

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA EVALUAR LA CALIDAD  
EN MIELES DEL NORORIENTE COLOMBIANO**

**CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Bucaramanga  
2016**

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA E IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA EVALUAR LA CALIDAD  
EN MIELES DEL NORORIENTE COLOMBIANO**

**CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ**

**Proyecto de Grado en modalidad Investigación Para optar al título de  
Químico**

**Director de proyecto: Dr. Luis Javier López Giraldo (Ing. Químico)  
Codirector del proyecto: Qco. Arley René Villamizar Jaimes (Químico)**

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Bucaramanga  
2016**

Dedicado a la persona más influyente en mi vida, la que hizo de mí un ser consciente y  
consecuente con la sociedad y el mundo...

A ti, padre.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Laboratorio de alimentos, CICTA, especialmente, a mi Director de Proyecto, el profesor Luis Javier López y a mi Codirector, Arley René Villamizar, por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por depositar su confianza en mi trabajo y por permitirme enriquecer en conocimientos. También, agradecer a Luis Carlos, Alejandra, Sergio y a los demás profesionales y estudiantes del laboratorio por compartir su conocimiento y experiencia conmigo.

Agradecerle a mi familia, que ha sido un apoyo importante y que me han dado las herramientas necesarias para alcanzar esta meta. Agradecerle a mi cachetona Stephany, que me ha estado acompañando los últimos años con su amor y ternura, y que ha hecho de mí un hombre cada día más enamorado de ella y sus hermosos detalles.

Agradezco infinitamente al profesor Juan Manuel Urbina, por darme ejemplo de vida, por enseñarme el camino a la perfección en pequeños detalles, por enseñarme a ser un buen profesional y sobre todo a ser una excelente persona; a él mi más grande aprecio y respeto.

Por último, agradezco a los profesores Herminsul de Jesús Cano Calle y Elena Stashenko, por su compromiso con la evaluación de mi proyecto de grado, y a todas aquellas personas gratas que aportaron algo a mi formación profesional e integral.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	<b>17</b>
1 MARCO TEÓRICO	<b>20</b>
1.1 AZÚCARES	<b>20</b>
1.2 HIDROXIMETILFURFURAL	<b>22</b>
1.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	<b>23</b>
1.3.1 Generalidades	<b>23</b>
1.3.2 Clasificación	<b>23</b>
1.3.3 Preparación de la muestra	<b>25</b>
1.3.4 Detectores	<b>25</b>
2 ESTADO DEL ARTE	<b>27</b>
2.1 ANTECEDENTES DE CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES	<b>27</b>
2.2 ANTECEDENTES DE CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN MIELES	<b>30</b>
2.3 ANTECEDENTES DE CUANTIFICACIÓN DE HMF EN MIELES	<b>36</b>
2.4 CRITERIOS FÍSICOQUÍMICOS DE ACEPTABILIDAD EN MIELES	<b>37</b>
2.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS EN MIELES	<b>38</b>
3 OBJETIVOS	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	<b>40</b>
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<b>40</b>
4 MATERIALES Y MÉTODOS	<b>41</b>
4.1 PARTE EXPERIMENTAL	<b>41</b>

4.1.1	Reactivos, muestras y material de referencia	41
4.1.2	Instrumentación	41
4.1.3	Preparación de la curva de calibración	42
4.1.4	Análisis instrumental	42
4.1.5	Análisis fisicoquímicos	43
4.2	EVALUACIÓN DEL MÉTODO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
4.2.1	Límite de detección (LOD)	44
5.2.2.	Límite de cuantificación (LOQ)	44
5.2.3	Linealidad	44
5.2.4	Exactitud	45
5.2.5	Precisión	45
5.2.6	Análisis estadístico	46
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1	PRUEBAS PRELIMINARES	47
5.2	ANÁLISIS DE PATRONES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN	47
5.3	ANÁLISIS DE AZÚCARES EN MIELES	48
5.4	ANÁLISIS DE HMF EN MIELES	53
5.5	CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LAS MIELES	57
5.6	EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LOS REQUISITOS	60
5.7	EVALUACIÓN DE MÉTODO	61
6	CONCLUSIONES	63
	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS	71

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Formas de una aldohexosa [Tomado de la ref. 5].	<b>21</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura química del HMF [Tomado de la Ref 9].	<b>22</b>
<b>Figura 3.</b> Cromatograma HPLC-RI representativo de una muestra de leche. Columna Luna 5u NH <sub>2</sub> (250*4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, Phenomenex); modo isocrático Acetonitrilo 76% y Agua destilada 24% [Tomado de la Ref. 30].	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Cromatogramas HPLC-RI de los estándares de sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol (a); hojas (b), y cáscara de manzana (c). Columna Carbosep Coregel 87H3 (300*7.8 mm). [Tomado de la Ref. 7].	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b> Cromatograma HPLC-RI de una muestra de miel de Nueva Zelanda. Columna Shodex KS-801; modo isocrático agua grado HPLC 1 mL/min [Tomado de la Ref. 37].	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Perfiles cromatográficos por HPLC-RI de muestras de miel natural adulteradas con jarabe de fructosa y sacarosa en concentraciones conocidas. Columna Agilent Zorbax; acetona 80%, agua 20% [Tomado de la Ref. 1].	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico de azúcares por HPLC-RI en miel Saffron (1: Fructosa, 2: Glucosa, 3: Xilosa, 4: Maltosa, 5: Isomaltosa, 6: Trehalosa, 7: Sacarosa, 8: Rafinosa, 9: Maltotriosa). Columna Waters X-bridge Amide 5 µm (250*4.66 mm); acetonitrilo 80%, agua 20% [Tomado de la Ref. 39].	<b>34</b>
<b>Figura 8.</b> Concentraciones de HMF encontradas en diferentes mieles de Malasia [Tomado de la Ref. 40].	<b>36</b>
<b>Figura 9.</b> Cromatograma HPLC-RI de una miel de Pamplona (1: Sacarosa, 2: Glucosa y 3: Fructosa).	<b>49</b>

<b>Figura 10.</b> Distribución de caja y bigotes del porcentaje de sacarosa en las mieles evaluadas.	<b>51</b>
<b>Figura 11.</b> Distribución de caja y bigotes del porcentaje de glucosa en las mieles evaluadas.	<b>51</b>
<b>Figura 12.</b> Distribución de caja y bigotes del porcentaje de fructosa en las mieles evaluadas.	<b>52</b>
<b>Figura 13.</b> Cromatograma HPLC-UV-Vis de una muestra de miel de Pamplona 1) HMF.	<b>54</b>
<b>Figura 14.</b> Distribución de caja y bigotes de concentración de HMF en mieles de Vetas, Barranquilla y Pamplona.	<b>55</b>
<b>Figura 15.</b> Distribución de caja y bigotes de concentración de HMF en mieles de Cúcuta, Los Llanos, Charalá, San Gil y Ocaña.	<b>56</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Variables del método HPLC para la determinación de azúcares [Tomado de la Ref. 27].	<b>28</b>
<b>Tabla 2.</b> Resultados de la cantidad de fructosa y glucosa y su relación [Tomado de la Ref. 34].	<b>31</b>
<b>Tabla 3.</b> Principales condiciones cromatográficas para la determinación de azúcares.	<b>35</b>
<b>Tabla 4.</b> Criterios fisicoquímicos de las mieles aceptables para su comercialización.	<b>38</b>
<b>Tabla 5.</b> Características fisicoquímicas reportadas por Kadri <i>et al.</i> [Tomado de la Ref. 44].	<b>38</b>
<b>Tabla 6.</b> Parámetros del equipo de HPLC para el análisis de azúcares.	<b>41</b>
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones de los patrones utilizados para las curvas de calibración.	<b>42</b>
<b>Tabla 8.</b> Tiempos de retención de los analitos identificados por HPLC.	<b>47</b>
<b>Tabla 9.</b> Características de las curvas de calibración.	<b>48</b>
<b>Tabla 10.</b> Tiempos de retención de los azúcares en mieles.	<b>49</b>
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la prueba F de Fischer para el análisis de azúcares.	<b>50</b>
<b>Tabla 12.</b> Contenido de azúcares en mieles colombianas.	<b>50</b>
<b>Tabla 13.</b> Tiempos de retención del HMF en mieles.	<b>53</b>
<b>Tabla 14.</b> Concentración de HMF en mieles colombianas.	<b>55</b>
<b>Tabla 15.</b> Resultados de la prueba de Fischer para la determinación de características fisicoquímicas.	<b>57</b>

<b>Tabla 16.</b> Resultados de características fisicoquímicas de las mieles evaluadas.	<b>58</b>
<b>Tabla 17.</b> Cumplimiento de criterios fisicoquímicos en las mieles evaluadas.	<b>60</b>
<b>Tabla 18.</b> Parámetros de la linealidad del método.	<b>61</b>
<b>Tabla 19.</b> Resultados de recuperación.	<b>62</b>

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Tabla de correlación del índice de refracción con la humedad en mieles.	<b>71</b>
<b>Anexo B.</b> Tabla de datos de concentraciones de azúcares en las mieles.	<b>72</b>
<b>Anexo C.</b> Tabla de datos de concentraciones de HMF en las mieles.	<b>73</b>
<b>Anexo D.</b> Curva de calibración del patrón de sacarosa.	<b>74</b>
<b>Anexo E.</b> Curva de calibración del patrón de glucosa.	<b>74</b>
<b>Anexo F.</b> Curva de calibración del patrón de fructosa.	<b>75</b>
<b>Anexo G.</b> Curva de calibración del patrón de HMF.	<b>75</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
RI	Índice de refracción
UV-Vis	Ultravioleta-visible
PAD	Detector de arreglo de fotodiodos
DAD	Detector de arreglo de diodos
F/G	Relación fructosa/glucosa
F+G	Contenido de azúcar reductor (fructosa más glucosa)
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
% R	Porcentaje de recuperación
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación de Pearson

## RESUMEN

**TITULO:** Caracterización fisicoquímica e implementación de un método analítico por cromatografía líquida para evaluar la calidad en mieles del nororiente colombiano<sup>1</sup>

**AUTOR:** CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ<sup>2</sup>

**PALABRAS CLAVE:** Cromatografía, azúcares, método analítico.

### DESCRIPCIÓN:

La miel ha sido uno de los alimentos naturales más comercializados alrededor del mundo, constituida por azúcares, ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos libres, compuestos fenólicos, minerales, enzimas y vitaminas. Estos constituyentes hacen de la miel un alimento que posee actividades antifúngica, anticarcinogénica, antiviral, antibacterial y antiinflamatoria. Debido estas características, la miel es apetecida por los consumidores para una alimentación saludable sobre su calidad de vida. Sin embargo, el precio asociado al producto ha generalizado en prácticas para reducir costos de producción como la adulteración por adición de azúcares, que conduce al deterioro de las propiedades biológicas y nutricionales que la caracterizan.

Aunque existe reglamentación por parte del Ministerio de la Protección Social de Colombia para caracterizar la calidad de mieles; quizá, de nuestro conocimiento, el país no cuenta con métodos cromatográficos para seguir procesos de adulteración de mieles. Es así que, el objetivo de este trabajo es evaluar la calidad de las mieles por medio de la implementación de un método analítico para el análisis de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF utilizando HPLC con detector UV-Vis y detector de índice de refracción (RI); y por medio de la determinación de algunas características fisicoquímicas.

Los resultados obtenidos por el método HPLC fueron validados usando cinco figuras de mérito. Entre ellas sobresalen la linealidad y la repetibilidad con  $R^2 > 0,99$  y coeficientes de variación  $< 5\%$ , respectivamente. Además, se confirmó que la relación fructosa/glucosa (F/G) en mieles de Vetas (1,22), Barranquilla (1,14) y Pamplona (1,15) cumplen con el intervalo (1,1 a 1,3) definido en numerosas publicaciones internacionales para mieles naturales. Para la concentración de HMF, las mieles de Vetas (14,30), Barranquilla (11,37) y Pamplona (51,82) fueron inferiores a límite máximo permitido por la norma del Ministerio de la Protección Social de Colombia, que es  $\leq 60$  mg/kg.

---

<sup>1</sup> Trabajo de grado

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Dr. Luis Javier López Giraldo.

## ABSTRACT

**TITLE:** Physico-chemical characterization and implementation of an analytical method by liquid chromatography to evaluate quality of northeast colombian honeys<sup>1</sup>

**AUTHOR:** CRISTIAN JAHIR MURILLO MÉNDEZ<sup>2</sup>

**KEYWORDS:** Liquid chromatography, sugars, analytical method.

### DESCRIPTION:

Honey has been one of the most natural foods marketed around the world. This is making of sugars, organic acids, proteins, free amino acids, phenolic compounds, minerals, enzymes and vitamins. These constituents make honey a food with antifungal, anticarcinogenic, antiviral, antibacterial and anti-inflammatory activities. Because of these characteristics, honey is desired by consumers for healthy eating on their quality of life. However, the price associated with the product has widespread practices to reduce production costs as adulteration by addition of sugars, which leads to deterioration of biological and nutritional properties that characterize it.

Although there is regulation by the Ministry of Social Protection of Colombia to characterize the quality of honey; perhaps, of our knowledge, the country has not chromatographic methods for monitoring processes for adulteration of honey. Thus, the aim of this study is to evaluate the quality of honey by the implementation of an analytical method for the analysis of sucrose, glucose, fructose and HMF using HPLC with UV-Vis detector and detector refractive index (RI); and by the determination of some physicochemical characteristics.

The results obtained by the HPLC method was validated using five figures of merit. Among them, they stand linearity and repeatability with  $R^2 > 0.99$  and coefficients of variation  $< 5\%$ , respectively.

In addition, it was confirmed that fructose/glucose ratio (F/G) in Vetas (1,22), Barranquilla (1,14) and Pamplona (1,15) honeys meet the range defined in numerous international publications for natural honeys (1,1 to 1,7). As regards the content of HMF, Vetas (14,30), Barranquilla (11,37) and Pamplona (51,82) honeys were lower than maximum permitted by the standard of the Ministry of Social Protection of Colombia, which is  $\leq 60$  mg/kg.

---

<sup>1</sup> Bachelor Thesis

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Dr. Luis Javier López Giraldo.

## INTRODUCCIÓN

La miel natural se ha considerado como una buena fuente nutricional, ya que está constituida en su mayoría por azúcares, como la glucosa y la fructosa, y, en una menor proporción, por una variedad de sustancias como ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos libres, compuestos fenólicos, minerales, enzimas y vitaminas. Además, la miel natural se considera como un alimento con propiedades biológicas beneficiosas, en estudios anteriores se ha demostrado que posee actividades antifúngica, anticarcinogénica, antiviral, antibacterial y antiinflamatoria (Yilmaz *et al.* 2014).

Estas características de la miel natural hacen de esta un producto exclusivo y costoso en comparación con otros endulzantes. Por ello, su fabricación en la apicultura se ha caracterizado en los últimos años por disminuir sus costos de producción logrando de esta manera competir con otros endulzantes en el mercado. Una de las prácticas comunes para reducir los costos de producción es su adulteración mediante la adición de azúcares, como fructosa y glucosa, cuando se trata de obtener un producto con propiedades organolépticas similares a la miel natural, pero a un menor costo. Esto ha conducido al deterioro de las propiedades biológicas y nutricionales, que caracterizan a la miel natural.

En la región del nororiente colombiano existen zonas potenciales para la fabricación de productos a base de miel, como Santander, donde estas se han trabajado y explotado de manera informal, dejando a un lado las técnicas adecuadas de su producción y la caracterización de su autenticidad de los productos que pueden entrar al mercado.

En el país uno de los problemas sustanciales de la apicultura radica en la forma de fabricar y comercializar los productos a base de miel. Según Arturo Silva Pérez (Semana 2016), fundador de Apired (la cual se encarga de la elaboración de

productos derivados de la miel en Huila), el problema del país es la falencia en la tecnificación de la actividad mielera para poder obtener el registro INVIMA y entrar a los grandes mercados, pues la industria de la miel se hace de manera informal y sin tener en cuenta herramientas técnicas e instrumentales (Semana 2016).

Debido a las pocas técnicas adecuadas que se encuentran en la apicultura para la producción de mieles, a la adulteración de estos productos y a las condiciones inadecuadas de almacenamiento, se tiene la necesidad de implementar técnicas que permitan determinar la calidad de los productos a base de miel; además, para garantizar al consumidor las propiedades nutricionales del producto que adquiere.

Debido a ello, se hace hincapié en la importancia de encontrar un método que sea estable, confiable, económico y sensible para la detección de sus diversas adulteraciones. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) se perfila como un método adecuado para la detección de los principales componentes de la miel, y evaluar su calidad por medio de su composición natural.

El Laboratorio de Alimentos, CICTA de la Universidad Industrial de Santander, cuenta con un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) *Thermo Scientific* y un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) en serie con un detector de índice de refracción (RI) para realizar los análisis de azúcares y demás componentes en la miel. Aunque en publicaciones anteriores se encuentran estudios de determinación de azúcares en lodos, productos lácteos, frutas y jugos con variables instrumentales similares a estas, se hace necesario implementar una metodología analítica utilizando HPLC para el análisis de glucosa, fructosa, sacarosa e hidroximetilfurfural (HMF) en una matriz de miel de abejas con buena precisión y sensibilidad.

Así mismo, el Laboratorio de Alimentos CICTA, en su misión de extensión, está muy interesado en ofrecer este tipo de servicios a la cadena de apicultores con el fin de

que estos últimos puedan reportar en sus etiquetas el contenido de sus características fisicoquímicas dentro de los criterios consignados en la resolución 1057 del Ministerio de la Protección Social de Colombia (Ministerio de La Protección Social 2010).

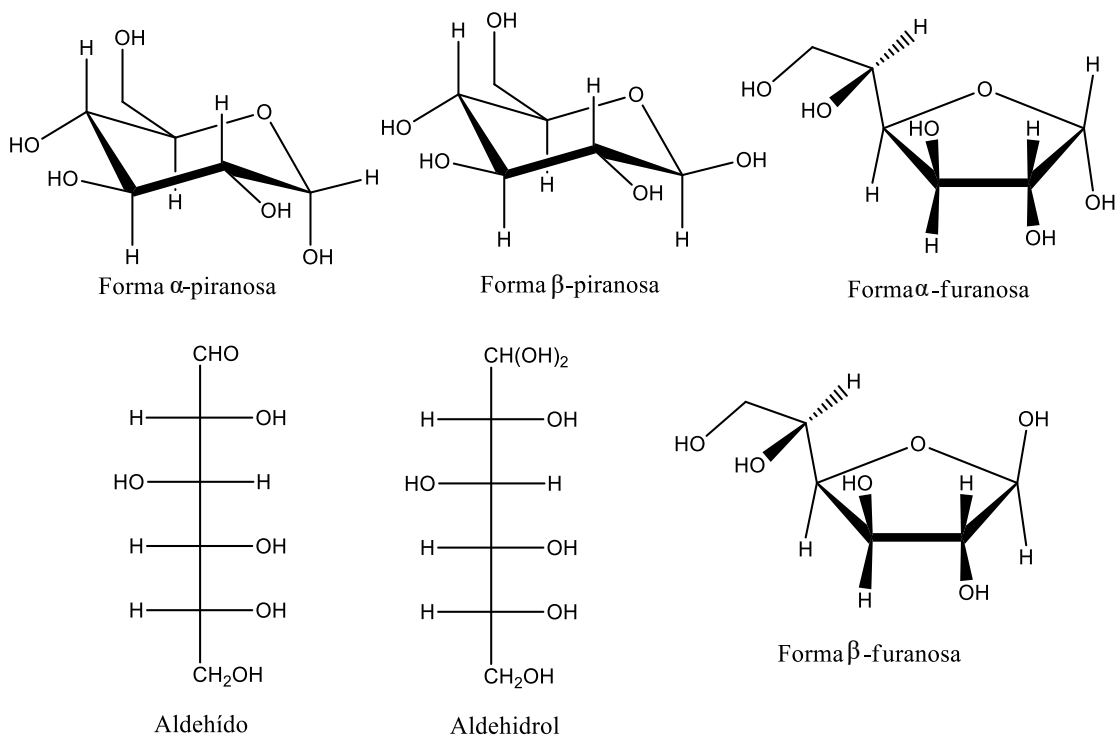
# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 AZÚCARES

Los azúcares hacen referencia a una amplia gama de compuestos orgánicos aldehídos y cetonas polihidroxilados (McMurry 2010). Los azúcares son los bloques de construcción de los hidratos de carbono, en los cuales suelen ser pensados como moléculas simples, cuya única función es la provisión de energía y la construcción de pared celular; pero también se encuentran en estructuras más complejas, como el ADN, los glicolípidos y en algunas enzimas con glicoproteínas (Clayden *et al.* 2001).

Los azúcares se clasifican en dos tipos: monosacáridos o azúcares simples y oligosacáridos o azúcares complejos formados por dos o más monosacáridos, que se pueden convertir por hidrólisis en azúcares simples (McMurry 2010). Los azúcares simples se clasifican en dos tipos: la aldosa que consta de un aldehído polihidroxilado, y la cetosa, una cetona polihidroxilada (Clayden *et al.* 2001). Existen muchas formas en las cuales se puede representar a una aldosa o cetosa, pero la forma más adecuada de representarla es cíclica, de forma furanosa o piranosa (Finch 1999). Los azúcares simples, cuando están en solución, se encuentran en equilibrio en forma cíclica y acíclica de seis maneras, en las cuales las formas acíclicas están presentes en menos del 1% (Figura 1) (Finch 1999).

Figura 1. Formas de una aldohexosa [Tomado de Clayden *et al.* 2001].



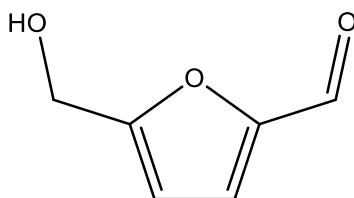
Una descripción detallada de un monosacárido, en el estado sólido cristalino no desordenado, está basada en los siguientes descriptores: número de carbonos (pentosa de 5; hexosa de 6), configuración relativa de sus centros quirales (glucosa, gulosa, manosa), quiralidad (D- o L-), tamaño del anillo (forma piranosa o furanosa) y configuración anomérica ( $\alpha$ - o  $\beta$ -) (Finch 1999).

Los azúcares tienen muchos roles en todos los aspectos de la vida, como materiales estructurales, sustratos respiratorios para la generación de energía e intermediarios metabólicos, y en la síntesis de macromoléculas y otros componentes celulares (Filip *et al.* 2016). Entre los muchos compuestos biológicos que se encuentran en la naturaleza, la glucosa es sin duda uno de los más importantes biológicamente, debido a que la glucosa es responsable de generar gran parte de la energía potencial necesaria para el crecimiento y la reproducción exitosa (Galant *et al.* 2015).

## 1.2 HIDROXIMETILFURFURAL

El 5-hidroximetilfurfural, conocido también como 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldehído o HMF (Figura 2), es un compuesto furánico que se forma como un intermediario de la reacción de Maillard y que proviene de reacciones de deshidratación directa de los azúcares reductores bajo condiciones ácidas durante los tratamientos térmicos aplicados a las comidas (Capuano y Fogliano 2011). El HMF se produce durante calentamiento de alimentos ricos en azúcares, en productos caramelizados o en mieles, donde está más relacionado con condiciones de temperatura superiores a 40 °C, el tiempo de almacenamiento y su composición (Capuano y Fogliano 2011; Fallico *et al.* 2004).

Figura 2. Estructura química del HMF [Tomado de Capuano y Fogliano 2011].



Se ha reportado, que el HMF a altas concentraciones es citotóxico, irritante a los ojos, tracto respiratorio y piel; con una dosis letal de 2,5 g/kg por ingesta en ratas (Capuano y Fogliano 2011). También, se detectaron actividades carcinogénica, irritante del colon e inductor de papilomas en la piel (Capuano y Fogliano 2011; Fallico *et al.* 2004). Se ha evidenciado, que el HMF se absorbe rápidamente en el tracto gastrodigestivo en ratas y ratones, y que la velocidad de absorción se incrementa a medida que la concentración de HMF aumenta (Capuano y Fogliano 2011).

En la miel, hay varios factores que afectan los niveles de HMF, tales como la temperatura, el tiempo de calentamiento y el almacenamiento, el uso de recipientes

metálicos y propiedades fisicoquímicas de la miel como el pH, la acidez total y el contenido de cenizas y minerales (Fallico *et al.* 2004).

### 1.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

1.3.1 **Generalidades:** La cromatografía es un método analítico de separación de mezclas en el cual los analitos presentes en una mezcla se separan al ser distribuidos en dos fases, una fase móvil o eluyente, que puede ser líquida, gaseosa o un fluido supercrítico y una fase estacionaria, que puede ser líquida, gel o sólida (Bélanger *et al.* 1997; Parris 1984). La cromatografía involucra la separación de componentes de una mezcla en función de sus constantes de equilibrio de partición ( $K_o$ ) entre las dos fases (Hamilton y Sewell 1982). La partición es un fenómeno importante, sin tal, no llegaría a ocurrir la separación cromatográfica (Hamilton y Sewell 1982).

1.3.2 **Clasificación:** La cromatografía se clasifica por fase, por técnica, por método de desarrollo y por mecanismo, donde, según su técnica, está cromatografía planar, que se lleva a cabo sobre una superficie y cromatografía de columna, que se lleva a cabo en tubos empacados (Bélanger *et al.* 1997). La cromatografía líquida es una cromatografía en la cual la fase móvil es líquida. Esta puede ser planar, encontrada en cromatografía de papel o de capa fina; o de columna, como exclusión por tamaño o intercambio iónico (Bélanger *et al.* 1997).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (en inglés *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) es un tipo de cromatografía líquida en donde la separación ocurre entre un solvente como fase móvil y una columna empacada como fase estacionaria (Paré y Bélanger 1997). La cromatografía líquida clásica ha sido mejorada por HPLC (superando las desventajas que esta poseía en el tiempo y la dificultad del análisis) haciendo presión al eluyente, tomando una analogía de la

cromatografía de gases (en inglés *Gas Chromatography*, GC) (Hamilton y Sewell 1982).

Dependiendo de la naturaleza física de la fase estacionaria, la cromatografía líquida se divide en cuatro tipos: cromatografía de adsorción, cromatografía de partición, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño (Paré y Bélanger 1997).

Otra de las clasificaciones de la cromatografía líquida es por la naturaleza química de la fase estacionaria. Cromatografía de fase normal: la fase estacionaria es muy polar (por ejemplo, sílice o alúmina) y la fase móvil es poco polar (por ejemplo, hexano); de este modo, las muestras polares son retenidas más fuertemente por la columna, Por lo tanto, el detector analizará primero los compuestos poco polares. Cromatografía en fase reversa: la fase estacionaria no es tan polar (por ejemplo, poliestireno) como la fase móvil (por ejemplo, agua o metanol), donde los compuestos poco polares se retienen más tiempo en la columna (Paré y Bélanger 1997).

En el análisis por HPLC, que se desarrolla por elución, la fase móvil puede tener dos características del desarrollo cromatográfico: la elución isocrática, en la cual la fase móvil está compuesta por uno o más solventes en proporciones fijas durante todo el análisis, sin que cambie la polaridad del eluyente durante el análisis; y la elución por gradiente que se lleva a cabo variando la composición de los disolventes, de modo que su polaridad se modifique durante el tiempo de análisis (Paré y Bélanger 1997).

**1.3.3 Preparación de la muestra:** La preparación de muestras de mieles, antes del análisis por HPLC, no requiere de derivatización o purificación de la muestra, limitándose a solo una filtración y una dilución previa al análisis (Montero *et al.* 2004). Algunas muestras, como bebidas, frutas y leches, requieren degasificación, desengrasado o extracción en fase sólida (SPE) antes de inyectar al equipo (Montero *et al.* 2004).

**1.3.4 Detectores:** Un detector en cualquier equipo cromatográfico es aquel que monitoriza los componentes de la muestra que salen de la columna a través de una señal que se obtiene en función del tiempo. Esta función está relacionada a una señal eléctrica, que es proporcional a la cantidad de componentes que salen de la columna, que puede ser usada para operar un sistema de procesamiento o grabación de datos tal como los potenciométricos, un integrador electrónico o un sistema de cómputo (Swartz 2010).

En general, los métodos cromatográficos poseen dos clases de detectores, detectores selectivos, que dan diferente respuesta dependiendo de las propiedades químicas y estructurales del analito (por ejemplo, detectores de absorbancia y fluorescencia), y los detectores universales, que su respuesta es similar para la mayoría de compuestos (por ejemplo, detector de índice de refracción) (Swartz 2010).

Uno de los problemas fundamentales de la técnica de HPLC consiste en que sus detectores no son universales, conduciendo a la premisa de utilizar detectores de baja sensibilidad que puedan determinar propiedades físicas generales, como conductividad e índice de refracción, o detectores de alta sensibilidad que puedan determinar propiedades fisicoquímicas específicas, como absorbancia, en la ciencia del análisis instrumental (Engelhardt 1979).

Un detector “ideal” en HPLC es aquel que posea una sensibilidad alta, buena estabilidad, buena reproducibilidad y respuesta lineal (Montero *et al.* 2004). Tal detector ideal no existe, pero puede haber detectores que se asemejen a las propiedades encontradas para un analito en específico, como el detector RI que se utiliza frecuentemente para el análisis de azúcares en alimentos (Montero *et al.* 2004), pero poco sensible (Magwaza y Opara 2015).

El detector utilizado para determinar y cuantificar hidroximetilfurfural (HMF) es el detector ultravioleta-visible (UV-Vis), uno de los detectores más comunes de propiedad específica, que responde y da señal a analitos que absorben la radiación electromagnética de la región ultravioleta y visible a una longitud de onda específica (Swartz 2010).

El detector de índice de refracción (RI) es un tipo de detector en HPLC que se utiliza ampliamente para la detección de azúcares en alimentos, determinando su autenticidad y grado de pureza (Verzele *et al.* 1987). El Detector RI mide la diferencia del índice de refracción, una propiedad intrínseca de todas las sustancias, que es modificada por la presencia de un analito (Engelhardt 1979).

Los detectores RI son los más comunes que se emplean como universales, debido a que se mide una propiedad física general de las sustancias, tanto así que los distribuidores de equipos para HPLC siempre ofrecen estos como detector. Son detectores poco sensibles donde los niveles de sensibilidad varían con cada distribuidor, pero generalmente modelos típicos poseen un nivel de ruido de  $10^{-7}$  RIU (unidades de índice de refracción), mientras que los modelos más sofisticados y más sensibles disponibles tienen la capacidad de detectar diferencias en índice de refracción en unidades de  $10^{-8}$  RIU de magnitud (Swartz 2010).

## 2 ESTADO DEL ARTE

### 2.1 ANTECEDENTES DE CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES

En la industria de alimentos, se han implementado diversas técnicas de detección de azúcares, se utilizan equipos analíticos bajo condiciones específicas para la obtención de valores con altos niveles de confianza (Peris-Tortajada 2012).

El análisis de azúcares posee una dificultad debido a la cantidad de isómeros presentes en un compuesto en particular; así una aldosa o una cetosa posee varios isómeros debido a la ubicación de sus grupos hidroxilo y, a su vez, puede existir en varias formas diferentes (Molnár-Perl 2000).

Uno de los métodos más utilizados son los análisis por cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El método por HPLC provee un análisis simultáneo más rápido, eficiente y a bajos costos en comparación con GC, debido a que el análisis abarca distintos componentes en la muestra, que no necesita un tratamiento previo a su análisis; pero pierde propiedades de sensibilidad y selectividad al usar detectores universales (Galant, *et al.* 2015; Montero *et al.* 2004; Molnár-Perl 2000; Molnár-Perl 1999; Agblevor *et al.* 2007).

Ferreira *et al.* determinaron (Ferreira *et al.* 1998), en 1998, azúcares en diversas leches utilizando el método HPLC con detector UV-Vis en serie con detector RI. Ellos reportaron concentraciones de glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa y maltosa con coeficientes de correlación que superaban valores de 0,999, utilizando el detector RI. En 1999, Yuan y Chen determinaron (Yuan y Chen 1999) azúcares, ácido ascórbico y compuestos furánicos utilizando HPLC con detector de arreglo de fotodiodos (PAD) en serie con detector RI, con coeficientes de correlación entre 0,9991 y 0,9995.

La cuantificación de azúcares de productos naturales como las frutas puede determinar cambios en diversas propiedades biológicas, tales como su método de polinización que modifican la proporción de los azúcares presentes en ellas. En 2007, Shin *et al.* determinaron (Shin *et al.* 2007) azúcares en diferentes métodos de polinización en melones orientales utilizando el método HPLC con detector RI, donde reportaron la influencia de las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en los diferentes métodos de polinización.

Eyéghé-Bickong *et al.* optimizaron (Eyéghé-Bickong *et al.* 2012), en 2012, un método de HPLC para el análisis y la cuantificación simultánea de azúcares y ácidos orgánicos en uvas utilizando una columna de intercambio iónico y detector de Arreglo de Diodos (DAD) en serie con detector RI; obteniendo coeficientes de correlación de 0,99 y 1,00 (Tabla 1). Kupina y Roman utilizaron (Kupina y Roman 2014), en 2014, el método de HPLC con detector RI para la determinación total de azúcares en vinos.

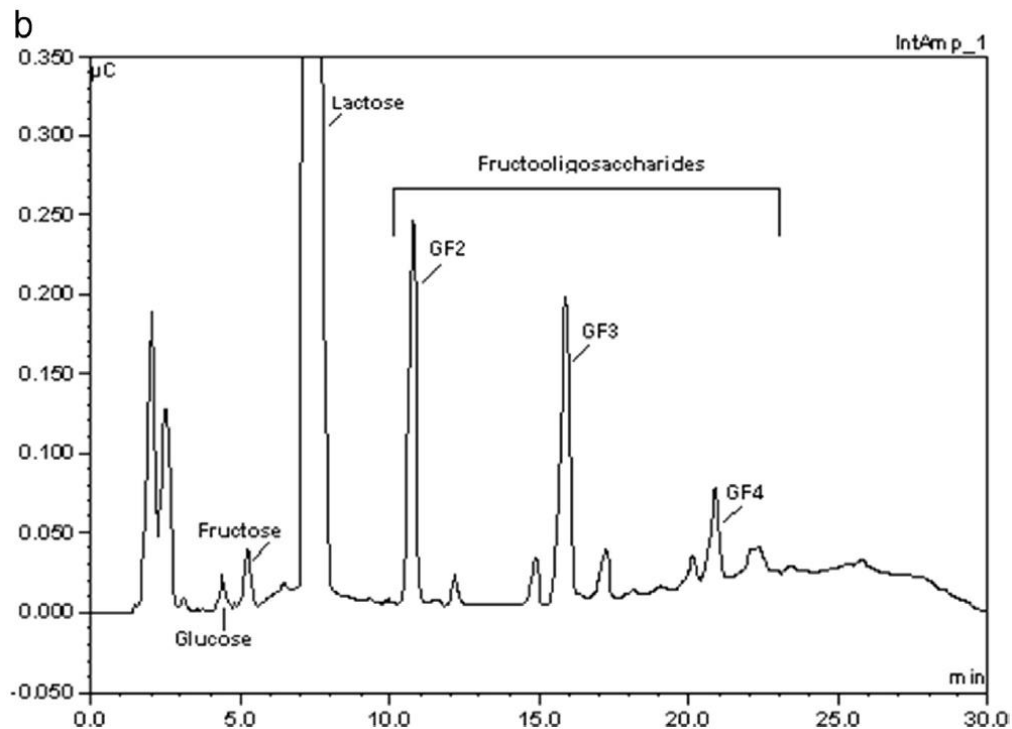
**Tabla 1. Variables del método HPLC para la determinación de azúcares [Tomado de Eyéghé-Bickong *et al.* 2012].**

<b>Compuesto</b>	<b>t<sub>R</sub>, min</b>	<b>Detector</b>	<b>Factor de respuesta</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	<b>Límite de detección, g/L</b>
Glucosa	10,77	RI	0,95	1,00	0,16
Fructosa	11,45	DAD	30178,51	0,99	0,30
Fructosa	11,72	RI	0,81	1,00	0,07

La cuantificación de azúcares también se ha determinado en lodos y material vegetal proveniente de industrias de fermentación anaerobia. Así, en 2015, Ribeiro *et al.* (Ribeiro Vasconcelos de Sá *et al.* 2015) validan un método analítico para cuantificar azúcares, ácidos e inhibidores de la fermentación de hemicelulosa para la producción de hidrógeno, por HPLC utilizando detector RI.

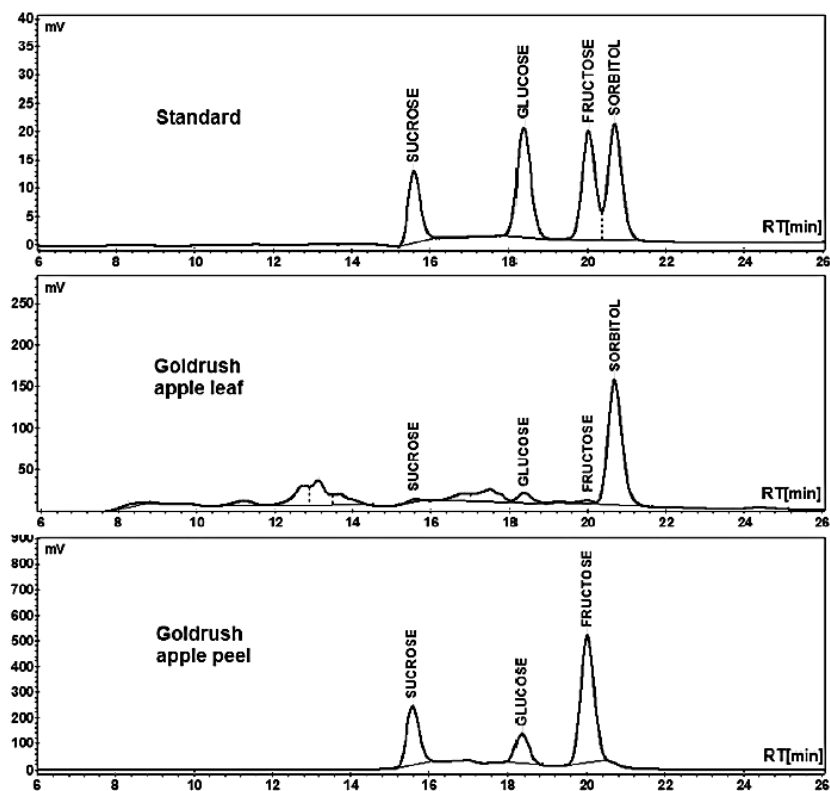
Rodríguez-Gómez *et al.* (Rodríguez-Gómez *et al.* 2015) determinaron, en 2015, fructosa, glucosa, lactosa y fructooligosacáridos en varios productos de leche, utilizando el método HPLC con detector RI, donde se muestran los picos cromatográficos característicos (Figura 3). En 2015, Kola *et al.* reportaron (Kola *et al.* 2015) datos de cuantificación de azúcares presentes en el pepino utilizando el detector RI.

**Figura 3. Cromatograma HPLC-RI representativo de una muestra de leche. Columna Luna 5u NH<sub>2</sub> (250\*4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, Phenomenex); modo isocrático Acetonitrilo 76% y Agua destilada 24% [Tomado de Rodríguez-Gómez *et al.* 2015].**



En 2016, Filip *et al.* (Filip *et al.* 2016) cuantificaron fructosa, glucosa, sacarosa y sorbitol en hojas y cáscara de fruta de manzana utilizando HPLC con detector RI, y obtuvieron los cromatogramas de la Figura 4.

Figura 4. Cromatogramas HPLC-RI de los estándares de sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol (a); hojas (b), y cáscara de manzana (c). Columna Carbosep Coregel 87H3 (300\*7.8 mm). [Tomado de Filip *et al.* 2016].



## 2.2 ANTECEDENTES DE CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN MIELES

La miel es un alimento natural compuesto principalmente por azúcares y otros constituyentes como enzimas, proteínas, aminoácidos libres, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, minerales y sustancias aromáticas (da Silva *et al.* 2016). La miel se define como “la sustancia natural dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de las plantas que las abejas succionan y recolectan para formar, almacenar y madurar el producto final” (Prodoliet y Hischenhuber 1998).

A lo largo de la producción de la miel, se ha observado que el costo para su elaboración se ha reducido debido a la adulteración de la misma. Esto conduce a

modificar las cantidades de los azúcares presentes y disminuir las cantidades de otros nutrientes, como vitaminas y enzimas, deteriorando su calidad (Prodollet y Hischenhuber 1998).

Una de las primeras determinaciones de adulteraciones de la miel natural, utilizando el método de HPLC con detector RI, fue la reportada por Abdel-Aal *et al.* (Abdel-Aal *et al.* 1993) en 1993, cuando se modificó la composición de azúcar en muestras de miel natural con la adición de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa en concentraciones conocidas (Tabla 2). Los resultados mostraron una relación de fructosa/glucosa (F/G) en la miel natural y la alteración de dicha relación por la adición del adulterante (Abdel-Aal *et al.* 1993).

**Tabla 2. Resultados de la cantidad de fructosa y glucosa y su relación [Tomado de Abdel-Aal *et al.* 1993].**

<b>Adulteración, % (p/p)</b>	<b>Fructosa, % (p/p)</b>	<b>Glucosa, % (p/p)</b>	<b>Relación fructosa/glucosa</b>
0	47,6	43,4	1,10
10	48,4	42,9	1,13
20	49,2	42,7	1,15
30	50,0	42,2	1,18
40	50,9	41,7	1,22
50	51,2	41,6	1,23
Jarabe de maíz puro	56,2	39,5	1,42

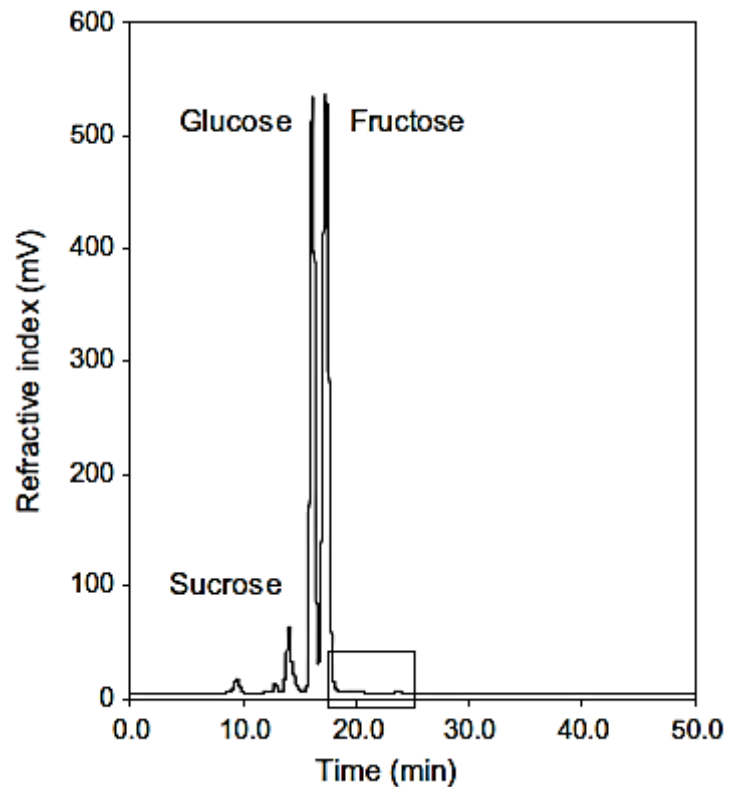
Aunque se puede determinar la adulteración del producto natural por la variación en los valores de F/G, las concentraciones de fructosa y glucosa (los azúcares mayoritarios presentes en la miel) varían según la región de producción.

Así, en 2004, (Soria *et al.* 2004) se realizaron estudios melisopolinológicos y fisicoquímicos en mieles artesanales producidas en Madrid, España, y se reportó, por medio de HPLC utilizando una columna REZEX-Monosaccharide y un detector

RI, el rango de valores de F/G en mieles naturales entre 1,13 y 1,36. Oroian (Oroian 2012) reportó, en 2012, los valores de F/G entre 1,1 y 1,7, en mieles de Rumania utilizando método de HPLC con detector RI.

Adams y colaboradores reportaron (Adams *et al.* 2008) en 2008 valores de las concentraciones de glucosa y fructosa en mieles neozelandesas por HPLC utilizando detector RI, y obtuvieron un cromatograma con las señales características de estos azúcares (Figura 5).

**Figura 5. Cromatograma HPLC-RI de una muestra de miel de Nueva Zelanda. Columna Shodex KS-801; modo isocrático agua grado HPLC 1 mL/min [Tomado de Adams *et al.* 2008].**

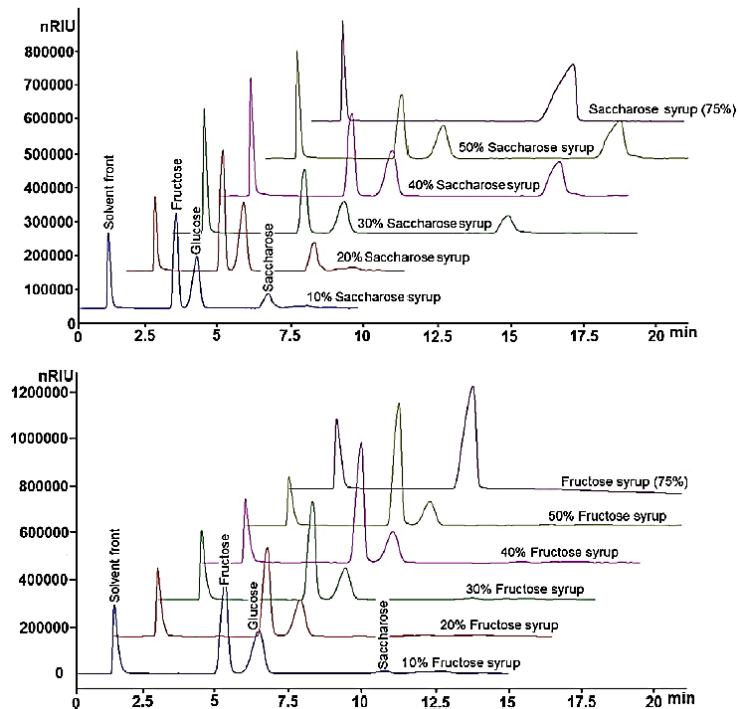


En 2014, Boussaid *et al.* (Boussaid *et al.* 2014) realizaron estudios fisicoquímicos en seis muestras de mieles de varias flores de Túnez; y reportaron, por medio de

HPLC utilizando una columna Supelcogel y detector RI, valores de F/G entre 1,03 y 1,17; valores de sacarosa y maltosa cada uno fueron por encima de 4% en peso.

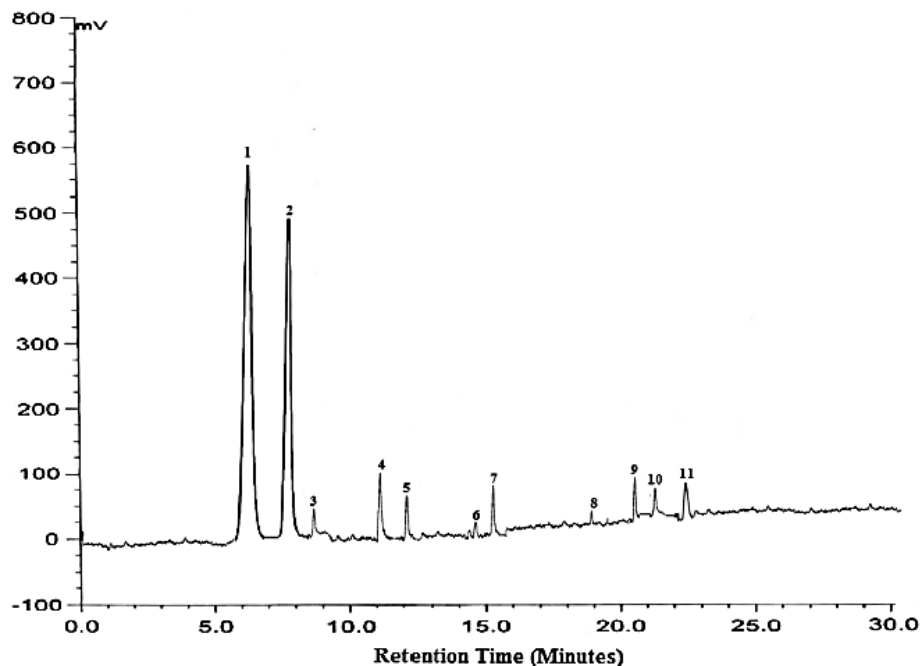
En 2014, Yilmaz y colaboradores (Yilmaz *et al.* 2014) realizaron estudios fisicoquímicos de identificación de azúcares en mieles naturales adulteradas deliberadamente con jarabes de fructosa y sacarosa, por método HPLC utilizando una columna *Agilent Zorbax* y detector RI, y reportaron perfiles cromatográficos de cada muestra, mostrando los cambios relevantes de los picos cromatográficos que corresponden a los dos azúcares (Figura 6). En estos perfiles, se muestra un aumento del área del pico de la fructosa a medida que la concentración de jarabe de fructosa aumenta, pero presenta una disminución en otros picos (Yilmaz *et al.* 2014).

**Figura 6. Perfiles cromatográficos por HPLC-RI de muestras de miel natural adulteradas con jarabe de fructosa y sacarosa en concentraciones conocidas. Columna Agilent Zorbax; acetona 80%, agua 20% [Tomado de Yilmaz *et al.* 2014].**



Nayik y colaboradores (Nayik *et al.* 2015) reportaron en 2015 valores de concentraciones de varios azúcares en muestras de mieles uniflorales en Kashmir Valley, India. En estas muestras obtuvieron, por HPLC utilizando una columna Waters X-bridge Amide y detector RI, un perfil de azúcares, que permitió corroborar la presencia de fructosa (entre 36,42 y 40,61%, en peso) y glucosa (entre 30,56 y 33,98%, en peso), que se observan en el cromatograma (Figura 7) (Nayik *et al.* 2015).

**Figura 7.** Perfil cromatográfico de azúcares por HPLC-RI en miel Saffron (1: Fructosa, 2: Glucosa, 3: Xilosa, 4: Maltosa, 5: Isomaltosa, 6: Trehalosa, 7: Sacarosa, 8: Rafinosa, 9: Maltotriosa). Columna Waters X-bridge Amide 5  $\mu\text{m}$  (250\*4.66 mm); acetonitrilo 80%, agua 20% [Tomado de Nayik *et al.* 2015].



En los estudios de adulteración de la miel por adición de jarabes enriquecidos por algún monosacárido, se reportó que el cambio en las concentraciones de azúcar en mieles naturales modifica propiedades físicas, como viscosidad y fluidez (Abdel-Aal *et al.* 1993; Oroian 2012), y propiedades biológicas como la cantidad de enzimas y vitaminas (Soria *et al.* 2004; Boussaid *et al.* 2014).

Finalmente, en la Tabla 3 se presentan en forma resumida las condiciones cromatográficas de análisis por HPLC para la determinación de azúcares en mieles usados por diferentes autores (Yilmaz *et al.* 2014; Abdel-Aal *et al.* 1993; Soria *et al.* 2004; Oroian 2012; Adams *et al.* 2008; Boussaid *et al.* 2014; Nayik *et al.* 2015).

**Tabla 3. Principales condiciones cromatográficas para la determinación de azúcares.**

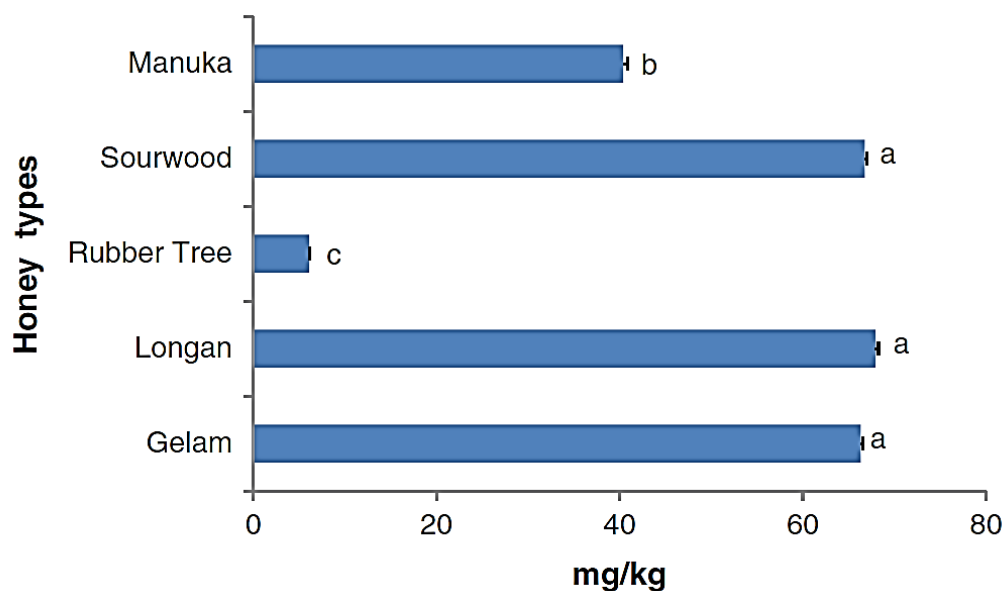
<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Condiciones cromatográficas</b>	<b>Relación F/G</b>
Abdel-Aal <i>et al.</i> <sup>34</sup> (1993)	HPLC-RI, Columna Carbohydrate Aminex	Fase móvil: Agua grado HPLC. Temp: 85 °C	Entre 1,10 y 1,42
Adams <i>et al.</i> <sup>37</sup> (2008)	HPLC-PDA y HPLC-RI, Columna Shodex KS-801 en serie con Shodex KS-802	Fase móvil: Agua grado HPLC. Flujo: 1,0 mL/min Temp: 50 °C	No se reportaron
Boussaid <i>et al.</i> <sup>38</sup> (2014)	HPLC-RI, Columna Supelcogel C-610H	Fase móvil: Ácido Sulfúrico 0,005M. Flujo: 0,75 mL/min Temp: 30 °C	Entre 1,03 y 1,17
Nayik <i>et al.</i> <sup>39</sup> (2015)	HPLC-RI, Columna Waters X-bridge Amide	Fase móvil: 80% acetonitrilo, 20% agua. Flujo: 0,6 mL/min Temp: 85 °C	Entre 1,07 y 1,25
Oroian <sup>36</sup> (2012)	HPLC-RI, Columna Alltech type Alltima amino	Fase móvil: 80% acetonitrilo, 20% agua. Flujo: 1,3 mL/min Temp: 30 °C	Entre 1,1 y 1,7
Soria <i>et al.</i> <sup>35</sup> (2004)	HPLC-RI, Columna REZEX-Monosaccharide	Fase móvil: Agua desionizada. Flujo: 1,0 mL/min Temp: 90 °C	Entre 1,13 y 1,36
Yilmaz <i>et al.</i> <sup>1</sup> (2014)	HPLC-RI, Columna Agilent Zorbax carbohydrate	Fase móvil: 80% acetona, 20% agua. Temp: 25 °C Flujo: 1,4 mL/min	No se reportaron

### 2.3 ANTECEDENTES DE CUANTIFICACIÓN DE HMF EN MIELES

El contenido de hidroximetilfurfural (HMF) es un indicador importante en la calidad de la miel. El HMF se origina a partir de la descomposición de los azúcares en la matriz de la muestra y su presencia está fuertemente relacionada con la frescura y la pureza del producto; una concentración elevada (por encima de 100 mg/kg) de este compuesto indica un almacenamiento en condiciones de sobrecalentamiento (Yilmaz *et al.* 2014; Soria *et al.* 2004; Nayik *et al.* 2015; Moniruzzaman *et al.* 2013; García-Villanova *et al.* 1993).

En 2013, Moniruzzaman *et al.* (Moniruzzaman *et al.* 2013) cuantificaron HMF en distintas mieles de Malasia, utilizando el método de HPLC con detector PAD (Figura 8), y concluyeron que tres de las mieles evaluadas tenían cantidades de HMF que estaban en el límite de la concentración permitida (60 mg/kg) por las normativas internacionales.

Figura 8. Concentraciones de HMF encontradas en diferentes mieles de Malasia [Tomado de Moniruzzaman *et al.* 2013].



Hay diversas normativas que estipulan varios criterios fisicoquímicos y microbiológicos que la miel natural debe cumplir, como el *Codex Alimentarius* de la Unión Europea y el Ministerio de la Protección Social de Colombia, en ellas, se establecen métodos volumétricos y espectrofotométricos para la determinación de azúcares reductores, azúcares no reductores y HMF (Ministerio de La Protección Social Colombia 2010; DIRECTIVA Comisión Europea 2001). No obstante, se ha evidenciado que la utilización de metodologías cromatográficas aporta resultados de magnitudes similares y con mayor detalle químico que las metodologías volumétricas y espectrofotométricas (Parris 1984). Es así que Zappalà *et al.* (Zappalà *et al.* 2005) determinaron concentraciones de HMF aplicando diversos métodos, y mostraron que el método por HPLC-DAD reportaba valores similares a los valores obtenidos por el método espectrofotométrico.

#### **2.4 CRITERIOS FISICOQUÍMICOS DE ACEPTABILIDAD EN MIELES**

Para evaluar la calidad de las mieles naturales producidas en distintos países se han implementado normas y leyes que establecen valores de características fisicoquímicas aceptables para éstas. Tanto la resolución 1057 de 2010 del Ministerio de la Protección Social de Colombia como la Directiva 2001/110 del *Codex Alimentarius* de la Comisión Europea (Ministerio de La Protección Social Colombia 2010; DIRECTIVA Comisión Europea 2001) establecen unos valores de características fisicoquímicas que deben cumplir la miel, expuestos en la tabla 5.

Tabla 4. Criterios fisicoquímicos de las mieles aceptables para su comercialización.

Características fisicoquímicas	Valores permitidos Ministerio de la P. Social	Valores permitidos Codex Alimentarius
Humedad	<20%	<20%
Azúcar reductor	>60%	>60%
Sacarosa	<10%	<10%
Cenizas	<0,6%	-
HMF	<60 mg/kg	<50 mg/kg
Acidez libre	<50 meq ácido/kg	<50 meq ácido/kg

## 2.5 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS EN MIELES

Además de la identificación y cuantificación de azúcares y HMF en mieles naturales por HPLC, también se han evaluado algunas características fisicoquímicas (Boussaid *et al.* 2014; Nayik *et al.* 2015; Moniruzzaman *et al.* 2013) que poseen estos productos, como el contenido de humedad, acidez libre, el contenido de cenizas, conductividad, etc. Es así que Kadri *et al.* (Kadri *et al.* 2016) reportaron valores de humedad, cenizas, acidez libre, pH y materia seca en mieles de flores de café en Brasil (Tabla 4).

Tabla 5. Características fisicoquímicas reportadas por Kadri *et al.*

Muestra	Acidez total, meq/kg	pH	Humedad, %	Materia seca, %	Cenizas, %
1	17,6	3,97	17,5	81,27	0,18
2	19,2	3,86	18,4	82,10	0,14
3	16,8	3,99	17,9	80,89	0,19

Algunas mieles cumplen con los requisitos fisicoquímicos al reportarse valores de humedad, de cenizas, y de acidez libre dentro de los valores permisibles. En mieles de regiones áridas se reportaron valores de humedad menores de 20%, de cenizas por debajo de 0,4% y de acidez libre menores de 30 meq/kg (Habib *et al.* 2014). En mieles de Etiopía, se reportaron valores de humedad menores del 19%, de cenizas por debajo de 0,3% y de acidez libre menores de 40 meq/kg (Belay *et al.* 2013).

Sin embargo, algunos reportes se muestran valores de características fisicoquímicas que están por encima de los criterios fisicoquímicos de las normas vigentes. Alqarni y colaboradores (Alqarni *et al.* 2016) reportaron valores de humedad por encima de 27%, de acidez libre por encima de 100 meq/kg y de HMF por encima de 100 mg/kg en mieles de Arabia Saudita; lo que indica que estas mieles no deben ser comercializadas en el mercado. También se reportaron (Chuttong *et al.* 2016) valores de humedad por encima de 40% y de cenizas por encima de 0,6% en mieles tailandesas; valores altos no permitidos para su comercialización.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad de las mieles estudiadas por medio de la implementación de un método analítico para el análisis de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF utilizando HPLC con detector UV-Vis y detector de índice de refracción (RI); y por medio de la determinación de algunas características fisicoquímicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de glucosa, fructosa, sacarosa y HMF en materiales de referencia.
- Aplicar el método desarrollado en mieles producidas en el nororiente colombiano.
- Evaluar algunos criterios fisicoquímicos en las muestras descritos en la resolución 1057 del 2010 del Ministerio de la Protección Social de Colombia y en el *Codex Alimentarius* de la Unión Europea.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 **Reactivos, muestras y material de referencia:** Los reactivos glucosa, fructosa y sacarosa fueron suministrados por Merck. El HMF fue suministrado por Sigma-Aldrich. Toda el agua que se utilizó en el procedimiento fue ultra-pura (0,056  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) tipo HPLC, obtenida del equipo Aqua Solutions del laboratorio de alimentos CICTA. Se obtuvieron 8 muestras de mieles no representativas en supermercados y comunidades de apicultores de las regiones de Vetas, Barranquilla, Cúcuta, Pamplona, Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña.

4.1.2 **Instrumentación:** Se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC *Thermo Dionex Ultimate 3000* equipado con desgasificador, inyector automático, una columna ICE COREGEL 107-H (Transgenomic) acoplada en un horno que mantuvo la temperatura. Se empleó un detector UV-Vis en serie con un detector RI (las condiciones cromatográficas empleadas aparecen en la Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros del equipo de HPLC para el análisis de azúcares.

Parámetros	Especificaciones
Columna	COREGEL 107-H 7,8 x 300 mm (8 $\mu\text{m}$ )
Temperatura de la columna	30°C
Temperatura del detector RI	30°C
Longitud de onda detector UV-Vis	285 nm
Volumen de inyección	20 $\mu\text{L}$
Flujo	0,6 mL/min
Fase móvil	Solución acuosa 5 mM de $\text{H}_2\text{SO}_4$

**4.1.3 Preparación de la curva de calibración:** Se prepararon las soluciones patrón de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF pesando el reactivo en una balanza y diluyendo en agua tipo 1. Se realizaron las soluciones para la curva de calibración teniendo en cuenta las siguientes concentraciones:

**Tabla 7. Concentraciones de los patrones utilizados para las curvas de calibración.**

<b>Patrones</b>	<b>Concentración de sacarosa, mg/mL</b>	<b>Concentración de glucosa, mg/mL</b>	<b>Concentración de fructosa, mg/mL</b>	<b>Concentración de HMF, mg/L</b>
<b>1</b>	1,0	-	-	0,25
<b>2</b>	2,5	2,5	2,5	0,50
<b>3</b>	5,0	5,0	5,0	1,00
<b>4</b>	10,0	10,0	10,0	1,50
<b>5</b>	15,0	15,0	15,0	2,00
<b>6</b>	20,0	20,0	20,0	2,50
<b>7</b>	-	-	-	3,00

**4.1.4 Análisis instrumental:** Para la determinación de azúcares por HPLC, se disolvieron, a 23 °C, aproximadamente 0,5 g de miel en 25 mL de agua tipo HPLC, y la mezcla pasó por un filtro de jeringa de 0,45 µm y membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se inyectaron 20 µL del filtrado al equipo HPLC. Los azúcares se identificaron y cuantificaron con el detector RI, de acuerdo con sus tiempos de retención y la concentración se calculó utilizando la curva de calibración de cada uno.

Para la determinación de HMF, se disolvieron, a 23 °C, aproximadamente 0,5 g de miel en 25 mL de agua tipo HPLC, y la mezcla pasó por un filtro de jeringa de 0,45 µm y membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se inyectaron 20 µL del filtrado al equipo HPLC. Se utilizó el detector UV-Vis a 285 nm, donde se identificaron y cuantificaron de acuerdo con sus tiempos de retención y a la curva de calibración.

Algunas muestras se diluyeron para que se establecieran dentro del intervalo de la curva de calibración.

**4.1.5 Análisis fisicoquímicos:** Se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos a las mieles estudiadas:

**Contenido de humedad:** Se determinó el índice de refracción de las muestras de miel utilizando un refractómetro manual marca BRIXCO a una temperatura de 20 °C. La lectura se convirtió en contenido de humedad (en unidades de porcentaje masa/masa) utilizando la tabla que se indica en el método oficial descrito por AOAC 969.38 para humedad (Anexo 1).

**Contenido de cenizas:** Para la determinación de cenizas, se pesaron aproximadamente 2 g de miel. La muestra se calentó suavemente en una mufla marca LabTech a 110 °C durante 4 h, y luego se llevó hasta 150 °C durante 4 h, en donde cada hora se aumentaba la temperatura en 50 °C hasta alcanzar una temperatura final de 350 °C. Lo anterior se hizo para evitar la pérdida de la muestra por formación de espuma. Por último, la muestra se sometió a una temperatura de 550 °C durante 6 h. Se registró el peso de las cenizas y el resultado se expresó en porcentaje en peso de cenizas en la muestra.

**Acidez libre:** Para la determinación de acidez libre, aproximadamente 10 g de miel se pesaron y se disolvieron en un vaso precipitado de 250 mL con 75 mL de agua destilada. La solución de la muestra se tituló con NaOH 0,05N hasta un pH de 8,3 utilizando un pHmetro marca SCHOTT previamente calibrado. El volumen de NaOH utilizado se registró, se multiplicó por la concentración y se dividió por el peso de la muestra. El valor resultante se expresó en unidades de miliequivalentes de ácido por kg de muestra.

## 4.2 EVALUACIÓN DEL MÉTODO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la implementación del método por HPLC, se determinaron y se evaluaron las siguientes figuras de mérito.

4.2.1 **Límite de detección (LOD):** El límite de detección se determinó empleando la siguiente fórmula (The United States Pharmacopeia, n.d.):

$$LOD = \bar{B} + (3 * \sigma) \quad (1)$$

Donde  $\bar{B}$  es la concentración, en mg/L, mínima detectable del analito (10 repeticiones) y  $\sigma$  es la desviación estándar de las mediciones efectuadas para determinar  $\bar{B}$ .

5.2.2. **Límite de cuantificación (LOQ):** El límite de cuantificación se determinó usando la fórmula(The United States Pharmacopeia, n.d.):

$$LOQ = \bar{B} + (10 * \sigma) \quad (2)$$

Donde  $\bar{B}$  es la concentración, en mg/L, mínima detectable del analito (10 repeticiones) y  $\sigma$  es la desviación estándar de las mediciones efectuadas para determinar  $\bar{B}$ .

5.2.3 **Linealidad:** La linealidad se estableció por medio de la regresión lineal de las curvas de calibración de los patrones. El criterio de aceptación fue un valor de coeficiente de regresión lineal  $R^2 > 0,99$  (Berrío *et al.* 2013).

**5.2.4 Exactitud:** Para evaluar la exactitud se determinó el porcentaje de recuperación. Se pesaron aproximadamente 0,5 g de una muestra de miel, se adicionaron cantidades conocidas de glucosa (100, 200 y 300 mg) y se aforó con agua tipo 1 a 25 mL. Seguidamente, se inyectó al HPLC y se calculó la concentración. Finalmente, se aplicó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de recuperación (Berrío *et al.* 2013):

$$\% R = \frac{C_{AE} - C_A}{C_E} * 100 \quad (3)$$

Donde  $C_{AE}$  es la concentración del analito (glucosa) en miel enriquecida con glucosa,  $C_A$  es la concentración del analito (glucosa) en miel sin enriquecer y  $C_E$  es la concentración del enriquecido de glucosa adicionado.

Se realizó la prueba t de Student para la recuperación mediante la fórmula (Berrío *et al.* 2013):

$$t_{exp} = \frac{\bar{R} - 100}{\sigma_R} * \sqrt{6} \quad (4)$$

Donde  $\bar{R}$  es el promedio de los datos de recuperación (6 réplicas) y  $\sigma_R$  es la desviación estándar de los datos de recuperación.

La exactitud se evaluó por medio de la t de Student experimental, y para aceptar los datos, el valor de t experimental debe ser menor de 2,45 (valor de t tabulado con 6 grados de libertad y una confianza del 95%) (Berrío *et al.* 2013).

**5.2.5 Precisión:** En esta figura, se determinó la repetibilidad del método usando como descriptor el coeficiente de variación (CV) de seis repeticiones. El criterio de aceptación fueron valores de CV < 5% (Horwitz 1982).

$$CV = \frac{\sigma_x}{\bar{x}} * 100 \quad (5)$$

Donde  $\bar{x}$  es el promedio de los datos (6 réplicas) y  $\sigma_x$  es la desviación estándar de los mismos.

**5.2.6 Análisis estadístico:** Los datos obtenidos fueron sujetos a un Análisis de Varianza (ANOVA) a una sola vía, para determinar si los datos diferían significativamente entre sí. Para los datos que diferían significativamente entre sí, se realizó la prueba de Tukey para agruparlos por similitud.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Se realizaron pruebas preliminares para determinar las condiciones cromatográficas para la detección y la cuantificación de los analitos sacarosa, glucosa, fructosa y HMF. Por medio de estas pruebas se determinó una fase móvil en modo isocrático de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, una columna ICE-Coregel C-107H a 30°C, una temperatura del detector RI de 30°C con un tiempo de corrida de 12 min para el análisis de sacarosa, glucosa y fructosa; y un detector UV-Vis a 285 nm con un tiempo de corrida de 40 min para el análisis del HMF.

### 5.2 ANÁLISIS DE PATRONES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las soluciones patrón de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF fueron sometidas, por separado, al método por HPLC establecido anteriormente; donde se determinaron sus tiempos de retención (para 5 réplicas), indicados en la Tabla 8.

Tabla 8. Tiempos de retención de los analitos identificados por HPLC.

Analito	t <sub>R</sub> , min	CV, %
Sacarosa	7,22 ± 0,04	0,62
Glucosa	8,22 ± 0,01	0,18
Fructosa	8,87 ± 0,02	0,18
HMF	33,52 ± 0,06	0,17

Las curvas de calibración se obtuvieron para la sacarosa, glucosa, fructosa y HMF (Anexo 4, 5, 6 y 7 respectivamente).

La ecuación de la recta para cada curva se calculó y se determinó el valor de R<sup>2</sup> (Tabla 9). En éstas se observa una tendencia del comportamiento lineal que hay

entre la concentración y el área. Además, se observa que los valores de  $R^2$  son mayores a 0,99, lo que confirma que el método se comporta de forma lineal dentro del intervalo establecido (EURACHEM, n.d.).

**Tabla 9. Características de las curvas de calibración.**

<b>Analito</b>	<b>Ecuación de la recta</b>	<b>Valor de <math>R^2</math></b>	<b><math>R^2</math> ajustado</b>	<b>Intervalo</b>
Sacarosa	$y = 5,0463 x + 0,6498$	0,9992	0,9989	1 – 20 mg/mL
Glucosa	$y = 5,3888 x + 1,1817$	0,9992	0,9989	2,5 – 20 mg/mL
Fructosa	$y = 5,4192 x + 0,6910$	0,9999	0,9999	2,5 – 20 mg/mL
HMF	$y = 4,0223 x + 0,0367$	0,9956	0,9941	0,25 – 3 mg/L

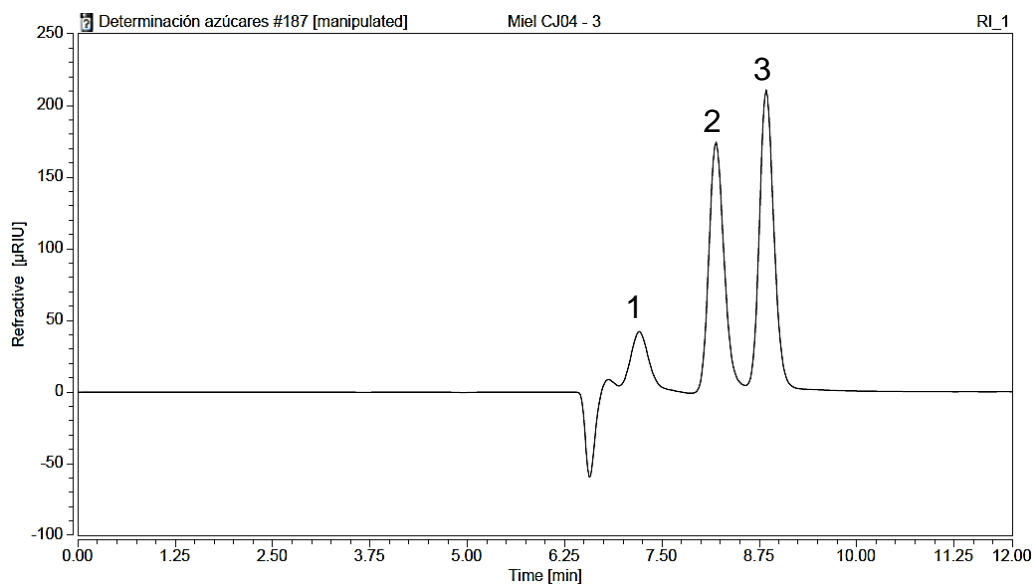
### 5.3 ANÁLISIS DE AZÚCARES EN MIELES

Los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa se identificaron en ocho mieles de las regiones de Vetas, Barranquilla, Cúcuta, Pamplona, Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña, por medio de sus tiempos de retención (Tabla 10); en la Figura 9 se puede observar un cromatograma típico de las distribuciones de los azúcares analizados en mieles. Los valores se expresan como el promedio de  $t_R \pm$  la desviación estándar.

Tabla 10. Tiempos de retención de los azúcares en mieles.

Región de la miel	t <sub>R</sub> , min (10 réplicas)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
Vetas	7,21 ± 0,01	8,19 ± 0,01	8,84 ± 0,01
Barranquilla	7,22 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,85 ± 0,01
Cúcuta	7,21 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,84 ± 0,01
Pamplona	7,21 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,84 ± 0,01
Arauca	7,25 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,85 ± 0,01
Charalá	7,21 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,84 ± 0,01
San Gil	7,23 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,85 ± 0,01
Ocaña	7,25 ± 0,01	8,20 ± 0,01	8,85 ± 0,01

Figura 9. Cromatograma HPLC-RI de una miel de Pamplona (1: Sacarosa, 2: Glucosa y 3: Fructosa).



Las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa se determinaron en las ocho mieles colombianas donde se relacionó el área obtenida para cada pico con la concentración del analito en las curvas obtenidas, con diez réplicas. A los datos finales se realizaron análisis de varianza de un solo factor y se obtuvieron valores de F para cada grupo de datos con nivel de significancia del 95% (con  $n_1 = 7$  y  $n_2 = 40$ ). Los resultados de la prueba Fischer se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Resultados de la prueba F de Fischer para el análisis de azúcares.**

<b>Variable</b>	<b>Valor de F experimental</b>	<b>Valor crítico de F</b>
Concentración de sacarosa	2525,99	2,25
Concentración de glucosa	104,55	2,25
Concentración de fructosa	103,54	2,25

La prueba F de Fischer muestra que el valor de F experimental es mucho mayor que el valor crítico de F, lo que indica que los resultados en cada grupo de datos difieren significativamente entre sí. Seguidamente, se implementó una prueba de Tukey (para un nivel de confianza del 95%) con el fin de agrupar los datos con valores que tienen un orden de magnitud similar. Los resultados se muestran en la Tabla 12 como el promedio  $\pm$  la desviación estándar; los datos que comparten la misma letra de superíndice no poseen diferencias significativas.

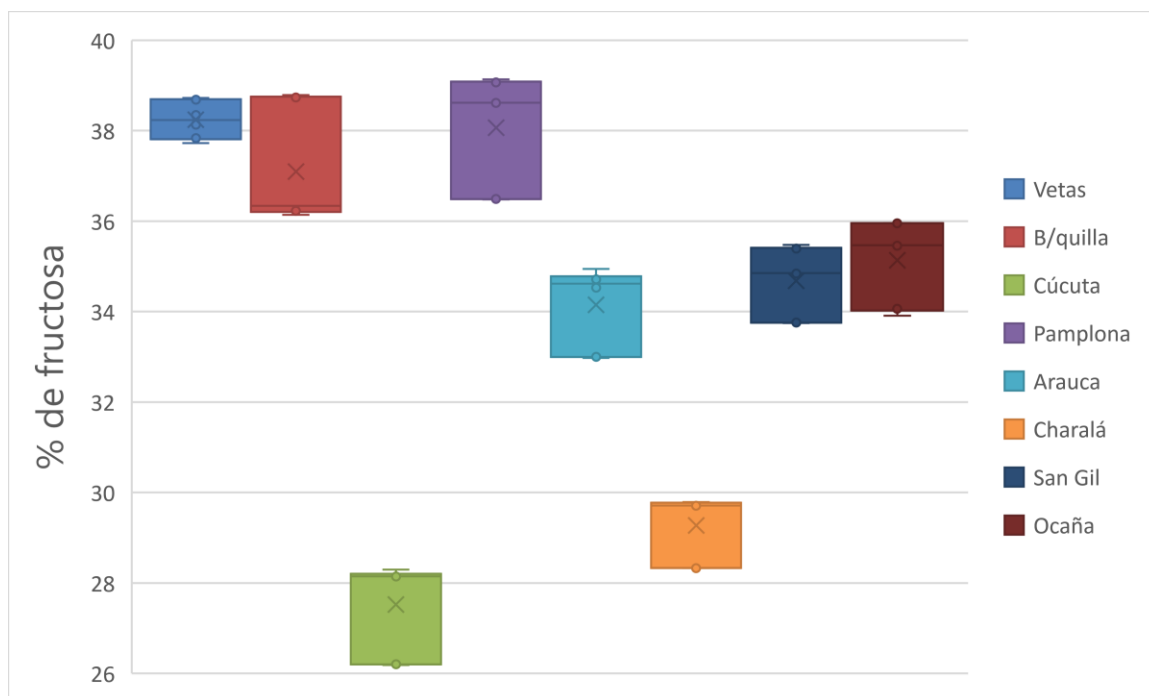
**Tabla 12. Contenido de azúcares en mieles colombianas.**

<b>Región de la miel</b>	<b>Contenido de azúcar, % de muestra</b>			<b>F/G</b>	<b>Contenido F+G [%]</b>
	<b>Sacarosa</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Fructosa</b>		
Vetas	12,71 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	31,45 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	38,24 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	1,22	69,7
Barranquilla	8,6 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>	33 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	1,14	69,7
Cúcuta	20,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	31 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	28 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	0,88	58,9
Pamplona	9,1 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>	33 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	38 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	1,15	71,3
Arauca	2,53 $\pm$ 0,09 <sup>f</sup>	41 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	34,2 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	0,83	75,3
Charalá	17,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	33,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	29,3 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	0,87	62,8
San Gil	6,4 $\pm$ 0,2 <sup>e</sup>	39,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	34,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	0,87	74,5
Ocaña	2,02 $\pm$ 0,08 <sup>f</sup>	42 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	35,1 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	0,84	76,8

Los resultados también se expresaron por medio de un diagrama de cajas y bigotes, donde se puede observar claramente la diferencia significativa entre las muestras de mieles para los porcentajes de sacarosa, glucosa y fructosa; mostrados en las figuras 10, 11 y 12 respectivamente.



Figura 12. Distribución de caja y bigotes del porcentaje de fructosa en las mieles evaluadas.



Los resultados de la Tabla 12 muestran que los porcentajes de fructosa y glucosa varían entre 28 y 38% y entre 31 y 42%, respectivamente. El azúcar predominante en mieles de Vetas, Barranquilla y Pamplona fue fructosa con valores cercanos a 38%. Para las demás mieles, la glucosa estaba en mayor proporción.

Así mismo, la relación F/G para las mieles de Vetas, Barranquilla y Pamplona estuvieron entre 1,14 – 1,22, los cuales se encuentran cercanos al intervalo 1,1 – 1,7, definido por Abdel-Aal (1993), Boussaid (2014), Nayik (2015) y Yilmaz (2014) para mieles de calidad. Las demás mieles reportaron una relación F/G cerca de 0,85; este valor puede estar asociado con una posible adulteración con jarabes de glucosa. La relación F/G está directamente relacionada con la dulzura de la miel, teniendo una miel más dulce a medida que esta relación aumenta (Boussaid *et al.* 2014). También, se determinó la cantidad de azúcar reductor, expresado como la cantidad de fructosa+glucosa (Contenido F+G), para este valor, solo la miel de Cúcuta presentó una concentración menor que 60%. Las demás mieles presentan

valores de la cantidad de azúcar reductor por encima del 60%, valor aceptado por las normativas del Colombia y de la Comisión Europea para su comercialización (Ministerio de La Protección Social Colombia 2010; DIRECTIVA Comisión Europea 2001).

Las concentraciones de sacarosa variaron entre 2 y 20%. Las mieles de Vetas, Cúcuta y Charalá presentaron concentraciones de sacarosa por encima de 10,00%, lo cual es indicativo de una cosecha prematura en la cual la sacarosa no se convirtió en glucosa y fructosa por la acción de la sacarasa (una glucoisomerasa) (Özcan *et al.* 2006); o una posible adulteración con jarabes de sacarosa.

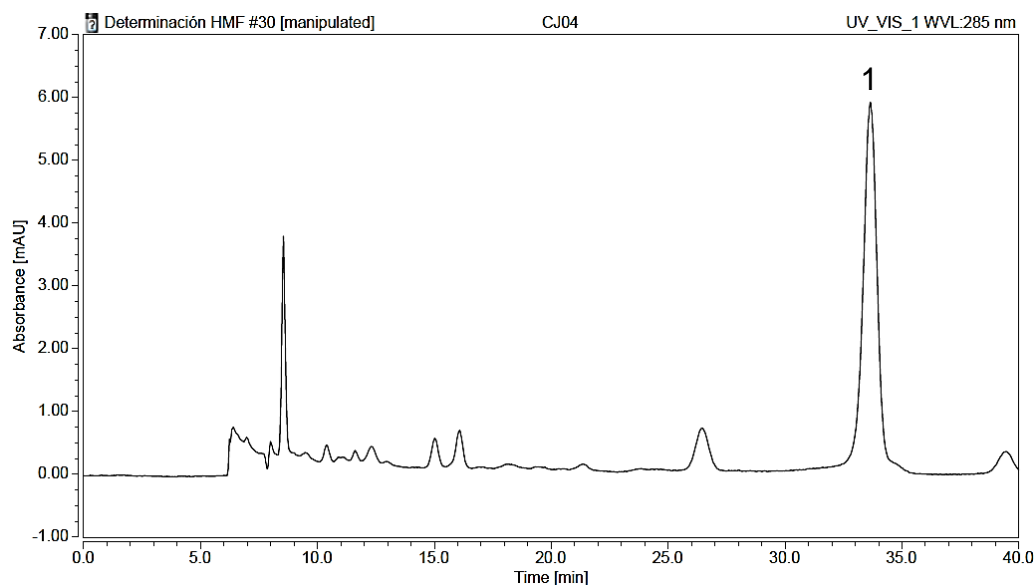
#### 5.4 ANÁLISIS DE HMF EN MIELES

El HMF se analizó en las ocho mieles de las regiones de Vetas, Barranquilla, Cúcuta, Pamplona, Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña por medio de sus tiempos de retención (Tabla 13), donde se puede observar la señal característica en el cromatograma (Figura 13). Los valores se expresan como el promedio de  $t_R \pm$  la desviación estándar.

Tabla 13. Tiempos de retención del HMF en mieles.

Región de la miel	$t_R$ , min
Vetas	33,52 $\pm$ 0,02
Barranquilla	33,55 $\pm$ 0,05
Cúcuta	33,59 $\pm$ 0,05
Pamplona	33,58 $\pm$ 0,06
Arauca	33,58 $\pm$ 0,05
Charalá	33,62 $\pm$ 0,07
San Gil	33,64 $\pm$ 0,04
Ocaña	33,64 $\pm$ 0,04

**Figura 13. Cromatograma HPLC-UV-Vis de una muestra de miel de Pamplona 1) HMF.**



Las concentraciones de HMF se analizaron en las ocho mieles colombianas y se registraron tres réplicas. A los datos finales se les realizó un análisis de varianza de un solo factor (la variable fue concentración de HMF) donde se obtuvo un valor de F de 23301,49 con un nivel de significancia del 95% ( $n_1 = 7$  y  $n_2 = 16$ ). El valor crítico de F es 2,66, que es mucho menor al valor de F experimental, lo que indica que los resultados difieren significativamente entre sí.

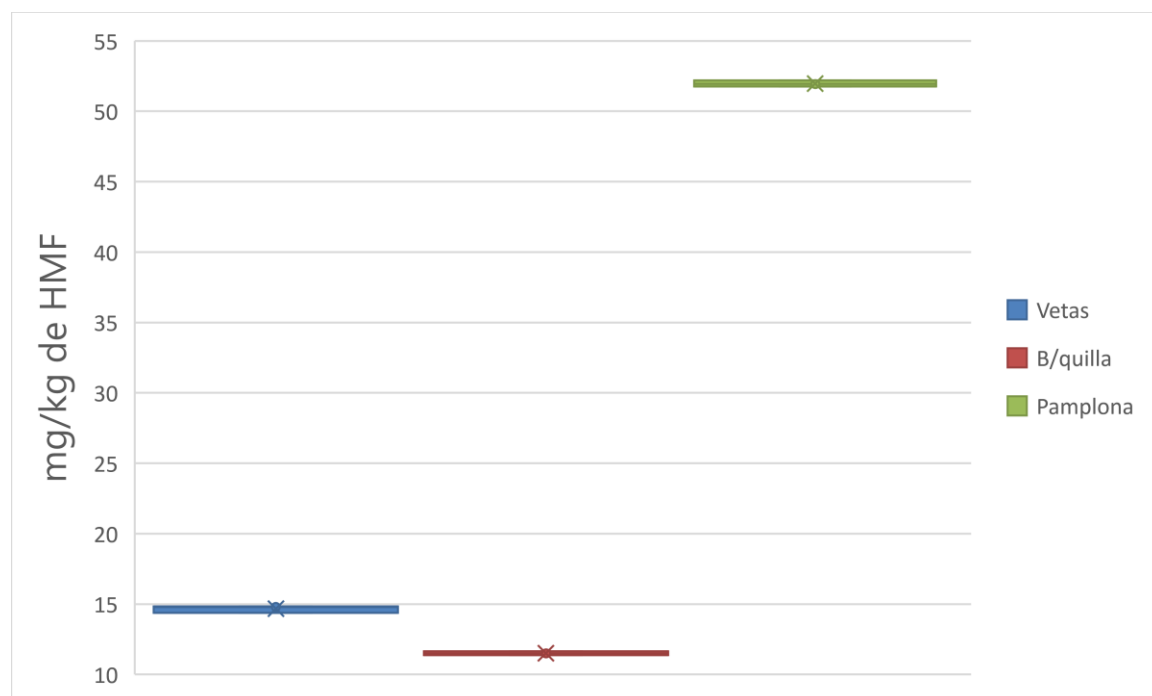
Seguidamente, se implementó una prueba de Tukey utilizando el *software* MiniTab 2016 (versión de prueba) con nivel de confianza del 95%, con el fin de agrupar los datos con valores que tienen un orden de magnitud similar. Los resultados se muestran en la Tabla 14 como el promedio de la concentración de HMF  $\pm$  la desviación estándar; los datos que comparten el mismo superíndice no poseen diferencias significativas.

Tabla 14. Concentración de HMF en mieles colombianas.

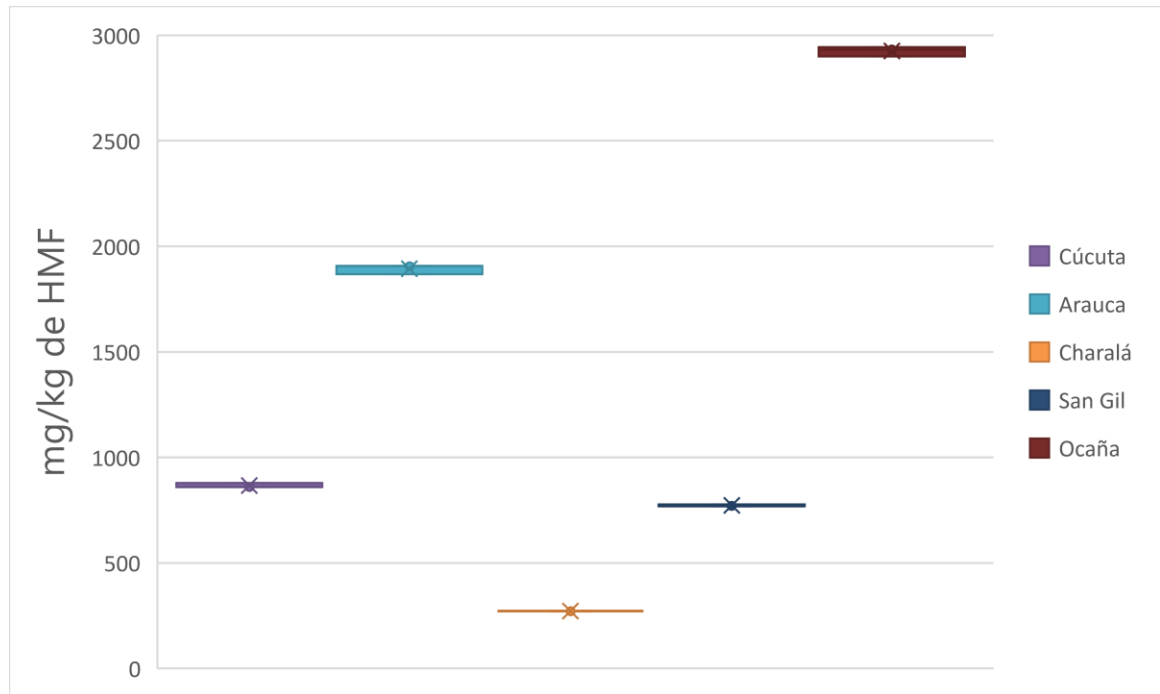
Región de la miel	Concentración de HMF, mg/kg
Vetas	14,7 ± 0,3 <sup>f</sup>
B/quilla	11,5 ± 0,1 <sup>f</sup>
Cúcuta	866 ± 11 <sup>c</sup>
Pamplona	52,0 ± 0,2 <sup>f</sup>
Arauca	1894 ± 22 <sup>b</sup>
Charalá	272 ± 2 <sup>e</sup>
San Gil	772 ± 4 <sup>d</sup>
Ocaña	2930 ± 23 <sup>a</sup>

Los resultados también se expresaron por medio de un diagrama de cajas y bigotes; se puede observar (Figura 14 y 15) la diferencia significativa entre las muestras de mieles para las concentraciones de HMF.

Figura 14. Distribución de caja y bigotes de concentración de HMF en mieles de Vetas, Barranquilla y Pamplona.



**Figura 15. Distribución de caja y bigotes de concentración de HMF en mieles de Cúcuta, Los Llanos, Charalá, San Gil y Ocaña.**



Las concentraciones de HMF determinadas en las ocho mieles colombianas variaron entre 15 y 2930 mg/kg. Las mieles de Vetás, Barranquilla y Pamplona mostraron una concentración de HMF menores que 55 mg/kg. La concentración de HMF más alta se observó en la miel de Ocaña. Tanto ésta como las mieles de Cúcuta, Arauca, Charalá y San Gil se encontraron concentraciones muy por encima de la reglamentación (60 mg/kg), lo que sugiere que estas mieles se almacenaron en condiciones inapropiadas y que no cumplen con la concentración reglamentada por las normativas. Se ha demostrado, que el parámetro de HMF se relaciona con la calidad de la miel y su tratamiento térmico, pero no con su origen (Boussaid *et al.* 2014).

Además, la concentración de HMF en la miel depende de la cantidad adulterada de sacarosa que pueden modificar tanto los valores de F/G, como la concentración de sacarosa. Esto se debe a que el HMF puede ser producido por el calentamiento de

azúcares provenientes de una inversión de la sacarosa (en presencia de un medio ácido) (da Silva *et al.* 2016).

El HMF es un excelente indicador de frescura y pureza de la miel; altas concentraciones de HMF en la miel indican condiciones de sobrecalentamiento o de almacenamiento inadecuado (García-Villanova *et al.* 1993). De acuerdo con el Resolución 1057 del Ministerio de la Protección Social, el contenido de HMF de la miel no debe superar los 60 mg/kg.

## 5.5 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LAS MIELES

El contenido de humedad, de cenizas y acidez libre se determinaron en ocho mieles de las regiones de Vetas, Barranquilla, Cúcuta, Pamplona, Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña.

A los datos finales, se les realizó un análisis de varianza de un solo factor, y se obtuvieron valores de F para cada grupo de datos con un nivel de significancia del 95%. Los resultados de la prueba F se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de la prueba de Fischer para la determinación de características fisicoquímicas.

<b>Variable</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Valor de F experimental</b>	<b>Valor crítico de F</b>
Contenido de humedad	n <sub>1</sub> = 7 n <sub>2</sub> = 16 (3 réplicas)	375,85	2,66
Contenido de cenizas	n <sub>1</sub> = 7 n <sub>2</sub> = 8 (2 réplicas)	83,82	3,50
Acidez libre	n <sub>1</sub> = 7 n <sub>2</sub> = 8 (2 réplicas)	1897,75	3,50

La prueba F de Fischer muestra que el valor de F experimental fue más alto que el valor crítico de F, lo que indica que los resultados en cada grupo de datos difieren significativamente entre sí.

Seguidamente, se usó el *software* MiniTab 16 (versión de prueba) para implementar una prueba de Tukey (para un nivel de confianza del 95%) con el fin de agrupar los datos con valores que tienen un orden de magnitud similar. Los resultados se muestran en la Tabla 13 como el promedio de los valores de humedad, cenizas y acidez  $\pm$  la desviación estándar; los datos que comparten la misma letra de superíndice no poseen diferencias significativas.

**Tabla 16. Resultados de características fisicoquímicas de las mieles evaluadas.**

<b>Región de la miel</b>	<b>Índice de refracción</b>	<b>Contenido de humedad, %</b>	<b>Contenido de cenizas, %</b>	<b>Acidez libre, meq/kg</b>
Vetas	1,4969	15,9 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>	0,317 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	31,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Barranquilla	1,4930	17,4 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	0,198 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup>	34,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Cúcuta	1,4969	15,9 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>	0,217 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	35,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Pamplona	1,4910	18,2 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,138 $\pm$ 0,003 <sup>d</sup>	34,4 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
Arauca	1,5021	13,9 $\pm$ 0,0 <sup>e</sup>	0,015 $\pm$ 0,001 <sup>g</sup>	24,7 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>
Charalá	1,5007	14,4 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	0,060 $\pm$ 0,002 <sup>e</sup>	20,7 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>
San Gil	1,5012	14,2 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	0,039 $\pm$ 0,001 <sup>f</sup>	16,2 $\pm$ 0,3 <sup>f</sup>
Ocaña	1,5002	14,6 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>	0,020 $\pm$ 0,001 <sup>g</sup>	18,7 $\pm$ 0,3 <sup>e</sup>

Los resultados de la Tabla 16 muestran que el contenido de humedad varía entre 13,9 y 18,2%. Se observa que la miel de la región de Pamplona posee el valor más alto de humedad, de 18,2%. Las mieles de las regiones de Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña presentan valores de humedad bajos, entre 13,9 y 14,6%. En general las mieles estudiadas presentan valores de contenido de humedad por debajo del valor permitido (< 20%) en las normativas de Colombia y de la Comisión Europea para su comercialización.

El contenido de agua está estrictamente relacionado con el grado de madurez en la colmena, el origen botánico de la muestra de miel, las técnicas de cosecha y la extracción del panal en relación con el proceso de maduración por las abejas (Belay *et al.* 2013). Además, altos porcentajes de humedad, por encima del 27%, pueden dar inicio a la fermentación durante el almacenamiento, lo que resulta en la producción de etanol y dióxido de carbono (Kadri *et al.* 2016). En las mieles bajo estudio, se supone, por los valores de humedad obtenidos, que la formación de etanol y dióxido de carbono es casi nula al presentar un contenido de humedad tan bajo que no ocurre el proceso de fermentación.

Respecto al contenido de cenizas, reportado en la Tabla 16, se presentan valores entre 0,317 y 0,015%. La miel de la región de Vetas posee el valor más alto del contenido de cenizas, de 0,317%. En las mieles de las regiones de Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña se encontraron valores de contenido de cenizas bajos, que variaron entre 0,015 y 0,060%. En general las mieles estudiadas presentan valores por debajo del 0,6%, que es el valor aceptado de la cantidad de cenizas en las normativas del Colombia y de la Comisión Europea para su comercialización.

La acidez libre en las mieles estudiadas varía entre 16,2 y 35,2 meq/kg. Las mieles de las regiones de Barranquilla, Cúcuta y Pamplona tenían valores de acidez libre por encima de 34 meq/kg, mientras que las mieles de las regiones de Arauca, Charalá, San Gil y Ocaña tenían valores de acidez libre menores del 25,0 meq/kg. Todas las mieles bajo análisis tenían valores de acidez libre menores que 60 meq/kg, que es el valor aceptado dentro del criterio permitido del contenido de cenizas en las normativas del Colombia y de la Comisión Europea para su comercialización.

La acidez libre también está relacionada con el proceso de fermentación, para el cual valores altos de acidez libre pueden dar inicio a la fermentación durante el almacenamiento, lo que resulta en la producción de etanol y dióxido de carbono<sup>46</sup>.

En las mieles bajo estudio, se tiene una evidencia adicional de que no ocurre el proceso de fermentación debido a que los valores de acidez libre fueron bajos, lo que no permite que las mieles se fermenten.

## 5.6 EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LOS REQUISITOS

A continuación, se hace una compilación del cumplimiento de los criterios fisicoquímicos de las mieles naturales para su comercialización de acuerdo con los valores establecidos por las normativas del Ministerio de la Protección Social de Colombia y del *Codex Alimentarius* de la Comisión Europea.

Tabla 17. Cumplimiento de criterios fisicoquímicos en las mieles evaluadas.

Región de la miel	Contenido de azúcar reductor (fructosa + glucosa)	Contenido de sacarosa	Contenido de HMF	Contenido de humedad	Contenido de cenizas	Acidez libre
Vetas	S	N	S	S	S	S
Barranquilla	S	S	S	S	S	S
Cúcuta	N	N	N	S	S	S
Pamplona	S	S	S	S	S	S
Arauca	S	S	N	S	S	S
Charalá	S	N	N	S	S	S
San Gil	S	S	N	S	S	S
Ocaña	S	S	N	S	S	S

S = Sí cumple, N = No cumple

## 5.7 EVALUACIÓN DE MÉTODO

El límite de detección de sacarosa, glucosa y fructosa fueron de 24,9, 19,8 y 19,7 mg/L respectivamente; y el límite de cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa fueron de 28,4, 25,5 y 20,5 mg/L respectivamente, lo que indica que el método puede determinar estos azúcares en concentraciones mayores que 28 mg/L. Además, se obtuvieron valores de límite de detección menores a los reportados (Chávez-Servín *et al.* 2004; Chinnici *et al.* 2005).

La linealidad del método se determinó a través de los valores de  $R^2$  para las curvas de calibración de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF, en todos los casos los valores de  $R^2$  fueron mayores a 0,99. Esto confirma que el método se comporta linealmente en los rangos establecidos por los límites superior e inferior de sus respectivas curvas de calibración. Estos resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Parámetros de la linealidad del método.

Linealidad	Rango de aceptación			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	HMF
Límite superior	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	3,00 mg/L
Límite inferior	1 mg/mL	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL	0,25 mg/L
Puntos tomados	6	5	5	7
$R^2$	0,9992	0,9992	0,9999	0,9956

Se evaluó la exactitud del método por medio del porcentaje de recuperación de glucosa (%R) en una muestra de miel. Los resultados muestran un promedio de %R de 95% con una desviación de 5% (Tabla 19). El valor de t de Student experimental fue de 2,38, menor que el t de Student tabulado (2,45) (Miller y Miller 2002), lo que indica que el método posee una buena exactitud. Estos valores se establecieron con 6 grados de libertad y una confianza del 95%.

Tabla 19. Resultados de recuperación.

Concentración de glucosa inicial [mg/mL]	Concentración de glucosa adicional [mg/mL]	Concentración de glucosa total [mg/mL]	Porcentaje de recuperación [%]
1,19	4,00	4,70	87,74
	4,00	4,69	87,55
	8,00	8,98	97,34
	8,00	9,00	97,55
	12,00	12,60	95,07
	12,00	12,61	95,13
<b>Promedio</b>			95
<b>Desviación</b>			5
<b>Parámetro t de Student experimental</b>			2,38

Por último, se determinó la precisión por medio de la repetibilidad de los datos tomados por un solo analista empleando intervalos de tiempo de dos días entre medición, para un total de 6 ensayos. Los datos de porcentaje de azúcares reportaron coeficientes de variación (CV) entre 0,51 y 3,98% (Anexo 2) y los de concentración de HMF (para 3 ensayos) estuvieron entre 0,41 y 1,72% (Anexo 3); de acuerdo con estos valores, se evidencia que los datos cumplen con el criterio de precisión al mostrar valores de CV menores al 5% (Horwitz 1982).

## 6 CONCLUSIONES

Se confirmó que el método desarrollado para la determinación de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF cumple con criterios de linealidad, repetibilidad y exactitud según la Guía de Laboratorio para Validación de Métodos de Eurachem, que hacen al método lineal, preciso y exacto.

Se determinaron las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y HMF en las ocho mieles colombianas estudiadas, y se mostraron diferencias significativas entre ellos con una confianza del 95%. En tres de estas mieles el contenido de F/G (entre 1,1 y 1,3) y HMF (menor que 60 mg/kg) fue similar al reportado en la literatura.

Se evaluó el contenido de humedad, de cenizas y de acidez libre de las ocho mieles colombianas estudiadas reportándose resultados dentro de la normativa vigente. También se determinó que solo dos de las mieles evaluadas cumplen con los criterios de calidad respecto a la concentración de sacarosa, azúcares reductores y HMF reportados en las normativas del Ministerio de la Protección Social de Colombia y del Codex Alimentarius de la Comisión Europea.

## BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-AAL, E-S.M., ZIENA, H. M., YOUSSEF, M. M. Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: Detection by different methods. *Food Chemistry*. 1993. Vol. 48, p. 209–212.

ADAMS, Christopher. J., BOULT, Cherie H., DEADMAN, Benjamin J., FARR, Judie M., GRAINGER, Megan N.C., MANLEY-HARRIS, Merilyn, SNOW, Melanie J. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*. Marzo 2008. Vol. 343, no. 4, p. 651–659.

AGBLEVOR, F. A., HAMES, B. R., SCHELL, D., CHUM, H. L. Analysis of biomass sugars using a novel HPLC method. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2007. Vol. 136, no. 3, p. 309–326.

ALQARNI, Abdulaziz S., OWAYSS, Ayman A., MAHMOUD, Awad A. Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*. Enero 2016. Vol. 9, no. 1, p. 114–120.

BÉLANGER, Jacqueline MR, BISSONNETTE, Martine C., PARÉ, JR Jocelyn. Chromatography: principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. 1997. Vol. 18, p. 1–35.

BELAY, Abera, SOLOMON, W.K., BULTOSSA, Geremew, ADGABA, Nuru, MELAKU, Samuel. Physicochemical properties of the Hareenna forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*. December 2013. Vol. 141, no. 4, p. 3386–3392.

BERRÍO, Marcel, TRUJILLO, Mary, VALLEJO, Bibiana Margarita, BARBOSA, Hélber de Jesús. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC-

DAD para la cuantificación de Warfarina Sódica en una preparación extemporánea. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2013. Vol. 42, p. 122–133.

BOUSSAID, Amel, CHOUAIBI, Moncef, REZIG, Leila, HELLAL, Raoudha, DONSI, Francesco, FERRARI, Giovanna, HAMDI, Salem. Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arabian Journal of Chemistry*. Agosto 2014. DOI 10.1016/j.arabjc.2014.08.011.

CAPUANO, Edoardo, FOGLIANO, Vincenzo. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*. May 2011. Vol. 44, no. 4, p. 793–810.

CHÁVEZ-SERVÍN, Jorge L, CASTELLOTE, Ana I, LÓPEZ-SABATER, M.Carmen. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*. Julio 2004. Vol. 1043, no. 2, p. 211–215.

CHINNICI, Fabio, SPINABELLI, Umberto, RIPONI, Claudio, AMATI, Aureliano. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. March 2005. Vol. 18, no. 2–3, p. 121–130.

CHUTTONG, Bajaree, CHANBANG, Yaowaluk, SRINGARM, Korawan, BURGETT, Michael. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from Sureste de Asia (Tailandia). *Food Chemistry*. Febrero 2016. Vol. 192, p. 149–155.

CLAYDEN, GREEVES, WARREN and WOTHERS. *Organic Chemistry*. Segunda edición. Reino Unido: Oxford University Press, 2001.

COMISIÓN EUROPEA. DIRECTIVA 2001/110 relativa a la miel. 20 de diciembre de 2001.

DA SILVA, Priscila Missio, GAUCHE, Cony, GONZAGA, Luciano Valdemiro, COSTA, Ana Carolina Oliveira, FETT, Roseane. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*. Abril 2016. Vol. 196, p. 309–323.

ENGELHARDT, Heinz. *High Performance Liquid Chromatography*. Segunda edición. SaarbrOcken, Alemania: Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 58-94.

EURACHEM. *La Adecuación al uso de métodos analíticos*.

EYÉGHÉ-BICKONG, Hans A., ALEXANDERSSON, Erik O., GOUWS, Liezel M., YOUNG, Philip R., VIVIER, Melané A. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography B*. Febrero 2012. Vol. 885–886, p. 43–49.

FALLICO, B., ZAPPALÀ, M., ARENA, E., VERZERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*. April 2004. Vol. 85, no. 2, p. 305–313.

FERREIRA, IMPLVO, GOMES, A. M. P., FERREIRA, M. A. Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydrate Polymers*. 1998. Vol. 37, no. 3, p. 225–229.

FILIP, Miuța, VLASSA, Mihaela, COMAN, Virginia, HALMAGYI, Adela. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC–RI optimized method. *Food Chemistry*. May 2016. Vol. 199, p. 653–659.

FINCH, Paul. *Carbohydrates Structures, Syntheses and Dynamics*. London: Springer Netherlands, 1999. p 1-46.

GALANT, A.L., KAUFMAN, R.C., WILSON, J.D. Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry*. December 2015. Vol. 188, p. 149–160.

GARCÍA-VILLANOVA, Belen, GUERRA-HERNÁNDEZ, Eduardo, MARTÍNEZ-GÓMEZ, Elena, MONTILLA, Javier. Liquid chromatography for the determination of

5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993. Vol. 41, no. 8, p. 1254–1255.

HABIB, Hosam M., AL MEQBALI, Fatima T., KAMAL, Hina, SOUKA, Usama D., IBRAHIM, Wissam H. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry*. Junio 2014. Vol. 153, p. 35–43.

HAMILTON, R. J., SEWELL, P. A. (eds.). *Introduction to high performance liquid chromatography*. Segunda edición. New York: Chapman and Hall, 1982. 175-184.

HORWITZ, William. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*. 1982. Vol. 54, no. 1, p. 67A–76A.

KADRI, Samir Moura, ZALUSKI, Rodrigo, PEREIRA LIMA, Giuseppina Pace, MAZZAFERA, Paulo, DE OLIVEIRA ORSI, Ricardo. Characterization of Coffea arabica monofloral honey from Espírito Santo, Brasil. *Food Chemistry*. Julio 2016. Vol. 203, p. 252–257.

KOLA, Osman, SIMSEK, Merve, DURAN, Huseyin, BOZKIR, Hamza. HPLC Determination of Carotenoid, Organic Acid, and Sugar Content in Pepino (*Solanum muricatum*) Fruit During the Ripening Period. *Chemistry of Natural Compounds*. January 2015. Vol. 51, no. 1, p. 132–136.

KUPINA, Steve, ROMAN, Mark. Determination of Total Carbohydrates in Wine and Wine-Like Beverages by HPLC with a Refractive Index Detector. *Journal of AOAC International*. Marzo 2014. Vol. 97, no. 2, p. 498–505.

MAGWAZA, Lembe Samukelo, OPARA, Umezuruike Linus. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae*. Marzo 2015. Vol. 184, p. 179–192.

MCMURRY, John. *Organic chemistry*. Séptima edición. Belmont, USA : Cengage Brooks/Cole, 2010.

MILLER, James N. and MILLER, Jane C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta edición. Madrid, España: Pearson Education, 2002.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Colombia. Resolución 1057 de 2010 miel de abejas.

MOLNÁR-PERL, I. Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 891, no. 1, p. 1–32.

MOLNÁR-PERL, I. Simultaneous quantitation of acids and sugars by chromatography: gas or high-performance liquid chromatography? *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 845, p. 181–195.

MONIRUZZAMAN, Mohammed, SULAIMAN, Siti Amrah, KHALIL, Md Ibrahim, GAN, Siew Hua. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chem Cent J*. 2013. Vol. 7, p. 138.

MONTERO, C. Martínez, DODERO, MC Rodríguez, SÁNCHEZ, DA Guillén, BARROSO, C. G. Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: a review. *Chromatographia*. 2004. Vol. 59, no. 1–2, p. 15–30.

NAYIK, Gulzar Ahmad, DAR, B.N., NANDA, Vikas. Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India. *Arabian Journal of Chemistry*. Agosto 2015. DOI 10.1016/j.arabjc.2015.08.017.

OROIAN, Mircea. Physicochemical and Rheological Properties of Romanian Honeys. *Food Biophysics*. Diciembre 2012. Vol. 7, no. 4, p. 296–307.

ÖZCAN, Musa, ARSLAN, Derya, ALI CEYLAN, Durmuş. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. *Food Chemistry*. Enero 2006. Vol. 99, no. 1, p. 24–29.

PARÉ, J. R. J., BÉLANGER, J. M. R. *Instrumental methods in food analysis*. First Edition. Canada: Elsevier Science, 1997. Vol. 18. 37-59.

PARRIS, N. A. *Instrumental liquid chromatography: a practical manual on high-performance liquid chromatographic methods*. 2nd completely rev. ed. New York: Elsevier; Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub, 1984. Journal of chromatography library, v. 27.

PERIS-TORTAJADA, Miguel. HPLC determination of carbohydrates in foods. *Food analysis by HPLC*. 2012. Vol. 100, p. 233.

PRODOLLIET, Jacques, HISCHENHUBER, Claudia. Food authentication by carbohydrate chromatography. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 1998. Vol. 207, no. 1, p. 1–12.

RIBEIRO VASCONCELOS DE SÁ, Lívian, DE OLIVEIRA MOUTTA, Rondinele, PINTO DA SILVA BON, Elba, CHRISTE CAMMAROTA, Magali, SANTANA FERREIRA-LEITÃO, Viridiana. Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. *International Journal of Hydrogen Energy*. Octubre 2015. Vol. 40, no. 40, p. 13888–13900.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R., JIMÉNEZ-DÍAZ, I., ZAFRA-GÓMEZ, A., MORALES, J.C. Improved sample treatment for the determination of fructooligosaccharides in milk related products by liquid chromatography with electrochemical and refractive index detection. *Talanta*. Noviembre 2015. Vol. 144, p. 883–889.

SEMANA. Apicultura: una actividad con futuro. *Revista Semana*. Enero 4 2016.

SHIN, Yong Seub, PARK, So Deuk, KIM, Jwoo Hwan. Influence of pollination methods on fruit development and sugar contents of oriental melon (*Cucumis melo* L. cv. Sagyejeol-Ggul). *Scientia Horticulturae*. Mayo 2007. Vol. 112, no. 4, p. 388–392.

SORIA, A.C., GONZÁLEZ, M., DE LORENZO, C., MARTÍNEZ-CASTRO, I., SANZ, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*. Marzo 2004. Vol. 85, no. 1, p. 121–130.

SWARTZ, Michael. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Julio 13 2010. Vol. 33, no. 9–12, p. 1130–1150.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. *Validation of Compendial Procedures*. USP.

VERZELE, M., SIMOENS, G., VAN DAMME, F. A critical review of some liquid chromatography systems for the separation of sugars. *Chromatographia*. 1987. Vol. 23, no. 4, p. 292–300.

YILMAZ, Mustafa Tahsin, TATLISU, Nevruz Berna, TOKER, Omer Said, KARAMAN, Safa, DERTLI, Enes, SAGDIC, Osman, ARICI, Muhammet. Steady, dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups: Correlations with HPLC-RID results. *Food Research International*. Octubre 2014. Vol. 64, p. 634–646.

YUAN, Jian-Ping, CHEN, Feng. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC—dual detection. *Food Chemistry*. 1999. Vol. 64, no. 3, p. 423–427.

ZAPPALÀ, M., FALLICO, B., ARENA, E., VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. Marzo 2005. Vol. 16, no. 3, p. 273–277.

## ANEXOS

**Anexo A.** Tabla de correlación del índice de refracción con la humedad en mieles.

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

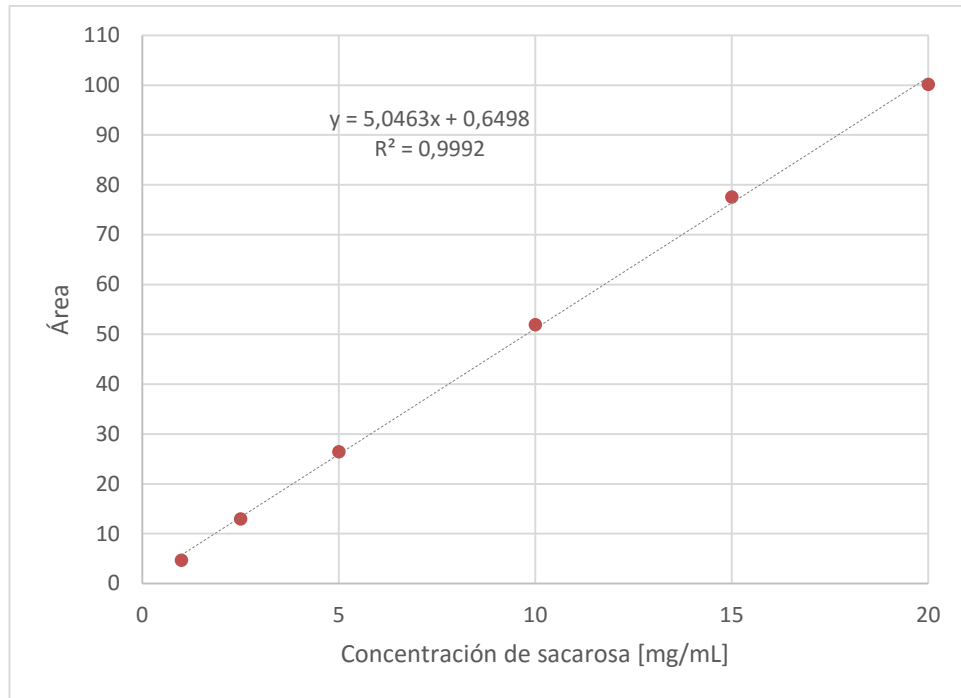
**Anexo B.** Tabla de datos de concentraciones de azúcares en las mieles.

Región de la miel	Analito	Ensayos, %						$\bar{x}$	$\sigma$	CV
		1	2	3	4	5	6			
Vetas	Sacarosa	12,67	12,74	12,71	12,74	12,61	12,79	<b>12,71</b>	<b>0,06</b>	<b>0,51</b>
	Glucosa	30,35	30,51	31,99	32,37	31,44	32,04	<b>31,5</b>	<b>0,8</b>	<b>2,69</b>
	Fructosa	37,73	37,84	38,72	38,69	38,13	38,34	<b>38,2</b>	<b>0,4</b>	<b>1,10</b>
B/quilla	Sacarosa	8,54	8,54	8,26	8,22	8,97	8,89	<b>8,6</b>	<b>0,3</b>	<b>3,62</b>
	Glucosa	31,50	31,55	32,34	32,35	34,22	33,82	<b>33</b>	<b>1</b>	<b>3,51</b>
	Fructosa	36,36	36,32	36,23	36,14	38,74	38,79	<b>37</b>	<b>1</b>	<b>3,49</b>
Cúcuta	Sacarosa	19,44	19,30	20,66	20,58	20,46	20,45	<b>20,2</b>	<b>0,6</b>	<b>3,03</b>
	Glucosa	30,01	29,63	32,35	32,15	32,10	32,15	<b>31</b>	<b>1</b>	<b>3,93</b>
	Fructosa	26,18	26,21	28,30	28,15	28,15	28,17	<b>28</b>	<b>1</b>	<b>3,75</b>
Pamplona	Sacarosa	8,70	8,70	9,18	9,21	9,49	9,51	<b>9,1</b>	<b>0,3</b>	<b>3,98</b>
	Glucosa	31,73	31,79	33,62	33,66	34,13	34,17	<b>33</b>	<b>1</b>	<b>3,40</b>
	Fructosa	36,49	36,48	38,63	38,61	39,07	39,13	<b>38</b>	<b>1</b>	<b>3,27</b>
Arauca	Sacarosa	2,39	2,46	2,56	2,57	2,60	2,60	<b>2,53</b>	<b>0,09</b>	<b>3,46</b>
	Glucosa	39,41	39,72	42,15	41,67	41,82	41,87	<b>41</b>	<b>1</b>	<b>2,94</b>
	Fructosa	33,00	32,97	34,95	34,53	34,72	34,71	<b>34,2</b>	<b>0,9</b>	<b>2,66</b>
Charalá	Sacarosa	16,96	17,31	17,74	17,78	17,88	17,80	<b>17,6</b>	<b>0,4</b>	<b>2,08</b>
	Glucosa	32,20	32,53	34,14	34,09	34,15	34,21	<b>33,6</b>	<b>0,9</b>	<b>2,77</b>
	Fructosa	28,33	28,33	29,72	29,70	29,77	29,79	<b>29,3</b>	<b>0,7</b>	<b>2,50</b>
San Gil	Sacarosa	6,03	6,20	6,54	6,40	6,52	6,70	<b>6,4</b>	<b>0,2</b>	<b>3,81</b>
	Glucosa	38,86	38,41	40,15	40,12	40,66	40,58	<b>39,8</b>	<b>0,9</b>	<b>2,35</b>
	Fructosa	33,75	33,76	34,84	34,86	35,47	35,39	<b>34,7</b>	<b>0,8</b>	<b>2,20</b>
Ocaña	Sacarosa	2,01	2,02	1,97	1,91	2,09	2,12	<b>2,02</b>	<b>0,08</b>	<b>3,84</b>
	Glucosa	40,60	40,42	41,65	41,59	42,81	42,80	<b>42</b>	<b>1</b>	<b>2,46</b>
	Fructosa	34,06	33,91	35,46	35,49	35,95	35,95	<b>35,1</b>	<b>0,9</b>	<b>2,62</b>

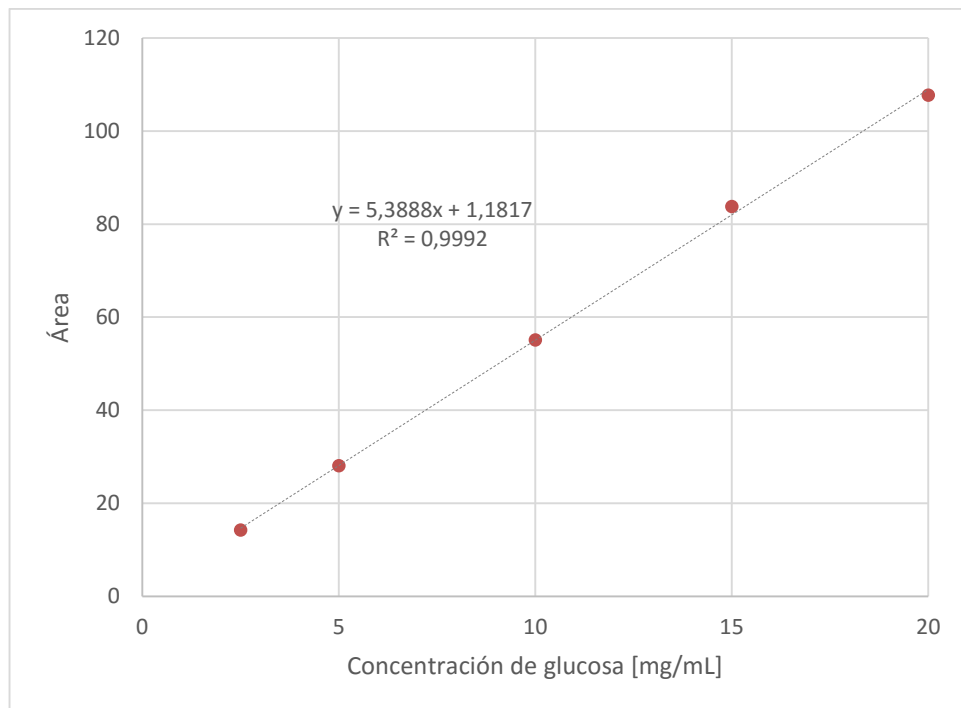
**Anexo C.** Tabla de datos de concentraciones de HMF en las mieles.

Región de la miel	Concentración HMF, mg/kg	$\bar{x}$	$\sigma$	CV
Vetas	14,381 14,841 14,793	14,7	0,3	1,72
B/quilla	11,486 11,639 11,366	11,5	0,1	1,19
Cúcuta	859,966 859,257 879,418	866	11	1,32
Pamplona	51,934 51,772 52,194	52,0	0,2	0,41
Arauca	1906,897 1905,610 1868,603	1890	22	1,15
Charalá	271,285 273,811 270,137	272	2	0,69
San Gil	768,773 770,271 776,514	772	4	0,53
Ocaña	2944,131 2931,532 2899,889	2930	23	0,78

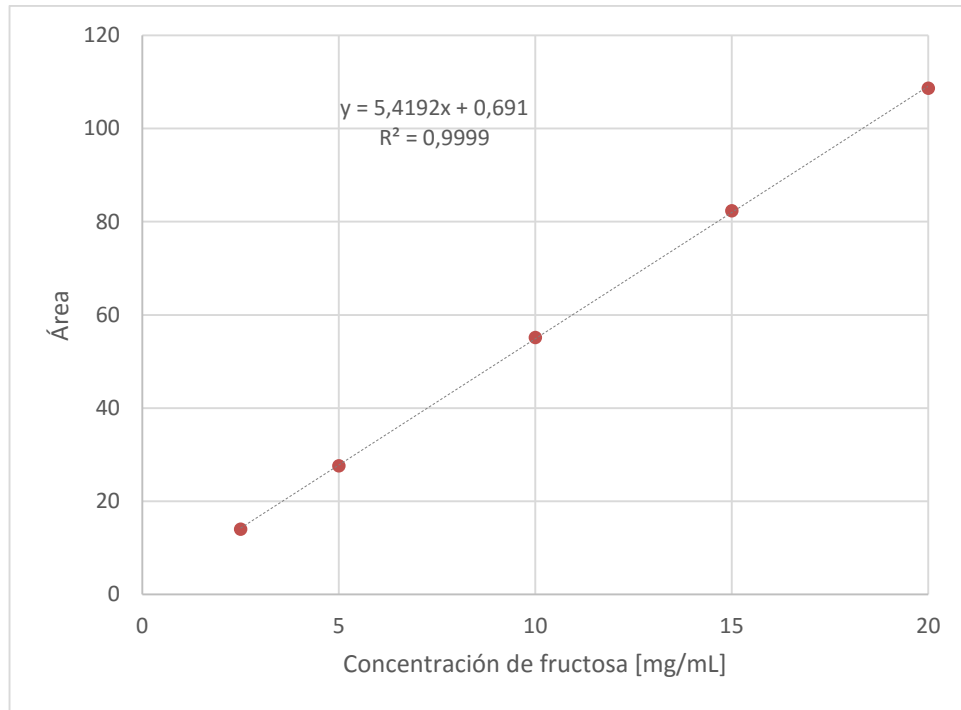
**Anexo D.** Curva de calibración del patrón de sacarosa.



**Anexo E.** Curva de calibración del patrón de glucosa.



**Anexo F. Curva de calibración del patrón de fructosa.**



**Anexo G. Curva de calibración del patrón de HMF.**

