacción blanco:

Añadir 10 mL de la solución muestra (sección 3.3.6), adicionar 5 mL de agua mezclando vigorosamente. Retirar 0,5 mL de esta solución y adicionar 5 mL de la solución de iodo diluida (sección 3.3.4). Posteriormente, adicionar la cantidad de agua determinada en la calibración de solución de almidón (sección 3.3.5); mezclar bien y leer inmediatamente su absorbancia 660 nm en una celda de 1 mL. Los valores de absorbancia obtenidos, deberán ser sustraídos de los valores de las muestras (resultados 3.3.6.1).

La actividad diastásica es calculada como el número diastásico, con la siguiente ecuación 1:

$$DN = \frac{60 \text{ min}}{t_x} \times \frac{0,10}{0,01} \times \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t_x} \quad (1)$$

t_x = tiempo de la reacción expresada en minutos

Es necesario que los valores de absorbancia de las soluciones de las muestras sean graficadas con el correspondiente tiempo (Abs v/s tiempo), ajustando un modelo lineal ($y=mx + n$); previamente realizando la substracción de las absorbancias obtenidas para el blanco (sección 3.3.7). La regresión

lineal debe ser trazada entre un rango de absorbancia entre 0,155 – 0,456, en orden de determinar el tiempo t_x , cuya absorbancia corresponde a un valor de 0,235.

3.4. CENIZAS

El contenido de minerales lo que se asocia al contenido de cenizas, es generalmente bajo donde es posible establecer un rango entre 0,02 – 0,3% para mieles florales, mientras que para mielatos pueden alcanzar valores de 1%. Esto se encuentra influenciado por las condiciones climáticas y suelo, así como su composición química en función de su origen floral. Dentro de los principales minerales que podemos encontrar son potasio, sodio, calcio, y manganeso (De-Melo et al., 2017).

3.4.1. Método gravimétrico

Para el contenido de cenizas se pesan entre 2 a 5 g de la muestra de miel, utilizando cápsulas de porcelana previamente ambientados (lavados y secados). Posteriormente, se realiza una pre-calcinación de las muestras evitando la pérdida de muestra debido a este proceso, primeramente se realiza la calcinación de la materia orgánica. Luego, las muestras calcinadas son colocadas en una mufla a 550°C durante 6-8 horas; determinando el peso constante de las cenizas. Para el cálculo del contenido de cenizas se utiliza la ecuación 2:

$$\text{Cenizas (\%)} = \left(\frac{m_2 - m_1}{m_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

m_0 = peso inicial de la muestra de miel (g)

m_1 = peso capsula vacía (g)

m_2 = peso final de la muestra calcinada + cápsula (g)

3.4.2. Método predictivo

Es posible predecir el contenido de cenizas de la miel, utilizando el resultado obtenido para la conductividad eléctrica (sección 3.4.1), estableciendo el contenido de cenizas (X_1) utilizando un modelo (Zappalà et al., 2005), el cual está descrito por la siguiente ecuación 3:

$$X_1 = \frac{(X_2 - 0,143)}{1,743} \quad (3)$$

Donde:

X_1 = contenido de cenizas (%)

X_2 = conductividad eléctrica, expresado en (mS/cm)

3.5. COLOR

Corresponde a una propiedad física la cual es percibida por los consumidores. Su coloración varía desde incolora (blanco agua) a amarillo claro pasando de ámbar oscuro o casi negro, y algunas veces con reflejos verdes a rojos (De Melo et al., 2017).

La determinación del color en muestras de miel se realiza mediante la lectura de absorbancia de una solución acuosa (10 g de miel en 20 mL agua; 50%) a 635 nm. Para establecer la escala en mm Pfund se utiliza la ecuación 4 (Aazza et al., 2013). Los valores de color son obtenidos mediante la correlación entre absorbancia, Tabla 3:

$$mm\ Pfund = -38,7 + (371,39 \cdot Abs_{635}) \quad (4)$$

Tabla 3: Clasificación de la coloración de miel de acuerdo a escala Pfund (color presentado en anexo).

Escala (Pfund)	Color
0 – 8 mm	Blanco agua
9 – 17 mm	Blanco extra
18 – 34 mm	Blanco
35 – 48 mm	Ámbar extra claro
49 – 83 mm	Ámbar claro
84 – 114 mm	Ámbar
> 114 mm	Ámbar oscuro

Fuente: Pfund escala de color (USDA)

3.6. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica se refiere a la habilidad de un material en conducir corriente eléctrica, y esta relacionado con el origen botánicos así como el contenido de minerales y iones inorgánicos, y de alguna manera a ácidos orgánicos, proteínas y otros componentes como azúcares, polioles y granos de polen que pueden actuar como electrolitos. Su conductividad se correlaciona con el contenido de cenizas de miel y alcalinidad de las mismas.

Para la determinación de la conductividad eléctrica, es necesario la preparación de una solución acuosa al 20% (considerando el peso seco de la muestra); la lectura debe ser realizada a 20°C, siendo expresados los resultados en mS/cm.

3.7. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

HMF es un compuesto furánico producido por la degradación de los azúcares, principalmente por la deshidratación de las hexosas en un medio ácido y, en menor medida a un intermedio de las reacciones de Maillard. El HMF es un parámetro de frescura, ya que es posible que este ausente o a niveles de trazas para mieles frescas. Niveles altos de HMF es posible que se encuentren en forma natural en mieles de áreas de climas cálidos, como tropicales y subtropicales. Su concentración se ve incrementado durante procesos de calentamiento, y además por la adulteración con azúcares comerciales, como también por el almacenamiento.

3.7.1. Método espectrofotométrico (White)

Para la determinación del contenido de HMF, se pesan 5 g de miel, los cuales son disueltos en 25 mL de agua; posteriormente son transferidos dentro de un matraz volumétrico de 50 mL; añadiendo 0,5 mL de solución de Carrez I, homogenizando toda la solución. Luego se adiciona 0,5 mL de solución de Carrez II, y se agita. A continuación, la solución se afora hasta los 50 mL con agua destilada (se puede agregar una gota de etanol para evitar espuma). Luego, la solución es filtrada utilizando papel filtro, siendo desechados los primeros 5 a 10 mL de la solución. Se retiran 5 mL de la solución filtrada, siendo colocadas en 2 tubos (18 x 150 mm). Para el primer tubo se adicionan 5 mL de agua destilada (**solución muestra**) y al segundo se adiciona 5 mL de solución de bisulfato de sodio 0,2% (**solución referencia**).

Luego, se determina la absorbancia tanto la solución muestra y la solución de referencia a 284 y 336 nm, respectivamente en cubeta de cuarzo de 10 mm dentro de la primera hora de reacción.

Sí la absorbancia a 284 nm excede el valor de 0,6; debe diluir con agua tanto la solución muestra y la solución de referencia con bisulfito de sodio con el mismo objetivo. Considerar la dilución utilizando la siguiente relación (ecuación 5):

$$\text{Dilución, } D = \frac{\text{Volumen final de la solución muestra}}{10} \quad (5)$$

Para realizar el cálculo del contenido de HMF, utilizar la siguiente ecuación 6:

$$\text{HMF} = (\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 149.7 \times 5 \times \left(\frac{D}{W}\right) \quad (6)$$

Donde:

D= factor de dilución

W= peso en gramos de la muestra de miel

Solución Carrez I: diluir 15 g hexacianoferrato de potasio ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) en matraz volumétrico de 100 mL de agua hasta aforar.

Solución Carrez II: diluir 30 g acetato de zinc ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) en matraz volumétrico de 100 mL de agua hasta aforar.

Solución de bisulfito de sodio: disolver 0.20 g de bisulfito de sodio ($NaHSO_3$ o metabisulfito, $Na_2S_2O_5$), en matraz volumétrico de 100 mL de agua hasta aforar. Preparar diariamente.

3.7.2. Método HPLC para HMF

Para la determinación del contenido de HMF, se pesan 5 g de muestra de miel, y son diluidos en 50 mL agua Milli-Q; posteriormente es filtrada utilizando filtro de membrana de nylon (0,45 µm). Siendo inyectado 20 µL de la solución acuosa en la columna. El equipo de HPLC presenta un detector UV. La columna cromatográfica necesaria es una RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm); siendo una fase móvil isocrática compuesta por agua/metanol (90/10%, v/v). La longitud de onda seleccionada es de 285 nm. Para el contenido de HMF fue necesario realizar una comparación mediante una curva de calibración de una solución standard de HMF en agua [0-8 µg/mL], siendo los resultados expresado en mg/kg. El tiempo retención aproximado de HMF con las condiciones antes descritas se encuentra entre los 8-9 min (1 mL/min).

3.8. HUMEDAD

El contenido de humedad es un parámetro de calidad que se encuentra relacionada con la vida útil de la miel. Normalmente, el contenido de humedad oscila entre los 13 a 25%, donde su valor optimo es 17%. Por el contrario, mieles cuya humedad es superior a 18% son propensas a fermentar.

Para el contenido de humedad se utiliza la metodología propuesta por la AOAC (969.38). La temperatura en la determinación deberá estar refleja en el índice de refracción. Previo al análisis el refractómetro tendrá que ser calibrado con agua destilada; para esto el índice de refracción a 20°C del agua, deberá presentar un valor de 1,3330.

Antes de realizar la determinación del contenido de humedad en la miel, se hace necesaria la eliminación de cristales. Para su eliminación, la miel deberá ser solubilizado previamente, mediante la aplicación de un baño termorregulado a una temperatura de 40°C.

El índice de refracción deberá ser determinado a 20°C, utilizando refractómetro digital o Abbe, evaluando el porcentaje de humedad utilizando la fórmula empírica o relativo a la tabla 4 de conversión en sección anexo (AOAC, 2012).

Factor de corrección para la temperatura:

Temperatura sobre 20°C: se deberá añadir 0.00023 por cada grado

Temperatura debajo 20°C: se deberá restar 0.00023 por cada grado

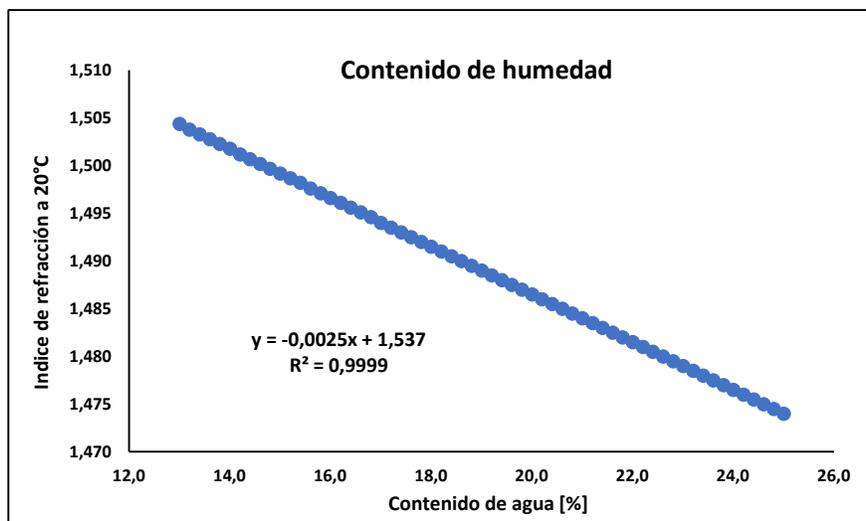


Figura 1. Relación del contenido de agua v/s índice de refracción, modelo obtenido a partir de la tabla de la AOAC.

3.9. pH

El pH de la miel, no está directamente relacionado con la acidez, debido a que algunos componentes de la miel poseen la capacidad de actuar como buffer (ej. sales y algunos compuestos minerales). El rango de pH varía entre 3,4 a 6,4. En general, para mieles florales su rango va desde los 3,3 a 4,6; existiendo algunas excepciones como la miel de castaño donde puede presentar pH desde 5 a 6 y para el caso de los mielatos valores superiores 4,5 a 6,5.

La determinación del pH en las muestras de miel, se realizará utilizando una solución acuosa de 10 g de miel en 75 mL de agua milli-Q libre de CO₂. Esta misma solución, podrá ser utilizada para la determinación de la acidez libre.

3.10. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS INSOLUBLES

Pesar 20 g de miel, y disolver en 200 mL de agua a 80°C, mezclar bien. En un crisol de vidrio de 15 a 40 µm filtrar la solución. Lavar la solución cuidadosamente y utilizando bastante agua tibia hasta remover el azúcar. Llevar a secado a 135°C por una hora, hasta peso constante.

$$\% \text{ materia insoluble en g/100g} = \frac{m}{m_1} \times 100 \quad (7)$$

Donde:

m = masa de material insoluble recolectado (g)

m_1 = masa de miel inicial (g)

4. REFERENCIAS

- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D., Miguel, M.G., 2013. Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial portuguese honeys. *J. Food Sci.* 78. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12201>
- Alvarez-Suarez, J., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L., Giampieri, F., 2014. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* 3, 420–432. <https://doi.org/10.3390/foods3030420>
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., de Torres, C., Pérez-Coello, M.S., 2010. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Res. Int.* 43, 2335–2340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.007>
- Codex, A., 2011. CODEX Norma Para La Miel 1, 1–9.
- Da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R., 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- INN, 2007. Miel de abejas - Denominaciones y requisitos (NCh616-2007) 8.
- International Honey Commission (ICH), 2009. Harmonised Methods of the International Honey Commission. *Bee Prod. Sci.* 1–63. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Marcazzan, G.L., Mucignat-Caretta, C., Marina Marchese, C., Piana, M.L., 2018. Una revisión de los métodos para el análisis sensorial de la miel. *J. Apic. Res.* 57, 75–87. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1357940>
- Machado De-Melo, A., de Almeida-Muradian, L., Sancho, M.T, Pascual-Maté, A., 2017. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J. Apic. Res.* 57, 5-37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
- Pita-Calvo, C., Guerra-Rodríguez, M.E., Vázquez, M., 2017. Analytical methods used in the quality control of honey. *J. Agric. Food Chem.* 65, 690–703. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04776>
- Sanz, M., González, M., de Lorenzo, C., Sanz, J., Martínez-Castro, I., 2004. Carbohydrate composition and physico chemical properties of artisanal honeys from Madrid(Spain): occurrence of *Echium* sp honey. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1577–1584. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1823>
- Serra Bonvehi, J., Ventura Coll, F., Orantes Bermejo, J.F., 2019. Characterization of avocado honey (*Persea americana* Mill.) produced in Southern Spain. *Food Chem.* 287, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.068>
- Zappalà, M., Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., 2005. Methods for the determination of HMF in honey: A comparison. *Food Control* 16, 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.03.006>

5. ANEXOS

Tabla 4. Relación entre el contenido de agua y el índice de refracción determinado mediante refractómetro Abbe.

Contenido de agua (g/100 g)	Índice refracción 20°C	Contenido de agua (g/100 g)	Índice refracción 20°C
13,0	1,5044	19,2	1,4885
13,2	1,5038	19,4	1,4880
13,4	1,5033	19,6	1,4875
13,6	1,5028	19,8	1,4870
13,8	1,5023	20,0	1,4865
14,0	1,5018	20,2	1,4860
14,2	1,5012	20,4	1,4855
14,4	1,5007	20,6	1,4850
14,6	1,5002	20,8	1,4845
14,8	1,4997	21,0	1,4840
15,0	1,4992	21,2	1,4835
15,2	1,4987	21,4	1,4830
15,4	1,4982	21,6	1,4825
15,6	1,4976	21,8	1,4820
15,8	1,4971	22,0	1,4815
16,0	1,4966	22,2	1,4810
16,2	1,4961	22,4	1,4805
16,4	1,4956	22,6	1,4800
16,6	1,4951	22,8	1,4795
16,8	1,4946	23,0	1,4790
17,0	1,4940	23,2	1,4785
17,2	1,4935	23,4	1,4780
17,4	1,4930	23,6	1,4775
17,6	1,4925	23,8	1,4770
17,8	1,4920	24,0	1,4765
18,0	1,4915	24,2	1,4760
18,2	1,4910	24,4	1,4755
18,4	1,4905	24,6	1,4750
18,6	1,4900	24,8	1,4745
18,8	1,4895	25,0	1,4740
19,0	1,4890		

HONEY COLOR GUIDE

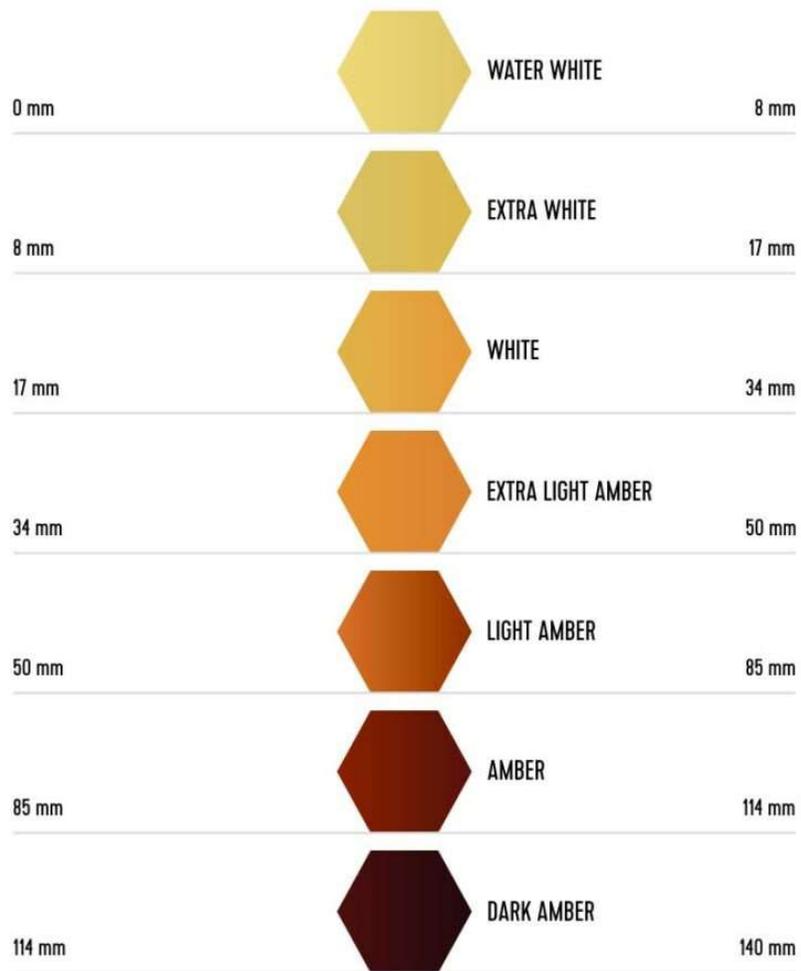


Figura 2. Clasificación de la coloración de la miel de acuerdo a escala Pfund (mm) (Fuente: <https://bluenicoya.com/wp-content/uploads/2021/04/honey-color-table-731x1024.jpg>).