



Universidad de Los Andes.  
Facultad de Ciencias.  
Departamento de Química.  
Laboratorio de Espectroscopia Molecular.  
Mérida-Venezuela.

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO.**

**DETERMINACIÓN DE METALES EN MIELES POR ESPECTROSCOPIA DE  
ABSORCIÓN ATÓMICA.**

Bachiller: Adriana Rondón G.

Tutor: Dr. Carlos Rondón

Marzo 2024.

## **Agradecimientos.**

A Dios, el hacedor de las cosas en mi vida; a mis padres Anuario Rondón y Gizela Gutiérrez por siempre estar apoyándome incondicionalmente en todo aspecto. A José Ramón Salazar por formar parte de este proceso y ser mi apoyo.

A la Universidad de Los Andes, por brindarme la oportunidad de prepararme académicamente.

Al Dr. Carlos Rondón, mis sinceros agradecimientos por la conducción y apoyo de la tesis.

Al Dr. Carlos Ayala por contribuir en el desarrollo de esta investigación y al Licenciado Fernando Méndez, por la orientación y apoyo incondicional, quien compartió conocimientos y experiencias a lo largo de los 03 años de trabajo.

Al Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM) y al Laboratorio de Investigación de Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA), por posibilitar llevar a cabo esta investigación.

A los apicultores, por permitirme trabajar con ellos y darme las facilidades en la recolección de muestras.

Al Dr. Freddy Ampueda y el Dr. Alexis Zambrano, por su tiempo y dedicación en la evaluación y corrección de este trabajo.

A los profesionales, amigos y familiares que, de una forma u otra, hicieron posible la culminación de este largo y arduo camino en mi formación académica, pero maravillosa experiencia.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Índice de contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	9
Introducción.....	10
<b>CAPITULO I. ASPECTOS GENERALES .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la miel.....</b>	<b>12</b>
I.1.1. Miel.....	12
I.1.2. Proceso de producción de miel, de las abejas.....	12
I.1.3. Proceso de producción de miel, por los apicultores.....	13
<b>I.2. Los metales en la miel.....</b>	<b>13</b>
I.2.1. Cobre.....	16
I.2.2. Hierro.....	17
I.2.3. Zinc.....	18
<b>I.3. Espectroscopia de absorción atómica con llama.....</b>	<b>19</b>
<b>I.4. Componentes del espectrofotómetro de absorción atómica.....</b>	<b>20</b>
I.4.1. Atomizadores.....	20
I.4.2. Atomizador de llama.....	20
I.4.3. Quemador.....	21
I.4.5. Llama.....	22
I.4.6. Fuentes de radiación.....	22
I.4.7. Lámpara de cátodo hueco.....	23
I.4.8. Monocromador y sistema óptico.....	23
I.4.9. Detector, amplificador y sistema de lectura.....	24
<b>I.5. Interferencias.....</b>	<b>24</b>
I.5.1. Interferencias espectrales.....	24
I.5.2. Interferencias no espectrales.....	25
<b>I.6. El selenio.....</b>	<b>26</b>
<b>I.7. Generación de hidruros como técnica para la determinación de selenio en miel.....</b>	<b>27</b>
I.7.1. Métodos de generación de hidruros por transferencia directa.....	30
I.7.2. Celda de atomización.....	31
I.7.3. Determinación de Se en miel por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros en flujo continuo.....	32
I.7.4. Diseño Experimental.....	33
I.7.5. Interferencias en el método de generación de hidruros.....	36
I.7.6. Eliminación de interferencias.....	37
I.7.7. Validación de un método.....	37
I.7.6. Características analíticas para la validación de un método.....	39
<b>I.8. Propiedades fisicoquímicas de la miel.....</b>	<b>41</b>
I.8.1. Parámetros de calidad de la miel.....	43
<b>I.9. Análisis sensorial u organoléptico.....</b>	<b>44</b>
I.9.1. Método de la rueda de la miel de aromas y sabores.....	45
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>47</b>
<b>II.1. Antecedentes para la investigación.....</b>	<b>47</b>
<b>II.2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>50</b>
<b>II.3. Justificación.....</b>	<b>51</b>
<b>II.4. Hipótesis.....</b>	<b>51</b>
<b>II.5. Objetivo general.....</b>	<b>52</b>

II.6. Objetivos específicos.....	52
CAPITULO III.....	53
III. Metodologías experimentales y resultados.....	53
III.1. Muestreo.....	53
III.2. Determinación de Se en miel por espectroscopia de absorción atómica en llama con generación de hidruros (HGAAS) en flujo continuo. ....	55
III.2.1. Reactivos.....	55
III.2.2. Soluciones.....	55
III.2.3. Digestión de la muestra. ....	56
III.2.4. Generación del hidruro de selenio para su determinación por EAA. ....	56
III.2.5. Diseño experimental.....	57
III.2.6. Características analíticas para la validación del método de la determinación de selenio por HGAAS en flujo continuo. ....	65
III.3. Determinación de Fe, Zn y Cu por espectroscopia de absorción atómica en llama.....	76
III.3.1. Reactivos.....	76
III.3.2. Soluciones.....	76
III.3.3. Validación del método.....	77
III.4. Análisis fisicoquímico.....	90
III.4.1. pH.....	90
III.4.2. Conductividad eléctrica. ....	94
III.4.3. Porcentaje de Humedad en la miel.....	98
III.4.4. Grados brix.....	99
III.5. Evaluación sensorial del color de las muestras de miel. ....	101
III.6. Análisis sensorial de los aromas y sabores de las muestras de miel.....	102
IV. Conclusiones.....	109
V. Recomendaciones.....	111
VI. Referencias bibliográficas.....	112

## Índice de tablas.

Tabla N° 1. Ingesta recomendada (adulto hombre/mujer) para algunos elementos minerales .....	14
Tabla N° 2. Valores límites para contenido mineral en miel según la FAO/WHO (2020)....	15
Tabla N° 3. Interferencias espectrales.....	25
Tabla N° 4. Interferencias no espectrales.....	25
Tabla N° 5. Ventajas y desventajas de la generación de hidruros en EAA.....	28
Tabla N° 6. Características analíticas para la validación de métodos.....	41
Tabla N° 7. Resumen de algunos de los parámetros más importantes para evaluar la calidad de la miel.....	43
Tabla N° 8. Diseño experimental seleccionado. Bloque 1. Digestión de la muestra.....	58
Tabla N° 9. Análisis de Varianza para ABSORBANCIA (ANOVA).....	59
Tabla N° 10. Factores establecidos y Óptimo.....	60
Tabla N° 11. Diseño experimental seleccionado. Bloque 2. Generación de hidruro.....	61
Tabla N° 12. Deseabilidad del experimento.....	63

Tabla N° 13. Factores establecidos y Óptimo, correspondiente a la ejecución 54.....	65
Tabla N° 14. Datos de la curva de calibración sencilla para el Se en HCl al 10%.....	66
Tabla N° 15. Datos de la curva de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.....	67
Tabla N° 16. Resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla de Se y con adición de estándar de Se para un pool de las muestras de miel.....	67
Tabla N° 17. Datos de la curva de adición estándar del Se en la muestra de miel N° 6.....	70
Tabla N° 18. Resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla de Se y con adición de estándar de Se en la muestra de mie N° 6.....	70
Tabla N° 19. Porcentajes de recuperación del Se, para las concentraciones 5, 100, 200 µg/L en la muestra N° 6 de miel, evaluado por triplicado.....	72
Tabla N° 20. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 5, 100, 200 µg/L de la muestra N° 6, para 10 días.....	73
Tabla N° 21. Resultados obtenidos para el selenio presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.....	74
Tabla N° 22. Resultados de la evaluación de la concentración de Se respecto a cada localidad .....	75
Tabla N° 23. Resultados de la curva de calibración sencilla de Cu y la curva de adición de estándar de Cu para un pool de las muestras de miel.....	78
Tabla N° 24. Figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Cu.....	79
Tabla N° 25. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,5; 2,0 y 4,0 mg/L de cobre en un pool de las muestras de miel evaluados por triplicado.....	80
Tabla N° 26. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,5; 2 y 4 mg/L del Cu en un pool de las muestras de miel, evaluados por 5 días.....	80
Tabla N°27. Resultados obtenidos para el cobre presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.....	81
Tabla N° 28. Resultados de la curva de calibración sencilla del Fe y la curva de adición de estándar del Fe para un pool de las muestras de miel.....	82
Tabla N° 29. Figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Fe.....	83
Tabla N° 30. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 1,0; 3 y 5 mg/L de Fe en un pool de las muestras de miel, evaluados por triplicado.....	83
Tabla N° 31. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 1; 3 y 5 mg/L del Fe en un pool de las muestras de miel, evaluado por 5 días.....	84
Tabla N° 32. Resultados obtenidos para el hierro presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.....	84
Tabla N° 33. Resultados de la evaluación de la concentración de Fe respecto a cada localidad.....	85
Tabla N° 34. Resultados de la curva de calibración sencilla del Zn y la curva de adición de estándar de Zn en un pool de las muestras de miel.....	86
Tabla N° 35. Figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Zn.....	87
Tabla N° 36. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,2; 0,6 y 1,0 mg/L del zinc, en un pool de las muestras de miel, evaluados por triplicado.....	87
Tabla N° 37. Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,2; 0,6 y 1,0 mg/L del zinc en un pool de las muestras de miel, evaluado por 5 días.....	88

Tabla N° 38. Resultados obtenidos para el zinc presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.....	88
Tabla N° 39. pH de las muestras de miel.....	90
Tabla N° 40. Conductividad de las muestras de miel.....	94
Tabla N° 41. Índice de refracción de las muestras, medidos a temperatura ambiente.....	98
Tabla N° 42. Porcentaje de Humedad de las muestras de miel empleando la tabla de Wedmore, a partir del nD corregido a 20°C.....	99
Tabla N° 43. Grados Brix de las muestras de miel a 24,5 °C.....	100
Tabla N° 44. Resultados de las propiedades fisicoquímicas determinadas para las muestras de miel recolectadas en el Estado Mérida.....	101
Tabla N° 45. Resultados para la evaluación sensorial del color de las muestras de miel...	102

### Índice de Gráficas.

Gráfica N° 1. Diagrama de Pareto Estandarizada para Absorbancia.....	59
Gráfica N° 2. Diagrama de Pareto Estandarizada para la Absorbancia.....	62
Gráfica N° 3. Curva de calibración sencilla del Se en HCl al 10%.....	66
Gráfica N° 4. Curva de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.....	67
Gráfica N° 5. Curva de calibración sencilla vs. Curva de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.....	68
Gráfica N° 6. Curva de adición estándar del Se en la muestra de miel N° 6.....	70
Gráfica N° 7. Curva de calibración sencilla vs. Curva de adición estándar del Se en la muestra de miel N° 6.....	70
Gráfica N° 8. Concentración de Se Vs. Localidad.....	75
Gráfica N° 9. Curva de calibración sencilla del Cu vs. Curva de adición estándar del Cu en un pool de las muestras de miel.....	78
Gráfica N° 10. Concentración de Cu Vs. Localidad.....	81
Gráfica N° 11. Curva de calibración sencilla del Fe vs. Curva de adición estándar de Fe en un pool de las muestras de miel.....	82
Gráfica N° 12. Concentración de Fe Vs. Localidad.....	85
Gráfica N° 13. Curva de calibración sencilla del Zn vs. Curva de adición estándar del Zn en un pool de las muestras de miel.....	86
Gráfica N° 14. Concentración de Zn Vs. Localidad.....	89
Gráfica N° 15. Concentración de Se Vs. pH.....	92
Gráfica N° 16. Concentración de Cu Vs. pH.....	92
Gráfica N° 17. Concentración de Fe Vs. pH.....	93
Gráfica N° 18. Concentración de Zn Vs. pH.....	93
Gráfica N° 19. Concentración de Se Vs. conductividad.....	96
Gráfica N° 20. Concentración de Cu Vs. conductividad.....	96
Gráfica N° 21. Concentración de Fe Vs. Conductividad.....	97
Gráfica N° 22. Concentración de Zn Vs. conductividad.....	97
Gráfica N° 23. Aromas vía nasal de las muestras.....	104
Gráfica N° 24. Resumen de la evaluación de los aromas vía nasal de las muestras.....	104

Gráfica N° 25. Rueda de las familias de aromas vía nasal, para las muestras de miel analizadas.....	105
Gráfica N° 26. Aromas vía retronasal de las muestras.....	105
Gráfica N° 27. Resumen de la evaluación de los aromas vía retronasal de las muestras.....	106
Gráfica N° 28. Rueda de las familias de aromas vía retronasal, para las muestras de miel analizadas.....	106
Gráfica N° 29. Comparación ente los aromas por vía nasal (aromas percibidos en la nariz) y vía retronasal (aromas percibidos en la boca).....	107
Gráfica N° 30. Sensaciones y sabores de las muestras de miel analizadas.....	108

### Índice de figuras.

Figura 1. Quemador- nebulizador de premezclado o de flujo laminar.....	21
Figura 2. Esquema de la estructura de la llama.....	22
Figura 3. Lámpara de cátodo hueco.....	23
Figura 4. Celda de atomización en el espectrómetro de absorción atómica.....	31
Figura 5. Flujo de compuestos aromáticos hacia la región olfativa por la vía nasal y retronasal.....	45
Figura 6. Rueda de y aromas de la miel (IHC, 2001a).....	46
Figura 7. Esquema del sistema de generación de hidruros en flujo continuo.....	57

### Anexos

Anexo 1. Encuesta para Apicultores.....	122
Anexo 2. Digestión húmeda de las muestras de miel con plancha de calentamiento.....	123
Anexo 3. Espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN SpectrAA 110 y sistema de generación de hidruros en flujo continuo.....	123
Anexo 4. Bloque 1. Digestión de la muestra.....	124
Anexo 5. Bloque 2. Generación del Hidruro.....	125
Anexo 6. Tabla de Wedmore.....	127
Anexo 7. Clasificación de la coloración de la miel de acuerdo a escala Pfund (mm) del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA).....	128
Anexo 8. Evaluación sensorial del color de las muestras de miel.....	128
Anexo 9. Etapa de capacitación.....	129
Anexo 10. Etapa de evaluación.....	129
Anexo 11. Rueda de aromas y sabores de la miel. Traducida al castellano de acuerdo al leguaje local para una mayor comprensión, de la rueda de aromas y sabores de la miel, figura 2.....	130
Anexo 12. Planilla para la evaluación sensorial de las mieles (primera parte: indicar la intensidad en la escala de 0 a 10).....	131
Anexo 13. Planilla para la evaluación sensorial de las mieles (segunda parte: indicar la intensidad en la escala de 0 a 10, donde no se indique marcar con X).....	131
Anexo 14. Glosario de términos para el análisis sensorial de las mieles.....	122

## Resumen.

En este trabajo se estudiaron diversas mieles recolectadas en casas apícolas y de producción artesanal en el estado Mérida con el objetivo de determinar metales mediante espectroscopia de absorción atómica en llama y parámetros de calidad para evaluar la calidad de las mieles. El selenio en la miel se determinó empleando la técnica de espectroscopia de absorción atómica acoplada a un generador de hidruros. Las metodologías desarrolladas en el tratamiento previo de la muestra y en la generación de hidruro de selenio, se optimizaron utilizando análisis multivariado y el diseño experimental de Box-Behnken, por bloque, aleatorizado, enmarcado en la quimiometría, reduciendo el costo y tiempo de análisis. La validación del método propuesto en base a los resultados obtenidos de las pruebas experimentales y al tratamiento estadístico de las mismas, comprobó la ausencia del efecto matriz. Las características analíticas para la determinación de selenio fueron: el límite de detección (LOD):  $0,7 \mu\text{g/L}$ , el límite de cuantificación (LOQ):  $2,4 \mu\text{g/L}$  y el intervalo lineal:  $(2,4 - 200) \mu\text{g/L}$ . El método empleado para el análisis del selenio fue validado mediante estudios de recuperación en las mismas condiciones experimentales y el mismo día ( $94,6 \pm 0,1$  % y  $103,3 \pm 0,3$  %), y repitiendo la metodología durante 10 días ( $96 \pm 1$  % y  $104 \pm 1$  %), dando resultados dentro del intervalo establecido para este estudio, con una desviación estándar relativa (RSD%) menor a un 5%, lo cual indica que los métodos empleados fueron exactos, precisos y libres de interferencia, permitiendo la determinación de selenio mediante espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros en flujo continuo, dando como resultado, que las concentraciones de selenio en las muestras recolectadas en el Estado Mérida, están entre el  $(17 \pm 1) \mu\text{g/L}$  y  $(55 \pm 1) \mu\text{g/L}$ , resultado que se encuentra dentro de los límites establecidos para el consumo humano.

El método por espectroscopia de absorción atómica en llama desarrollado, permitió determinar que las concentraciones de cobre, hierro y zinc, en cada una de las muestras recolectadas en el Estado Mérida, se encuentran entre  $(0,33 \pm 0,02) \text{mg/L}$  y  $(0,57 \pm 0,02) \text{mg/L}$  para el Cu;  $(2,3 \pm 0,1) \text{mg/L}$  y  $(4,5 \pm 0,2) \text{mg/L}$  para el Fe y  $(0,25 \pm 0,01) \text{mg/L}$  y  $(0,51 \pm 0,01) \text{mg/L}$  para el Zn. Estos resultados están dentro de los intervalos establecidos del Cu, Fe y Zn en la miel y están dentro de los límites aceptables para el consumo humano. Estas técnicas demostraron poseer intervalos de exactitud, precisión y sensibilidad adecuados para la determinación de las concentraciones elementales en una matriz compleja como la miel, obteniendo resultados exactos, precisos y rápidos, siendo fácilmente implementables en trabajos de rutina en el laboratorio con lo cual se puede hacer un constante control de calidad a las mieles en el Estado Mérida. Adicionalmente se caracterizaron dichas mieles desde el punto de vista fisicoquímico encontrado que el intervalo de pH de las muestras de miel se encuentra entre  $(3,51 \pm 0,02)$  y  $(4,17 \pm 0,01)$ , la conductividad eléctrica está entre  $(227 \pm 1) \mu\text{S}$  y  $(511 \pm 4) \mu\text{S}$ , el índice de refracción corregido a  $20^\circ\text{C}$  está entre  $(1,4832 \pm 0,0001) \text{nD}$  y  $(1,49416 \pm 0,00001) \text{nD}$ , el porcentaje de humedad está entre  $(17,0$  % y  $21,4)$  % y el % Brix entre  $(76,3 \pm 0,1)$  y  $(80,4 \pm 0,1)^\circ\text{Brix}$ . Así mismo se realizó un análisis sensorial y organoléptico permitiendo realizar estudios de calidad siendo el primer estudio en realizarse respecto a la miel proveniente de la abeja *Apis mellifera*, en esta localidad, brindando un soporte para posteriores estudios de calidad.



## Introducción.

La miel es la sustancia natural dulce, producida por abejas obreras productoras de miel, principalmente por la abeja *Apis mellífera*, a partir de la recolección del néctar de flores, secreciones de plantas o excreciones de insectos (mielato), que éstas liban, trasportan, trasforman y combinan con otras sustancias propias de las abejas, posteriormente deshidratan, concentran y almacenan en panales hasta que madure.<sup>1</sup> Constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre ha utilizado para nutrirse debido a sus propiedades organolépticas y terapéuticas.<sup>2</sup>

La composición de la miel es compleja, las abejas usan enzimas y técnicas de deshidratación para transformar el azúcar del néctar en un alimento súper energético, compuesto de al menos 180 componentes químicos<sup>3</sup>. Su contenido difiere en tipos y cantidades dependiendo del origen botánico y geográfico de donde procedan, además existen factores externos que influyen en la calidad de la misma, como el clima, el manejo y la calidad del almacenamiento<sup>4</sup>. Un mal manejo, almacenamiento a altas temperaturas o humedad, producen la pérdida de la actividad enzimática, cambio de sabor, color y desarrollo microbiano en la miel<sup>5</sup>. Sus ingredientes principales son los carbohidratos o azúcares que representan el 70 u 80% de su contenido, influyendo en la higroscopicidad, viscosidad y baja actividad de agua,<sup>6</sup> pero también contiene una gran variedad de sustancias en menor proporción dentro de los que destacan antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, polen, fragancias y sabores vegetales.<sup>7</sup>

Además, se ha determinado que dentro de los compuestos presentes en la miel también se encuentran minerales que representa del 0.1% al 0.2% de su composición, pero puede exceder el 1% en algunos casos. Se han reportado aproximadamente 54 minerales presentes en miel, que incluyen los macroelementos Na, K, Ca, Mg, los cuales son requeridos en grandes cantidades diarias y desempeñan importantes funciones en el organismo humano y elementos no esenciales. También puede contener elementos traza, que pueden o no ser requeridos en el organismo y cuya ingesta excesiva de cualquiera de estos elementos produciría efectos tóxicos y graves consecuencias para la salud.<sup>8,9</sup>

La espectroscopia de absorción atómica en llama, es una de las técnicas más utilizada para determinar elementos metálicos. Esta técnica tiene grandes ventajas y es de costo relativamente bajo, pudiéndose aplicar a una gran variedad de muestras. La espectroscopia de absorción

atómica con horno de grafito o con generación de hidruros alcanza límites de detección hasta de ppb, siendo de gran utilidad en áreas como son estudios de contaminación ambiental, análisis de alimentos, análisis de aguas potables y residuales, diagnóstico clínico, etc.<sup>10</sup>

La técnica de generación de hidruros es un método de análisis directo para la determinación de selenio, basado en la volatilización del elemento de interés. Esta técnica implica la generación del hidruro, para ello la muestra que contiene el analito se mezcla con una solución ácida como el ácido clorhídrico (HCl) obteniendo un medio ácido, luego se mezcla con una solución de borohidruro de sodio en medio alcalino. Esta reacción produce hidrógeno atómico que reacciona con el analito en solución (Se) para formar el hidruro volátil<sup>11</sup>. Una vez formado el hidruro, necesita ser liberado de la mezcla de reacción para lo que se utiliza un gas no reactivo ( $N_2$  o Ar), obteniendo la fase gaseosa que contiene al hidruro y que se separa de la fase líquida. Éste proceso ocurre en el separador de fases. El hidruro ya liberado es llevado al sistema de atomización con ayuda del gas inerte.<sup>12</sup>

La descomposición o atomización del hidruro hasta la forma elemental del analito dentro del sistema de atomización y detección, consiste en una celda de cuarzo calentada con una llama aire/acetileno, donde el hidruro se descompone hasta la forma elemental del analito, ésta se encuentra situada en el camino óptico del equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica que realiza la determinación cuantitativa del elemento estudiado<sup>11,12</sup>. La metodología descrita corresponde al modo de generación de hidruros a través de flujo continuo, donde un flujo constante de la solución de la muestra en medio ácido, se mezcla con un flujo continuo de borohidruro de sodio y el gas de purga. Las distintas fases (líquida y gaseosa) se separan (en un separador de fases) y esta fase gaseosa se difunde al atomizador.<sup>13</sup>

En el presente trabajo especial de grado, se realizará la determinación de los elementos metálicos Cu, Fe, y Zn, en mieles recolectadas en casas apícolas y de producción artesanal en el Estado Mérida, mediante la técnica de espectroscopia de adsorción atómica en llama, que son esenciales para el ser humano. Al igual que se determinará el selenio como elemento traza mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros. También se llevará a cabo un estudio fisicoquímico y su análisis sensorial u organoléptico, que consistirá en traducir cualitativa, cuantitativa y objetivamente las sensaciones que el catador percibe al observar, oler y degustar la miel de cada una de las muestras recolectadas por medio de las cuales se podrá tener una idea de su composición y procedencia.

## **CAPITULO I. ASPECTOS GENERALES.**

### **I.1. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la miel.**

#### **I.1.1. Miel.**

La miel es la sustancia natural dulce, que producen las abejas, principalmente la abeja *Apis mellífera*, a partir de la recolección del néctar de las plantas (miel de flores), de secreciones de partes vivas de estas o de excreciones de insectos succionadores (hemíptera) de plantas, secreciones de partes vivas de las mismas (miel de mielada) del néctar de flores, secreciones de plantas o excreciones de insectos (mielato), que éstas liban, transportan, transforman y combinan con otras sustancias propias de las abejas, posteriormente deshidratan, concentran y almacenan en panales hasta que madure.<sup>1,14</sup> En consecuencia, existe una amplia variedad de mieles, que dependen del tipo de sustancia que hayan recogido las abejas puesto que estas varían en su composición y concentración dependiendo del origen botánico y geográfico de donde procedan, teniendo presente que también influyen factores externos en la calidad de la misma, como el clima, el manejo y el almacenamiento.<sup>4</sup>

#### **I.1.2. Proceso de producción de miel, de las abejas.**

Las abejas son las intermediarias entre el néctar y la miel, ellas no solo recolectan el néctar, lo transforman químicamente, por medio de cambios físicos y químicos. Los cambios físicos se deben principalmente a un proceso de evaporación, donde el néctar con 70% a 80% de agua, pierde hasta una tercera parte de la humedad durante su almacenamiento en la colmena. Los cambios químicos se deben a que usan enzimas y técnicas de deshidratación. Invertasa, Amilasa, Catalasa, diastasa, Glucosa Oxidasa, etc, que transforma el azúcar del néctar en un alimento súper energético, constituido por un 80% de hidratos de carbono (75% de azúcares monosacáridos, 10-15% de disacáridos y pequeñas cantidades otros azúcares), 17-18 % de agua y 3% de sustancias diversas. Entre las sustancias diversas cabe destacar: sustancias nitrogenadas, como lo son las enzimas y los aminoácidos; ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, antioxidantes, sustancias aromáticas, pigmentos, cera, granos de polen, fragancias y sabores vegetales, etc.<sup>3,5,14,15,16</sup>

### **I.1.3. Proceso de producción de miel, por los apicultores.**

Una vez que las abejas han terminado su trabajo durante el proceso de floración comienza el trabajo por parte de los apicultores para cosechar la miel, la preparación de la colmena es el primer paso en la extracción de miel de abeja, este proceso comienza con la selección de colmenas listas para la cosecha, la señal de que la miel está lista para ser recolectada es cuando las abejas han llenado los panales y los han sellado con cera, proceso conocido como operculación. El apicultor debe decidir cuándo se recoge la miel, generalmente en los momentos en que las flores están en su máxima floración y las abejas han acumulado suficiente miel.<sup>17</sup> El siguiente paso es el desoperculado que consiste en retirar la fina capa de cera, este proceso se puede realizar manualmente con herramientas como cuchillos de desopercular o máquinas desoperculadoras. Una vez realizado este trabajo, se procede al centrifugado y extracción de la miel, esta etapa puede realizarse de manera manual obteniendo como resultado la miel escurrida o utilizando un extractor de miel, como por ejemplo la miel extraída por fuerza centrífuga. Después de la extracción, la miel contiene partículas de cera y otros residuos que deben ser eliminados puesto que estos le restan calidad al producto, siendo necesario el filtrado y purificación, para ello se utilizan filtros de diferentes tamaños eliminando impurezas, cuidando de no eliminar las valiosas enzimas y polen naturalmente presentes en la miel cruda.<sup>17,18,19</sup>

El almacenamiento y maduración son cruciales para desarrollar el sabor y la textura de la miel, después de filtrarla, la miel se almacena en tanques de maduración donde se asienta y clarifica, durante este tiempo, las burbujas de aire y las partículas más finas ascienden a la superficie, lo que facilita un último proceso de filtrado antes del envasado. El último paso es el envasado y etiquetado, la miel se envasa en recipientes limpios y esterilizados y el etiquetado debe cumplir con las normativas locales e incluir información relevante como el origen, tipo de miel, y fecha de envasado.<sup>17,19</sup>

### **I.2. Los metales en la miel.**

Los metales son sustancias propias de la naturaleza de peso molecular alto, muy difundidos y utilizados en el desarrollo actual de la sociedad. Los metales pueden ser perjudiciales para la salud humana, pero muchos resultan esenciales en la dieta básica y en algunos casos, su deficiencia o exceso puede conducir a problemas de salud.<sup>7</sup>

**Tabla N° 1.** Ingesta recomendada (adulto hombre/mujer) para algunos elementos minerales.<sup>20</sup>

Elemento	(UE) N° 1169/2011	EFSA	IOM
Ca	800 mg	950 mg	1000 mg
Cl	800 mg	-	2300/2200 mg
Cr	40 µg	-	35/25 µg
Cu	1 mg	1,6/1,3	0,9 mg
F	3,5 mg	0,05 mg/kg pc	3,4 mg
Fe	14 mg	11/16 mg	8/18 mg
I	150 µg	150 µg	150 µg
K	2000 mg	3500 mg	4700 mg
Mb	50 µg	65 µg	45 µg
Mg	375 mg	350/300 mg	420/320 mg
Mn	2 mg	3 mg	2,3/1,8 mg
Na	-	-	1500 mg
P	700 mg	550 mg	700 mg
Sal común	6 g	-	-
Se	55 µg	70 µg	55 µg
Zn	10 mg	9,4-16,3/7,5-12,7	11/8 mg

La Tabla N° 1 recoge los valores de Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para Ca, Cl, Cr, Cu, F, Fe, I, K, Mb, Mg, Mn, P y sal común (Na) que figuran en el Anexo XIII del Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 relativo al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, que tiene su origen en un informe de la FAO/OMS de 1988 y los valores de IDR establecidos por la EFSA<sup>16-28</sup> a partir de evidencias científicas recientes. Adicionalmente se incluyen los valores de IDR según el Institute of Medicine of the National Academies de Estados Unidos (IOM).<sup>20</sup>

La cantidad de metales en la miel depende principalmente del origen floral de las plantas visitadas por las abejas. Pero también pueden provenir de fuentes externas: Procedimientos incorrectos durante las etapas de producción. Conservación (envases) y la composición de la alimentación artificial (como el azúcar o el jarabe). A través de matrices ambientales como el aire y el suelo que contienen en muchos casos metales tóxicos, provenientes de provenientes de la industria, el tráfico y las prácticas agrícolas con productos agroquímicos.<sup>14,70</sup>

Los minerales más importantes que se encuentran en la miel son el (K), el más abundante, representa el 80% del total, seguido del (Na), (Ca) y (Mg). Los elementos menos abundantes son el(Fe), (Cu), (Mn), (Cl), Zn y en menor cantidad, oligoelementos como el boro (B), fósforo (P),

azufre (S), silicio (Si), bario (Ba) y níquel (Ni). Además, el contenido mineral contribuye al color, mieles más oscuras contienen un mayor contenido de minerales que mieles claras.<sup>21</sup>

Estos compuestos inorgánicos son de gran importancia para el buen funcionamiento del organismo humano, y en función de sus requerimientos diarios, se clasifican en macro minerales o macroelementos y micro minerales o elementos traza. Los macro minerales como el P, Ca, Mg, K y Na, sus sales son fácilmente asimilables por el organismo. Estos son de vital importancia para la actividad normal del cuerpo, su función principal es facilitar muchas reacciones químicas que ocurren en el metabolismo del ser humano. El Fe por ejemplo es un elemento que interviene en el transporte de oxígeno en la hemoglobina. Otros, como el Zn, Cu, Mo y Mn intervienen en procesos enzimáticos siendo cofactores de metaloenzimas. El Co forma parte de la cobalamina o vitamina B12. El Cr es un elemento que participa en el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y los ácidos nucleicos, el Ca y el P en los huesos se combinan para dar soporte firme a la totalidad del cuerpo, etc.<sup>9,14</sup>

Algunos de estos elementos minerales son necesarios en cantidades muy pequeñas en la dieta humana, pero son vitales para fines metabólicos, como cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe), níquel (Ni) y zinc (Zn), y los ya mencionados elementos traza o micro minerales como el selenio (Se). Sin embargo, existen algunos minerales en contenido traza como plomo (Pb), cadmio (Cd), aluminio (Al) y mercurio (Hg), que son considerados tóxicos si superan los límites de tolerancia, ya que no cumplen una función fisiológica conocida, pudiendo ser perjudiciales para la salud humana, al alterar el metabolismo.<sup>22</sup>

**Tabla N° 2.** Valores límites para contenido mineral en miel según la FAO/WHO (2020).<sup>14,23</sup>

<b>Minerales (ppm)</b>	<b>Valores límites FAO (ppm)</b>
Potasio (K)	400-35000
Sodio (Na)	16-170
Fosforo (P)	20-150
Calcio (Ca)	30-310
Magnesio (Mg)	7-130
Aluminio (Al)	0,1-24
Zinc (Zn)	0,5-20
Manganeso (Mn)	0,2-20
Hierro (Fe)	0,3-40
Cobre (Cu)	0,2-0,6

### **I.2.1. Cobre.**

El cobre es un metal de transición abundante en la naturaleza que, a temperatura ambiente y en estado natural se encuentra en estado sólido. Es brillante y de coloración rojiza (excepto en aleaciones con otros metales), caracterizado por ser uno de los mejores conductores térmicos y de electricidad (después de la plata). Es, además, resistente a la corrosión y a la oxidación. No responde bien a las fuerzas o campos magnéticos (es diamagnético). Si a ello sumamos su ligereza, alta maleabilidad, ductilidad y precio económico, se tiene uno de los elementos más idóneos para la fabricación de herramientas, piezas eléctricas y electrónicas, y muchos otros dispositivos de usos industriales, y de construcción; en aleaciones de bronce, latón y níquel se encuentran clavos, pernos, objetos decorativos, tuberías, techos, monedas, utensilios de cocina, joyería, muebles, maquillaje, pinturas, instrumentos musicales y medios de transporte. Además, el sulfato de cobre es uno de los primeros compuestos utilizados en alimentación animal como en pesticidas; las sales de cobre poseen efectos fungicidas, plaguicidas y algicidas.<sup>7,24</sup>

El cobre cumple un rol vital en los procesos fotosintéticos de las plantas, así como en el mantenimiento celular, nervioso, óseo e inmunitario en los animales vertebrados, incluyendo el hombre, participando en un gran número de procesos biológicos como el transporte de oxígeno, actividades redox y como cofactor de enzimas. Además, se encuentra en todos los tejidos del cuerpo humano, en la sangre, la orina, las heces, el cabello y las uñas. También se encuentra de manera natural en la dieta, tanto en los alimentos como en el agua, estimándose un consumo medio de 1mg de cobre al día. No obstante, una ingesta excesiva de este puede provocar efectos tóxicos en los organismos, ya que puede inhibir la actividad enzimática y afectar el funcionamiento normal de las células, tejidos y órganos, y entre los más afectados se encuentran las personas con la llamada Enfermedad de Wilson.<sup>7,24</sup>

Por otro lado, la deficiencia de cobre puede causar cansancio extremo, parches claros en la piel, altas concentraciones de colesterol en la sangre y trastornos del tejido conectivo que afectan los ligamentos y la piel. Otros efectos de la deficiencia de cobre son huesos débiles y quebradizos, pérdida de equilibrio y coordinación, y un mayor riesgo de infección.<sup>25</sup>

### I.2.2. Hierro.

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (5%). Es un metal maleable, tenaz, de color gris plateado y magnético. Los minerales principales son la hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), la limonita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y la siderita ( $\text{FeCO}_3$ ). La pirita ( $\text{FeS}_2$ ), y la cromita, ( $\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$ ), se explotan como minerales de azufre y de cromo, respectivamente. El uso más extenso del hierro (fierro) es para la obtención de aceros estructurales; también se producen grandes cantidades de hierro fundido y de hierro forjado. Entre otros usos del hierro y de sus compuestos se tienen la fabricación de imanes, tintes (tintas, papel para heliográficas, pigmentos pulidores) y abrasivos (colcótar).<sup>26,27</sup>

El Hierro puede ser encontrado en carne, productos integrales, patatas y vegetales. El cuerpo humano absorbe Hierro de animales más rápido que el Hierro de las plantas. Alrededor del el 0,004% del peso de una persona corresponde al Hierro, es decir, la media los seres humanos poseen 4,5 gramos de hierro en su organismo. La mayor parte del hierro, el 65% aproximadamente, se encuentra formando parte de la hemoglobina: éste agente colorante rojo de la sangre, transporta el oxígeno a través de nuestros cuerpos. Un pequeño porcentaje del hierro en el cuerpo humano, el 1%, se encuentra formando parte de diversas enzimas, y el resto se acumula en diversos órganos como bazo, el hígado o la médula ósea como potencial reserva para la producción de hemoglobina.<sup>26,27</sup>

Entre los problemas más importantes debidos a la falta de Hierro se encuentra la llamada anemia ferropénica, sus síntomas son el cansancio y la falta de energía, problemas de memoria y concentración o afecciones al sistema inmunológico. La falta de hierro durante el embarazo también puede perjudicar el desarrollo del cerebro del bebé y en niños puede causar retrasos en el desarrollo psicológico o problemas de atención.<sup>27</sup>

El exceso de Hierro también puede resultar perjudicial. Así, niveles anormalmente altos de hierro pueden provocar malestar y dolores estomacales y abdominales, estreñimiento, náuseas, diarrea y vómitos, inflamación de las paredes del estómago y úlceras. También existe una enfermedad hereditaria llamada hematomacrosis por la cual algunas personas tienden a acumular niveles excesivos de hierro que pueden resultar tóxicos y que si no es tratada adecuadamente puede causar problemas graves como enfermedades cardíacas, cirrosis hepática o cáncer del hígado. El contacto con los tejidos y permanencia en ellos puede provocar



conjuntivitis, coriorretinitis, y retinitis. La inhalación crónica de concentraciones excesivas de vapores o polvos de óxido de hierro puede resultar en el desarrollo de una neumoconiosis benigna, llamada sideriosis, que es observable como un cambio en los rayos X. También puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en trabajadores expuestos a carcinógenos pulmonares.<sup>26,27</sup>

### **I.2.3. Zinc.**

El zinc es uno de los elementos menos comunes, teniendo una abundancia en la corteza terrestre entre 0.0005 a 0.02%. La fuente principal de zinc es el sulfuro de zinc, ZnS, una mena llamada blenda de zinc, existen yacimientos en Australia, Canadá y Estados Unidos. También se encuentra en la mayor parte de los alimentos, especialmente en los que son ricos en proteínas.<sup>26,28</sup>

El zinc es un metal, clasificado como metal de transición, aunque estrictamente no lo sea, que presenta cierto parecido con el magnesio y el berilio además de los elementos de su grupo con la diferencia que es el único elemento que no es tóxico, como lo son el cadmio y el mercurio. Este metal es de color blanco azulado, lustroso, moderadamente duro y buen conductor de calor y de electricidad. Además, presenta una gran resistencia a la deformación plástica en frío, aunque en caliente disminuye progresivamente, lo que obliga a laminarlo por encima de 100° C.<sup>26,28</sup>

Uno de los principales usos del zinc lo constituye las aleaciones y el recubrimiento protector de otros metales. El hierro o el acero recubiertos con zinc se denominan galvanizados. El óxido de zinc es el compuesto más importante, el cual presenta una estructura de diamante, es decir, en el cristal cada átomo de zinc está rodeado tetraédricamente por cuatro átomos de oxígeno, y cada átomo de oxígeno está rodeado a su vez por cuatro átomos de zinc. Este óxido se emplea como pigmento blanco, o como componente en diversos esmaltes, en vidriados y ungüentos antisépticos. En combinación con el óxido de cromo (III), se le usa como catalizador en la fabricación de metanol, además el zinc es usado en las baterías alcalinas.<sup>28</sup>

El Zinc es un elemento traza que es esencial para la salud humana, necesario para muchas de las reacciones bioquímicas del cuerpo, especialmente para la formación de tejidos musculares y huesos. Es uno de los metales involucrados en la transmisión sináptica (entre neuronas) y en

numerosos procesos enzimáticos siendo cofactores de metaloenzimas, por lo que se trata de un elemento fundamental en la comunicación intracelular.<sup>29</sup>

Su deficiencia tiene consecuencias sobre el desempeño del sistema nervioso, ya que causa desórdenes emocionales, pérdida de memoria o disminución de la concentración. Además, se le asocia a la pérdida de cabello, debilidad en las uñas, cansancio general e incluso inapetencia sexual; puede experimentar una pérdida del apetito, disminución de la sensibilidad, el sabor y el olor, pequeñas llagas y erupciones cutáneas. Por contacto es una sustancia que irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio, pudiendo causar efectos en la sangre (metahemoglobinemia), el riñón, provocar vómitos, náuseas, y anemias si se produce una ingestión de elevadas cantidades, sin embargo, la sintomatología puede aparecer de forma no inmediata. En el Ambiente de trabajo el contacto con Zinc puede causar la gripe conocida como la fiebre del metal, que es causada por una gran sensibilidad al mismo.<sup>26,27,30</sup>

### **I.3. Espectroscopia de absorción atómica con llama.**

Para el análisis de metales en alimentos una de las técnicas más empleadas es la espectroscopia de absorción atómica con llama (FAA), debido a la sencillez de la instrumentación empleada (Espectrofotómetro de absorción atómica), un costo aceptable y su disponibilidad en los laboratorios, además de ser una de las técnicas más sensibles. Ésta técnica implica la vaporización y la atomización térmica de una muestra líquida por una llama. La disolución acuosa de la muestra, es aspirada y se dispersa (o nebuliza) como un fino aerosol en una cámara, donde se mezcla con el combustible y gases oxidantes para transportarla al quemador, allí se produce la combustión y la atomización de la muestra por la llama, de modo que los elementos a analizar se encuentran en forma de vapor de átomos.<sup>31</sup>

En ésta técnica existe una fuente independiente de luz, específica para cada elemento a analizar, que se hace pasar a través del vapor de átomos, midiéndose posteriormente la cantidad de energía de luz UV/visible o radiación absorbida por el elemento de interés. La longitud de onda de la luz absorbida corresponde a la energía necesaria para promover sus electrones desde el estado fundamental a un nivel de energía superior. La cantidad de energía absorbida en este proceso de excitación es proporcional a la concentración del elemento en la muestra.<sup>41</sup> Se basa en gran medida en la ley de Beer-Lambert:<sup>32</sup>

$$-\log \frac{I}{I_0} = k'b \text{ Ecuación (1).}$$

Donde  $k=2.303 k'$ . La relación  $I/I_0$  se denomina transmitancia (T) que mide la cantidad de luz transmitida después de haber atravesado el medio. Esta se expresa más convenientemente:

$$-\log T = A = \epsilon bc \text{ Ecuación (2).}$$

Donde  $A$  es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar,  $b$  es el paso óptico (cm) y  $c$  es la concentración en mol/L. Esta ecuación es muy útil para estudiar los aspectos cuantitativos de la absorción atómica.

#### **I.4. Componentes del espectrofotómetro de absorción atómica.**

##### **I.4.1. Atomizadores.**

Los atomizadores suministran la energía suficiente para la disociar las moléculas, romper sus enlaces y llevar los átomos al estado fundamental, éstos son de dos tipos, continuos y discretos. En los primeros, la muestra se introduce a una velocidad constante, produciendo una señal espectral constante en el tiempo como por ejemplo los atomizadores de Llama y los atomizadores de plasma de argón acoplado inductivamente. Con los atomizadores discretos, una cantidad medida de la muestra se introduce como un bolo de líquido o de sólido. La señal espectral en este caso alcanza un valor máximo y luego disminuye a cero cuando el vapor atómico abandona la región calentada. Los atomizadores electrotrmicos son generalmente del tipo discreto.<sup>33</sup>

##### **I.4.2. Atomizador de llama.**

La muestra (solución acuosa de sales inorgánicas disueltas) es aspirada de manera directa al atomizador o nebulizador, donde se convierte en una nube de gotas de tamaño muy pequeño a una velocidad constante, que genera una señal espectral constante con el tiempo, luego es conducida a la cámara de premezclado y posteriormente al quemador, para ello se hace uso del efecto Venturi. El aerosol formado por el flujo de gas oxidante se mezcla con el combustible (generalmente acetileno) y pasa a través de una serie de deflectores que eliminan las gotitas de disolución que no sean muy finas. Las partículas que tienen tamaños menores de 10  $\mu$ m, llega finalmente al quemador, más del 90% de la solución es desechada a través de un tubo de drenaje

que el nebulizador tiene para este fin. Evitando así, que partículas demasiado grandes alcancen el quemador y ocasionen falsas absorbancias y que la llama sea demasiado ruidosa tanto desde el punto de vista perceptible como electrónico.<sup>10</sup>

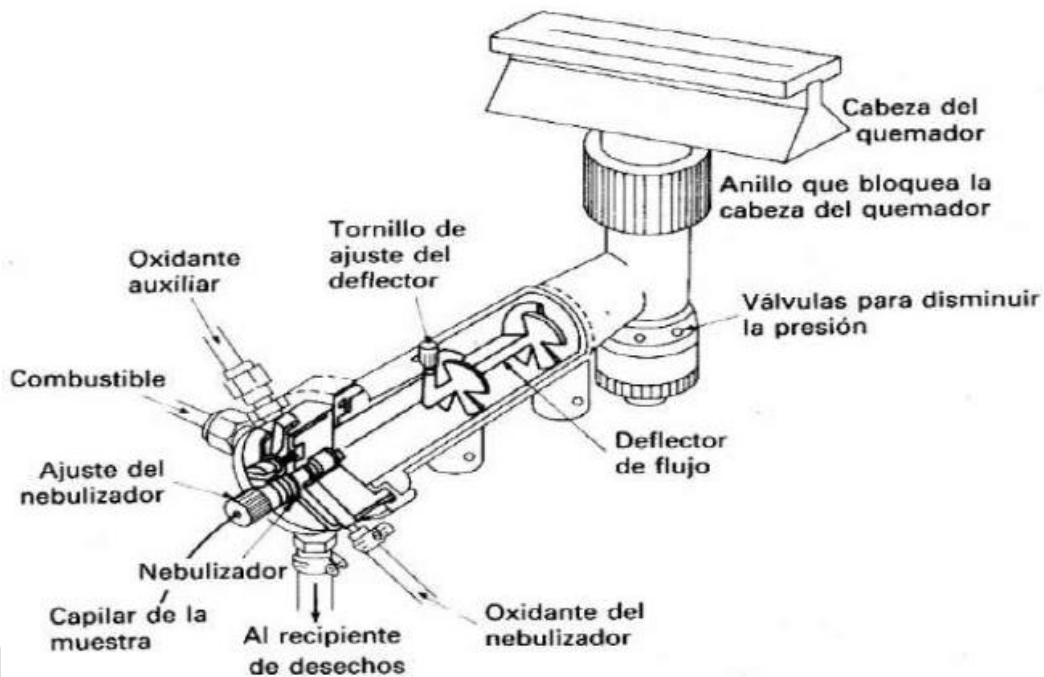


Figura 1. Quemador- nebulizador de premezclado o de flujo laminar.<sup>34</sup>

### I.4.3. Quemador.

En las gotas de solución que alcanzan a llegar al quemador ocurren los siguientes eventos:<sup>35</sup>

1. Desolvatación. Se forma el aerosol sólido (partículas de sal seca) al eliminar el agua y los disolventes. La velocidad de desolvatación depende de factores tales como el tamaño de las gotas, disolvente, velocidad de aspiración, temperatura de la llama, etc.
2. Vaporización. Las sales formadas, se descomponen por efecto de la temperatura, reduciendo el elemento al estado metálico. Es una etapa bastante crítica en los métodos que utilizan llama y depende de la composición química del analito, del tamaño de las partículas, de la temperatura de la llama y el tiempo (altura) en la llama.

### I.4.5. Llama.

Aporta la energía para generar átomos en su estado fundamental de los elementos presentes en la solución que contiene la muestra. Temperaturas cercanas a los 1,500 – 3, 000°C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa.<sup>37</sup>

Una vez que la muestra llega al mechero, el disolvente se evapora en la base de la llama (Zona de combustión primaria) Las partículas sólidas finamente divididas son transportadas a la región central de la llama (cono interno). Luego a la zona interconal que es la de mayor temperatura, ahí se lleva a cabo la atomización y excitación de los átomos, permitiendo mayor reproductibilidad del análisis por ser la región es rica en átomos libres. Los iones son transportados al borde más exterior, o cono externo, donde pueden oxidarse, convirtiéndose en óxidos moleculares estables que se dispersan por los alrededores.<sup>38</sup>

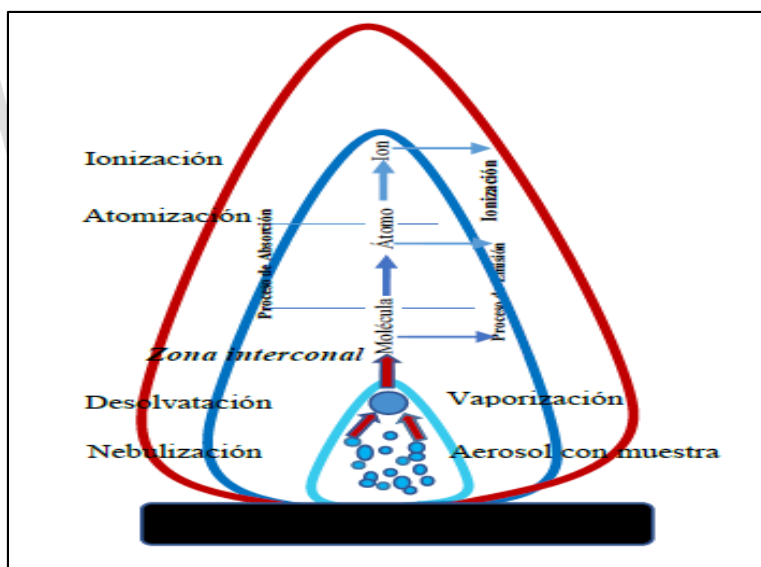


Figura 2. Esquema de la estructura de la llama.<sup>34</sup>

### I.4.6. Fuentes de radiación.

Son específicas para cada elemento, debido a que las líneas de absorción atómica son notablemente estrechas y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento.<sup>40,42</sup> La fuente de radiación a emplear en EAA deber ser lo suficientemente intensa a la longitud de onda de interés debe ser lo suficientemente estable como para poder realizar las

medidas sin fluctuaciones considerables. Existen varias fuentes de radiación de emisión continua, que abarcan el espectro desde el ultravioleta lejano hasta el visible, y las fuentes de emisión discontinua, que emiten únicamente a longitudes de onda muy concretas. Las fuentes de emisión discontinua son más usadas, entre las que se pueden distinguir las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos. Tanto unas como otras requieren un período de calentamiento antes de comenzar las mediciones.<sup>37,38</sup>

#### I.4.7. Lámpara de cátodo hueco.

Consiste de un ánodo de tungsteno y un cátodo cilíndrico, sellado en un tubo de gas lleno de neón o argón a una presión de 1 a 5 torr. El cátodo está construido con el metal que se desea analizar o bien sirve como soporte para una película de dicho metal. Cuando se aplica un alto voltaje entre el ánodo y el cátodo, el gas interior se ioniza en el ánodo y son atraídos por el cátodo. Los iones más rápidos chocan contra la superficie catódica arrancando átomos, que están excitados y emiten el espectro característico del metal utilizado, volviendo al estado fundamental. Esta radiación atómica tiene la misma frecuencia que la absorbida por átomos de analito en la llama o en el horno. De esta forma se puede detectar y medir fácilmente la absorción atómica.<sup>3,35</sup>

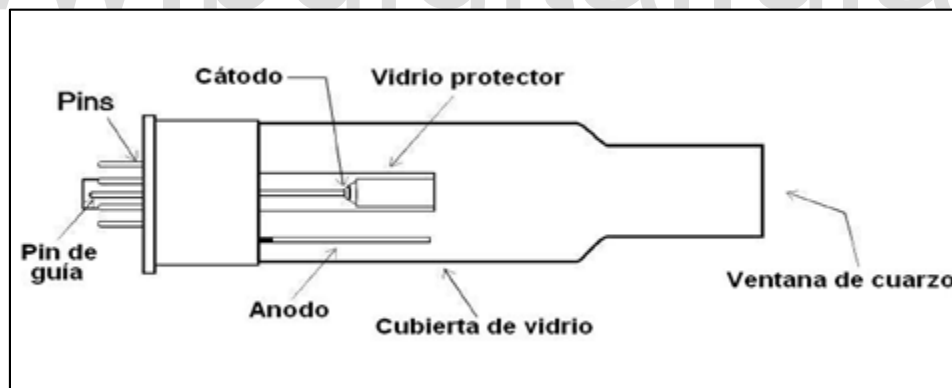


Figura 3. Lámpara de cátodo hueco.<sup>39</sup>

#### I.4.8. Monocromador y sistema óptico.

El monocromador es un selector de longitud de onda que permite seleccionar la línea de absorción de interés, separándola de las otras líneas espectrales emitidas por el cátodo hueco. En general, dispone de una rendija o ranura de entrada que limita la radiación lumínica producida por la fuente y la confina en un área determinada, un conjunto de espejos para pasar la luz a

través del sistema óptico, un elemento para separar las longitudes de onda de la radiación lumínica, que puede ser un prisma o una rejilla de difracción, y una rendija de salida para seleccionar la longitud de onda con la cual se desea iluminar la muestra. Parte de la radiación no absorbida es dirigida hacia el detector <sup>40</sup>

#### **I.4.9. Detector, amplificador y sistema de lectura.**

El sistema de detección mide la intensidad de la radiación que incide sobre él antes y después de la absorción por la muestra y la convierte en una señal eléctrica proporcional a la energía recibida. La señal eléctrica puede ser procesada y amplificada, para que pueda interpretarse a través del sistema de lectura, una vez procesada es presentada al analista de diferentes maneras (por ejemplo, unidades de absorbancia). Este puede estar diseñado con detectores de fotones, que tienen una superficie activa capaz de adsorber radiación, siendo usados para medir radiación UV, visible e IR cercano, donde la señal eléctrica es consecuencia de una serie de sucesos individuales (absorción de fotones individuales), cuya probabilidad se puede describir estadísticamente.<sup>40</sup>

Los tubos fotomultiplicadores son un tipo de detector, que contienen una superficie fotoemisora, así como varias superficies adicionales que emiten una cascada de electrones, cuando son alcanzados por los electrones procedentes del área fotosensible. El tubo fotomultiplicador tiene alta sensibilidad y rapidez en su respuesta, aproximadamente de 10 a 100 ms, que es el tiempo desde que un fotón incide en el fotocátodo hasta que el ánodo recibe la cascada de electrones.<sup>40</sup>

### **I.5. Interferencias**

#### **I.5.1. Interferencias espectrales.**

Tienen lugar cuando se produce absorción o emisión de radiación por una especie a la misma longitud de onda que el analito, o a una longitud de onda tan próxima que el monocromador no puede separar ambas señales. Éste efecto altera la señal de la longitud de onda de radiación electromagnética seleccionada manteniendo invariable la concentración de analito.<sup>34,37</sup>

**Tabla N° 3.** Interferencias espectrales.<sup>10,34,37,40</sup>

Interferencia	Efecto de la interferencia	Como contrarrestarlas
Traslapamiento de líneas atómica o superposición de líneas de resonancia.	Bandas de absorción de compuestos caen en el rango de la línea de absorción del analito, registrando una falsa absorbancia.	- Lámparas de un solo elemento. - Aumentar la temperatura (más fría o más caliente según sea el caso).
Dispersión de partículas.	Si el número de partículas sólidas que llegan al quemador son demasiado grandes, puede no completarse la descomposición de las partículas, ocasionando dispersión de partículas.	- Método de las dos líneas. - Método corrección de fondo (lámpara de deuterio).
Autoabsorción.	Se produce como consecuencia de la absorción de la radiación ( $h\nu$ ) por los átomos no excitados presentes en la llama y se produce cuando la concentración del elemento a determinar es alta.	- Efecto Zeeman.

**I.5.2. Interferencias no espectrales.**

Las interferencias no espectrales son aquellas que causan errores y que pueden dar origen a lecturas mayores o menores a los valores normales.

**Tabla N° 4.** Interferencias no espectrales.<sup>10,40</sup>

Interferencia	Efecto de la interferencia	Como contrarrestarlas
Interferencias químicas.	Algún tipo de compuesto químico está presente, o se forma en la llama, con la consiguiente disminución de la población de átomos libres.	- Adición de agentes liberadores en la muestra (La o Sr). - Agentes complejantes como EDTA. - Lámparas de un solo elemento. - Método de adición de estándares.
Interferencias por ionización.	El elemento pierde fácilmente uno o más de sus electrones más externos, ocurre la ionización. (alcalinos y alcalinotérreos).	- Adicionar un supresor de ionización. Ej. CsCl (65% de ionización) determinación de elementos del grupo 1 y 2.
Interferencias por propiedades físicas de las soluciones.	Densidad, viscosidad y/o tensión superficial). Pueden afectar a la aspiración y eficiencia de nebulización en el sistema de atomización.	- Propiedades físicas y la matriz sea la misma en la muestra y en los patrones. - Método de adición estándar.



		-Operar con soluciones más diluidas.
Interferencias por volatilización de soluto.	Sales formadas de carácter refractario, resisten la descomposición a átomos y entidades más simples si la temperatura no es lo suficientemente alta. No permiten que el analito sea atomizado eficientemente.	-Aumentar la temperatura de la llama.

### I.6. El selenio.

El selenio es un no metal que se encuentra de forma natural en el medio ambiente, las principales fuentes de selenio son las rocas y los suelos del entorno terrestre. El selenio en forma pura, existe como cristales hexagonales gris metálicos a negros, pero en la naturaleza se encuentra mayormente distribuido en forma de seleniuro combinado con elementos pesados como de plata, cobre, plomo y níquel, en menor proporción como elemento libre asociado con azufre elemental e hidrógeno. Éste, presenta varios estados de oxidación, Se(-2) seleniuros, Se(0) selenio elemental, Se(+4) selenitos y Se(+6) selenatos, formando gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos, siendo su química compleja en el medioambiente y en los sistemas vivos como en el ser humano.<sup>41,42,43,44</sup>

Una de las principales razones para considerar el selenio como un elemento esencial es su capacidad para sustituir fácilmente al azufre en biomoléculas, debido a su similitud química. El selenio forma parte de numerosas enzimas, así, en la actualidad se han identificado 25 selenoproteínas en humanos. Se trata de un nutriente esencial que actúa como factor antioxidante, formando parte del sistema glutatión-peroxidasa (selenoproteína), siendo necesario para mantener la integridad de las membranas celulares frente a la acción dañina de los radicales libres. Además de su función antioxidante, también desempeña funciones antiinflamatorias y actúa como catalizador para la producción de hormonas tiroideas e interviene en el metabolismo de los lípidos.<sup>45</sup>

La deficiencia de selenio puede causar la enfermedad de Keshan (una enfermedad del corazón) e infertilidad en los hombres. También podría causar la enfermedad de Kashin-Beck, un tipo de artritis que causa dolor, inflamación y pérdida de movimiento en las articulaciones. Actualmente se han realizados estudios de la deficiencia de selenio en relación a un considerable

número de enfermedades, como, por ejemplo, riesgo de padecer cáncer de colon y recto, próstata, pulmón, vejiga, piel, esófago y estómago para aquellas personas que consumen una menor cantidad de selenio, pero no queda claro si los suplementos de selenio reducen el riesgo de cáncer. Algunos estudios indican que las personas con niveles más bajos de selenio tienen un mayor riesgo de enfermedades cardíacas, mientras que otros estudios no indican esto. Estudios del deterioro cognitivo en adultos mayores debido a bajos niveles de selenio, influencia del selenio en la enfermedad tiroidea, la reproducción, entre otros, para los cuales se necesitan más investigación para entender los efectos del selenio en la salud humana.<sup>45</sup>

El selenio tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. La exposición a altos niveles puede producir efectos adversos sobre la salud. La exposición breve a altas concentraciones de selenio puede producir náusea, vómitos y diarrea. La exposición crónica a altas concentraciones de compuestos de selenio puede producir una enfermedad llamada selenosis. Los signos y síntomas principales de la selenosis son pérdida del cabello, uñas quebradizas y anomalías neurológicas (por ejemplo, adormecimiento y otras sensaciones extrañas en las extremidades).<sup>43</sup>

#### **I.7. Generación de hidruros como técnica para la determinación de selenio en miel.**

El contenido total de selenio en diversas matrices, se puede determinar mediante técnicas analíticas que incluyen métodos espectroscópicos, electroquímicos y radioquímicos, utilizando comúnmente la espectroscopia. Se han obtenido importantes avances en los estudios de especiación del selenio en la última década por medio de espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros y algunas otras técnicas cromatográficas.<sup>46</sup>

Las técnicas de espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros han ganado una amplia aceptación para la determinación de Se, debido a los altos rendimientos químicos de la generación de  $H_2Se$ , reacción muy rápida (se estima que tiene lugar en menos de 10 ms), amplio rango de molaridad de HCl (por ejemplo, 0,2-10 M), consumo relativamente bajo de  $NaBH_4$ . Esta técnica se conoció en el año 1836 para la determinación de As, por el método de la reacción de Marsh y Gutzeit, que usaba un sistema metal/ácido, en la cual se emplea el Zinc como reductor. En 1969 Holak, fue el primero en introducir la muestra en EAA, mediante un sistema de reacción Zn/ácido para generar  $AsH_3$ , mejorando la determinación de arsénico, cuya baja longitud de onda (193.7 nm) dificulta su análisis por EAA, demostrando la gran ventaja de la introducción de hidruros gaseosos a esta técnica, que se hizo popular en la década de los 70,

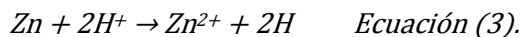
mejorando desde entonces y siendo de gran aplicación hoy en día para determinar metales que generan hidruros. Las ventajas y desventajas de la generación de hidruros se mencionan a continuación.<sup>46,47,48</sup>

**Tabla N° 5.** Ventajas y desventajas de la generación de hidruros en EAA.<sup>7,12,44,46</sup>

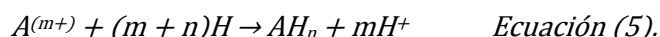
<b>Ventajas.</b>	<b>Desventajas.</b>
Gran aplicación por las mejoras alcanzadas en los límites de detección del analito (orden de ppb o ultra trazas ppt).	Dependencia del estado de oxidación del analito.
Drástica disminución de interferencias asociadas a la formación, transporte y atomización del hidruro.	Necesidad de tratamientos previos para convertir el analito al estado de oxidación adecuado.
Capacidad óptima de aislar y separar químicamente el hidruro formado.	Formación de aerosoles y espumas durante la generación del hidruro.
Brinda una mayor selectividad y precisión con posibilidad de especiar.	Sólo es aplicable a los analitos que forman hidruros volátiles como As, Se, Hg, Sn, Sb, Ge, Bi y Te.
Automatización del proceso analítico con elevada frecuencia de análisis.	

El sistema Zn-ácido para HG fue reemplazado por la reacción ácida con tetrahidroborato de sodio, también conocido como borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), siendo actualmente el reactivo más usado en la generación de hidruros, ya que es superior al método de reducción de metal/ácido, se obtiene con un nivel adecuado de pureza y es estable durante horas, versátil por sus propiedades reductoras y como transferente de hidruros, además la reacción con el analito es muy rápida porque éste es muy reactivo y procede con alta eficiencia. Su introducción al sistema de flujo continuo como el de estudio es sencilla y fácilmente automatizable.<sup>46</sup>

Los primeros autores que propusieron un mecanismo de reacción para HG fueron Robbins y Caruso en 1979, postularon el hidrógeno naciente como la especie activa y un esquema de reacción simple para los sistemas Zn/ácido y THB/ácido:<sup>48,49</sup>



El hidrógeno atómico resultante reacciona con iones acuosos del elemento que forma el hidruro metálico volátil:<sup>49</sup>

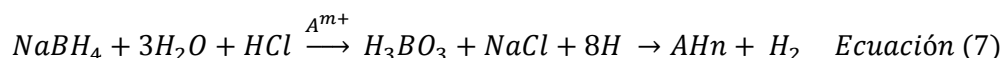


En 1987 Broekaert y Boumans postularon que una aproximación al mecanismo de “hidrógeno naciente” se debía a la descomposición de  $BH_4^-$  a borano e hidrógeno atómico:<sup>48</sup>



Seguida de la reducción del analito al hidruro de acuerdo con la ecuación (5).

La reacción general, que implica el uso de una solución de  $NaBH_4$  y una solución del analito en medio ácido, que en este caso es el HCl, según el mecanismo de hidrógeno naciente es la siguiente:<sup>12,46</sup>

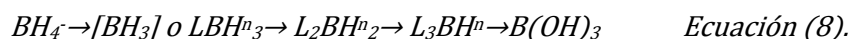


Donde A: elemento de interés,  $m$ : igual o diferente de  $n$  correspondiente a las valencias.

Durante los años siguientes, este esquema de reacción fue adoptada por muchos autores como Bye en 1989, quien estudió la generación de hidruro de selenio en medio alcalino y Dedina en 1999, quien clasificó los mecanismos en dos tipos, uno que involucra el hidrógeno naciente y un segundo donde el hidrógeno no naciente es la especie principal involucrada. Sin embargo, menciona que no hay un soporte convincente de los dos mecanismos reportados.<sup>48,50</sup>

El mecanismo del “hidrógeno naciente” se convirtió en una explicación conveniente para las reacciones de transferencia de hidrógeno en técnicas de GH. Este mecanismo ha sido objeto de críticas, desde un punto de vista termodinámico ambas reacciones, ecuaciones (3) y (4), no pueden generar hidrógeno atómico (naciente), y experimentos marcados con deuterio sobre la hidrólisis de THB claramente indican que el hidrógeno atómico no puede ser el intermediario, dando lugar a la formación de hidrógeno molecular como producto final de hidrólisis de THB.<sup>49</sup>

Estudios realizados recientemente apoyan la hipótesis del hidrogeno no naciente, en el cual la formación del hidruro ocurre por transferencia directa al metal del hidrogeno unido al boro en el THB y por la acción de algunos intermedios de hidroboro formados en la hidrólisis del THB. El mecanismo general de hidrólisis en medio ácido, basados en la formación de intermediarios del tipo  $LmBH^n$  sigue según el siguiente esquema:<sup>12,51</sup>



Donde  $L$  puede ser los grupos donadores  $H_2O$ ,  $OH^-$ ,  $Cl^-$ , etc,  $m$  es el número de grupos y  $n$  la carga del intermediario que puede ser -1, 0 y +1.

La reacción de GH se sigue investigando en un esfuerzo por detallar el mecanismo real de este proceso. No obstante, el mecanismo no es de importancia primaria en la práctica analítica puesto que siempre hay un gran exceso de borohidruro (varios órdenes de magnitud), con respecto de la concentración del analito.<sup>44</sup>

El proceso de determinación de hidruros volátiles comprende tres etapas independientes: La generación y volatilización del hidruro, la transferencia del mismo y su posterior atomización en el espectrofotómetro de absorción atómica.<sup>47</sup> Dicha técnica generalmente se desarrolla mediante reacciones químicas en solución, donde la generación del hidruro volátil se lleva a cabo al añadir a una solución acuosa acidificada de la muestra, un volumen de solución acuosa de agente reductor (exceso), esta reacción es muy violenta y se produce instantáneamente. Posteriormente ocurre la liberación de hidruro de la solución de muestra y su transferencia a la fase gaseosa.<sup>46,53</sup>

El hidruro en su forma gaseosa es apartado en un separador gas-líquido, donde ocurre la descomposición del agente reductor y la liberación de hidrógeno, produciendo un aerosol muy fino que es transportado por una corriente de gas inerte (o flujo de gas de purga) a la celda de atomización (fuente de excitación), que está montada sobre el mechero y calentada con llama aire-acetileno donde se genera la población de átomos libres. Como la celda está en el paso óptico de la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco, se produce una absorción de la luz por parte de los átomos del analito que será proporcional a su concentración.<sup>12,44,54</sup>

Es importante mencionar que para la primera etapa la muestra debe ser una disolución representativa de la muestra original, donde se encuentren los metales en solución y en el estado de oxidación apropiado, para formar el hidruro correspondiente. Esto significa convertir la muestra en una disolución sin pérdidas de analito y sin contaminación. Por tanto, las matrices biológicas u orgánicas deberán ser completamente descompuestas.<sup>46</sup>

### **I.7.1. Métodos de generación de hidruros por transferencia directa.**

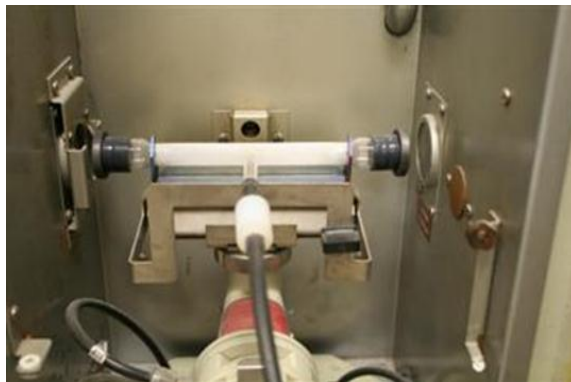
Actualmente se emplean tres métodos de transferencia directa: modo manual "in batch", flujo continuo (CF) e inyección de flujo (FI). El modo manual "in batch" generador discontinuo, es un recipiente de vidrio o plástico, que sirve tanto como reactor como separador de gas y líquido. Se coloca dentro, un lote de solución de muestra acidificada y luego se introduce el agente reductor, usando una bomba o empleando manualmente una jeringa. Este sistema está perdiendo

popularidad a favor de los sistemas de flujo, debido a que las inyecciones del analito, el ácido y el  $\text{NaBH}_4$  se realizan manualmente por lo que las medidas son poco reproducibles en comparación a los métodos CF e FI, el tiempo de análisis es más amplio, el operador debe estar atento en todo momento y se debe limpiar completamente el sistema luego de cada medida, aumentando el tiempo de análisis.<sup>46</sup>

En el modo de FC, un flujo constante de la solución de la muestra se mezcla con un flujo constante de la solución de borohidruro de sodio y del gas de purga. Las fases líquida y gaseosa son luego separadas en un separador de fases y la mezcla de gases resultante es conducida hasta el atomizador. El modo de IF es muy similar al modo de FC con la diferencia de que se usa un flujo constante de ácido portador en lugar del flujo constante de muestra acidificada. Luego a este flujo se inyecta un volumen definido de la muestra que se dispersa en la corriente portadora, por medio de una válvula inyectora que también se utiliza para direccionar los diferentes flujos de soluciones hacía el reactor y el separador gas/líquido.<sup>46</sup>

### I.7.2. Celda de atomización.

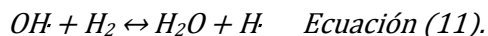
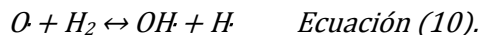
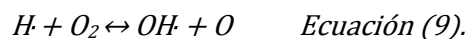
La atomización del hidruro se realiza en una celda en forma de "T" que, calentada por la llama, aumenta el tiempo de residencia de los átomos y evita la dispersión de mismos y el ruido de fondo.<sup>54</sup>



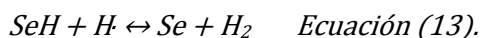
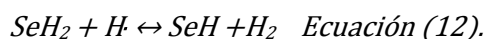
**Figura 4.** Celda de atomización en el espectrómetro de absorción atómica.<sup>55</sup>

Dedina y col, propusieron que la atomización del hidruro del analito en la celda de cuarzo, ocurre por colisiones del hidruro con radicales libres de hidrógeno. El hidrógeno generado por la descomposición del tetrahidroborato, en medio ácido agregado a las mezclas de reacción, es la

fuerza de radicales de hidrógeno ( $H^{\bullet}$ ), el cual se produce en la zona de difusión de la llama de acuerdo a las siguientes ecuaciones:<sup>46</sup>

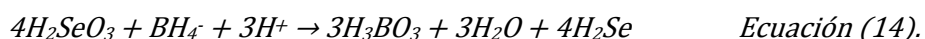


El equilibrio de la ecuación (11), está desplazado a la derecha, puesto que la concentración del  $H_2$  es mayor que la de agua, de modo que la atomización del selenio proveniente del  $SeH_2$ , vía radicales libres, tienen lugar en las reacciones consecutivas:



### **I.7.3. Determinación de Se en miel por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros en flujo continuo.**

La generación de seleniuro de hidrógeno sólo se puede realizar cuantitativamente a partir de Se (IV), para ello se emplea una solución de borohidruro de sodio que genera el hidruro volátil correspondiente y con ácido clorhídrico de baja molaridad por su facilidad de manejo y ausencia de reacciones secundarias. En presencia de ácido clorhídrico la mayoría del tetrahidrobórato es hidrolizado produciendo la liberación de hidrógeno.<sup>54</sup> La reacción, en presencia de selenio en forma de selenito, puede definirse con la siguiente ecuación:<sup>53</sup>



Una vez formado el hidruro gaseoso, éste es separado de la solución y transportado por un gas portador (nitrógeno o argón) hasta una celda de cuarzo (sistema detector), donde es calentado produciéndose la atomización por la técnica de EEA ya mencionada. Como la celda está en el paso óptico de la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco, se produce una absorción de la luz por parte de los átomos del analito que será proporcional a su concentración.

Sin embargo, la generación de Hidruros es una técnica que está afectada por el estado de oxidación de los analitos y las condiciones experimentales, como la acidez de la muestra, la concentración de reductor, la longitud y diámetro de las tuberías, el flujo de los reactivos y los

caudales de los gases de transporte, por lo que es necesaria la optimización de estos parámetros para el analito y un control estricto de las condiciones experimentales.

#### **I.7.4. Diseño Experimental.**

El diseño experimental para la optimización de parámetros, está enmarcado dentro de la quimiometría, donde se aplican métodos matemáticos y estadísticos, así como de los principios de la buena ciencia de la medida, para extraer de forma eficiente información útil de datos químicos, abarcando un gran número de temas (filtrado de señales, optimización, reconocimiento de pautas, entre otros) siendo de gran importancia los dedicados al diseño experimental y a la calibración univariada y multivariada.<sup>56</sup>

La optimización univariada implica encontrar la entrada a una función que da como resultado la salida óptima de una función objetivo. A la hora de buscar los niveles óptimos de los factores (variables) que afecten el método o experimento, la optimización univariada mide la respuesta del experimento para cada nivel del factor mientras los niveles del resto de factores se mantienen constantes, por consiguiente, es necesario realizar varios experimentos para encontrar las condiciones o niveles óptimos deseados, solo genera informaciones puntuales, las interacciones entre factores o tratamientos no son observados y la mejor respuesta global no es observada.

Mientras que la optimización multivariada es una clase especial de diseños de experimentos que mide la respuesta del experimento donde incluye todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores, permitiéndole al experimentador cambiar más de un factor a la vez, encontrar conocimiento de todo el dominio experimental, evaluar interacciones entre factores, localización de las mejores condiciones o niveles óptimos de los factores y el número de experimentos es reducidos. Esta optimización implica un máximo o un mínimo de la respuesta y, no siempre implica alcanzar un máximo global. Por lo tanto, el método multivariado es más objetivo a la hora del diseño y optimización del experimento.

Entre los diseños experimentales se pueden mencionar:

- Bloques aleatorios: cuando el número de experimentos es demasiado grande, no se pueden llevar a cabo sin una subdivisión, en estos casos, los experimentos se deben agrupar en bloques. Un bloque se puede definir como un conjunto de experimentos



escogidos en base a su homogeneidad (entre ellos) pero posiblemente diferentes por término medio de otros bloques. Su objetivo es mantener la variabilidad entre unidades experimentales dentro de un bloque tan pequeño como sea posible y maximizar las diferencias entre bloques. Si no hay diferencia entre los bloques, este diseño no contribuirá a la precisión para detectar las diferencias de tratamientos.<sup>57,58</sup>

- Diseño factorial: es aquel en el que el conjunto de tratamientos consiste en todas las combinaciones posibles de los niveles de varios factores. El factor, es una clase de tratamiento, y en experimentos factoriales, todo factor proporcionara varios tratamientos. En general un experimento factorial permite la separación y la evaluación de los efectos de cada uno de 2 o más factores que afectan solo a una unidad experimental, además permite la detección de los efectos de interacción entre 2 o más factores, es decir, en un experimento factorial se investigan simultáneamente los efectos de cierto número de diferentes factores.<sup>58</sup>
- Superficie de respuesta: es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que le ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta.<sup>59</sup>
- Centrales compuestos: el diseño central compuesto es el experimento de superficie de respuesta que más se utiliza. Este diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Los diseños centrales compuestos son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales. Si el diseño factorial detecta curvatura, se puede usar un experimento diseñado de superficie de respuesta para determinar la configuración óptima para cada factor.<sup>59</sup>
- Bloques ortogonales: con frecuencia, los diseños centrales compuestos se ejecutan en más de un bloque. Los diseños centrales compuestos pueden crear bloques ortogonales, lo que permite estimar los términos del modelo y los efectos de bloque de manera independiente y minimizar la variación en los coeficientes de regresión.<sup>59</sup>

- Rotabilidad: los diseños rotativos ofrecen varianza de predicción constante en todos los puntos que están equidistantes del centro del diseño.<sup>59</sup>
- K-Factorial: un diseño k-factorial es un tipo de experimento diseñado que permite estudiar los efectos que k factores pueden tener en una respuesta. Al realizar un experimento, variar los niveles de todos los factores al mismo tiempo en lugar de uno a la vez, permite conocer las interacciones entre los factores. Los diseños experimentales incluyen todas las combinaciones posibles entre los niveles de los factores. El paradigma de RSM más simple es el diseño k-factorial de dos niveles.<sup>60</sup>
- Diseño Box-Behnken: el diseño de Box-Behnken es una superficie de respuesta esférica y giratoria, que incluye un punto central y puntos medios entre las esquinas, circunscritos sobre una esfera. Este diseño puede ser aplicado para la optimización de varios procesos químicos y físicos, donde el número de experimentos es determinado de acuerdo a los requerimientos del proceso. Se utilizan con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta.<sup>60</sup>

Este diseño permite una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. Como los diseños de Box-Behnken suelen tener menos puntos de diseño, pueden ser menos costosos de realizar que los diseños centrales compuestos con el mismo número de factores. Sin embargo, debido a que estos diseños no tienen un diseño factorial incrustado, no son adecuados para experimentos secuenciales.<sup>60</sup>

Los diseños de Box-Behnken también pueden ser útiles si se conoce la zona de operación segura de su proceso. Los diseños de Box-Behnken no tienen puntos axiales, como en el caso de los diseños centrales compuestos, por lo que puede estar seguro de que todos los puntos del diseño se encuentran dentro de su zona de operación segura.<sup>59</sup>

### **I.7.5. Interferencias en el método de generación de hidruros.**

#### **I.7.5.1. Interferencias por composición química de las soluciones en la fase líquida.**

Estas se dan cuando el analito en la muestra se encuentra en alguna forma química distinta a las soluciones patrones usadas para las curvas de calibración. Esto puede deberse a un inadecuado tratamiento de mineralización de la muestra, quedando uniones Se-C sin romper o bien a que el analito se encuentre en un estado de oxidación a partir del cual su conversión a hidruro se da más lenta o con baja eficiencia.<sup>61</sup>

#### **I.7.5.2. Interferencias de los componentes de la matriz en la fase líquida.**

Partículas sólidas o suspensiones orgánicas afectan la liberación del hidruro debido a la sorción de los iones del analito o la captura del hidruro formado. Los compuestos orgánicos disueltos son interferentes potenciales. Sin embargo, el tipo de interferencia de la matriz frecuentemente viene dado por compuestos inorgánicos solubles (interferencias inorgánicas). Los interferentes inorgánicos más serios son iones de metales de transición, ejemplo: Ni, Cu, Co, Fe, Ag, Au, Pd, Pt, Rh, algunos de ellos muy comunes en matrices como aguas y alimentos, etc.<sup>61</sup>

#### **I.7.5.3. Interferencias en fase gaseosa.**

Están asociadas a una pérdida de eficiencia en el proceso de transporte y/o atomización del hidruro. Son producidas por compuestos volátiles, en general otros hidruros, los que pueden actuar sobre la superficie o en el volumen muerto del generador (cuando se utiliza la generación en "batch"), en las tuberías de transporte causando retraso (interferencia cinética de transporte) y/o pérdida del hidruro (interferencia de la eficiencia de transporte) o directamente en el atomizador, alterando los mecanismos de atomización y/o la velocidad de formación de vapor atómico en el atomizador. Las interferencias de este tipo pueden actuar en forma directa afectando la eficiencia de liberación del hidruro o también generando un efecto memoria que afecta la siguiente determinación y altera la forma de los picos. La magnitud de estas interferencias dependerá del tipo de atomizador utilizado, siendo más pronunciada en las celdas de cuarzo calentadas externamente que en las llamas de difusión u hornos de grafito.<sup>61</sup>

### **I.7.6. Eliminación de interferencias.**

La eliminación de las interferencias depende del tratamiento de las mismas, como dilución de la muestra, retención del hidruro, modificación del medio de reacción, formación de complejos u otros métodos. Al igual que las pérdidas en el transporte de hidruros deben ser minimizadas trabajando sobre el diseño del sistema experimental en forma exhaustiva. Si bien, las interferencias químicas en la fase líquida más importantes para el análisis por generación de hidruros son provocadas por la presencia de materia orgánica, oxidantes fuertes y metales de transición, la forma más directa de prevenir estas interferencias es remover el interferente. La presencia de materia orgánica puede ser prevenida a través de la implementación de tratamientos adecuados de mineralización o digestión de muestras que aseguren su completa destrucción y/o la prerreducción para asegurar el estado de oxidación adecuado del analito. La presencia de oxidantes fuertes se previene agregando peróxido de hidrógeno o la evaporación a sequedad (sólo que así se corre el riesgo de pérdida del analito por volatilización).<sup>46,48,61</sup>

En cuanto a los metales de transición, se han empleado un gran número de estrategias para minimizar o eliminar su influencia: Las manipulaciones de la concentración de HCl o de la tasa de flujo de  $\text{BH}_4^-$  han sido exitosamente utilizadas para evitar el efecto de las interferencias en la generación de hidruro de selenio, esto deberían funcionar con otros analitos. Es el potencial del diseño instrumental para acelerar la separación gas-líquido lo que hace que el modo de flujo de HG sea el método de elección para controlar las interferencias de la matriz en la fase líquida, acortado o quitando la manguera de reacción y/o empleando separador gas-líquido con tiempos mínimos de residencia de la mezcla de reacción en su interior.<sup>46,48,61</sup>

### **I.7.7. Validación de un método.**

De acuerdo a la ISO/IEC 17025, la validación es la confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. En otras palabras, es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos de laboratorio y demostrativos, de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de desempeño del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo.<sup>62,63</sup>

Una vez finalizado el desarrollo inicial del método, el laboratorio debe documentar en detalle el procedimiento de medición. Este procedimiento documentado es el que se toma para la validación formal del método. Durante la fase de desarrollo e implementación del método pueden determinarse algunas características de desempeño. El laboratorio tiene que decidir cuáles son las características de desempeño que deben ser investigadas para validar el método y, en algunos casos, el grado de detalle para una característica particular. El proceso de validación finaliza con una conclusión y declaración del cumplimiento o no del requisito establecido. Si el requisito no se cumple, el método requiere un mayor desarrollo.<sup>64</sup>

#### **I.7.7.1. Blancos**

Su uso permite evaluar cuánta señal de medida es atribuible al analito y a otras causas. Se disponen de varios tipos de blancos.<sup>64</sup>

-*Blancos de reactivos*: Son los reactivos que se utilizan durante el proceso analítico, como disolventes para extracción o disolución.

-*Blancos de muestra*: Son muestras matriz sin presencia de analito. Son necesarios para tener una estimación más real de las interferencias que pueden aparecer en un análisis de muestras de rutina.

#### **I.7.7.2. Muestras de rutina.**

Las muestras de rutina son útiles ya que proporcionan información sobre precisión, interferencias, etc., que pueden aparecer durante el trabajo diario.<sup>64</sup>

#### **I.7.7.3. Soluciones/material fortificado.**

Son soluciones en las que el analito ha sido adicionado en concentraciones conocidas. La adición no tiene que limitarse al analito de interés. Se puede fortificar la muestra con cantidades variables de un interferente particular para evaluar la concentración del interferente a la cual la determinación del analito se ve afectada negativamente.<sup>64</sup>

#### **I.7.7.4. Patrones de medida.**

Puede ser todo aquello en lo cual ha sido caracterizado un parámetro o propiedad particular y que puede emplearse como referencia metrológica. Hay que distinguir entre material de referencia (MR) y material de referencia certificado (MRC) ya que su uso en el proceso de validación es diferente. Los MR pueden ser cualquier material empleado como valor de referencia, ya sean reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros dispositivos. La propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC.<sup>64</sup>

#### **I.7.7.5. Estadística.**

Las técnicas estadísticas son esenciales para agrupar los datos obtenidos y realizar un análisis objetivo de las diferencias entre conjuntos de datos (pruebas de significación). Los analistas deben familiarizarse con los elementos básicos de la teoría estadística como ayuda para la evaluación de la precisión, sesgo, rango lineal, LOD, LOQ e incertidumbre de medida.<sup>64</sup>

#### **I.7.6. Características analíticas para la validación de un método.**

##### **I.7.6.1. Selectividad.**

La selectividad analítica es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.<sup>38</sup>

##### **I.7.6.2. Precisión.**

Es el grado de proximidad de los valores obtenidos entre mediciones de un mismo mensurando bajo condiciones específicas. Al realizar una medida se deben obtener replicados, a partir de los cuales se puede observar el grado de concordancia que estos resultados tienen entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados. Los materiales deben ser representativos de las muestras de ensayo en términos de la matriz y la concentración de analito, la homogeneidad y la estabilidad, pero no necesitan ser

MRC. Las réplicas también deben ser independientes, esto es, todo el proceso de medición, incluyendo los pasos de preparación de muestras, debe repetirse. La precisión se puede evaluar mediante la “Repetibilidad de medición” y “reproducibilidad de medición”.<sup>54,64</sup>

#### **I.7.6.3. Repetibilidad.**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, entre otros), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas. Uno de los factores que puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito.<sup>65</sup>

#### **I.7.6.4. Reproducibilidad.**

Es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios utilizando el mismo método. Evaluando la concordancia entre resultados independientes obtenidos mediante la variación del método de análisis, del instrumento, del laboratorio o incluso del experimentador.<sup>64</sup>

#### **I.7.6.5. Exactitud.**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como el valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado. No debe confundirse la exactitud y precisión, la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que esta del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas, pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.<sup>65</sup>

El valor verdadero en muchos casos se desconoce. Sin embargo, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón. También se acepta la comparación de resultados con un método de referencia

validado del que ya se ha demostrado su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.<sup>65</sup>

En el desarrollo del diseño experimental y estadístico es necesario determinar las características analíticas del método para la validación que se haya escogido, estas no se obtienen de forma secuencial, sino que vienen dadas, como resultado final de un diseño experimental adecuado. En la tabla siguiente se exponen de forma general, las características analíticas a considerarse en una validación de métodos.<sup>54,64]</sup>

**Tabla N° 6.** Características analíticas para la validación de métodos.

<b>Parámetros</b>	<b>Objetivo Establecido</b>
Selectividad / Especificidad	Definido por bibliografía normativa Nacional o internacional.
Linealidad/Función respuesta	Elaborar curva de calibración, y regresión lineal del grado de ajuste con un $R^2 \geq 0.995$ .
Límite de detección	Determinado por la concentración más baja del Límite de cuantificación o 3S del blanco.
Límite de cuantificación	Determinado por la concentración más baja determinada experimentalmente o 10S del blanco.
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	El porcentaje de la desviación estándar en todos los niveles de concentración deberá ser < 10%. %CV o %RDS en todos los niveles en estudio. F calculado $\leq$ F Tabulado t student calculado $\leq$ t student Tabulado (veracidad)
Exactitud	Recuperación de selenio de al menos del 80 al 115% en todos los niveles.
Incertidumbre	La incertidumbre en todo el rango deberá ser $U < 30\%$ en todos los niveles con intervalo de confianza de al menos el 95%.
Intervalo de trabajo	Definido por el tratamiento estadístico, y por los niveles de las muestras y estándares utilizados.

### **1.8. Propiedades fisicoquímicas de la miel.**

Los contenidos de humedad y azúcares como fructosa y glucosa en la miel influyen en propiedades físicas como la viscosidad, peso específico, cristalización, granulosidad, higroscopicidad, estabilidad, características sensoriales, y conservación, también en otros parámetros: color y sabor. La miel es un alimento estable microbiológicamente gracias a la alta concentración de azúcares, su pH ligeramente ácido y su bajo contenido en agua. Sin embargo,



si las condiciones de almacenamiento, el grado de madurez del panal cosechado y el manejo son inadecuados se deteriora. Las mieles con baja humedad son muy difíciles de manejar y procesar, por el contrario, las mieles con humedad alta (>18%) son propensas a fermentación. Ésta puede variar en condiciones normales del 14-22%, siendo la óptima alrededor de 17%. Su contenido está relacionado con el origen botánico y geográfico del néctar, el clima, la humedad, el origen floral y regional, las prácticas de cosecha y recolección de la miel. La miel es higroscópica, absorbe la humedad del ambiente en envases abiertos, provocando que esta fermente si su contenido de agua supera el 25%. Por esto, los apicultores recolectan la miel que ya ha sido operculada (cerrada con cera) considerada como miel madura. Esta tiene un nivel de humedad mucho menor y es menos proclive a fermentar. La miel está mejor conservada por encima de los 10° grados.<sup>3,14,16</sup>

El pH de la miel es un factor de suma importancia a tomar en cuenta durante el almacenamiento de la miel por su influencia directa en la capacidad antibacteriana, actividad enzimática y propiedades físicas como el color, textura e incluso olor de la miel. Está determinado por la presencia de ácidos orgánicos como: el ácido málico, maleico, fumarico, fórmico, succínico, cítrico, oxálico y butírico, pero principalmente por el ácido glucónico. La miel es ácida, el pH de la miel de flores está comprendido entre 3,5 y 4,5 a diferencia de la miel de mielada cuyo valor puede estar comprendido entre 4,5 y 5,5. Estos valores no deben tomarse estrictamente, se han encontrado datos de pH menores, hasta 2,7 para mieles florales y 4,0 para mieles de mielada.<sup>6,66</sup>

Los electrolitos, sales minerales, ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros, hacen a la miel una solución con capacidad de transportar electricidad, a mayor conductividad eléctrica, mayor cantidad de sales. La conductividad eléctrica es un dato útil para diferenciar mieles de distintos orígenes, la miel de mielada y la de castaño (más rica en sales) generalmente presentan una conductividad eléctrica mayor de 1mS/cm mientras que en las mieles florales los valores oscilan entre 0,1 y 0,7 mS/cm. Para mieles florales, se han reportado datos comprendidos entre 181 y 1127  $\mu$ S/cm y para miel de mielada valores comprendidos entre 1220 y 1624  $\mu$ S/cm, además éste parámetro es útil para establecer el origen geográfico de los distintos tipos de mieles.<sup>66</sup>

En la naturaleza, el color de la miel se debe, pura y exclusivamente, a materias colorantes del néctar de la fuente floral de donde ha sido libado por la abeja. Estas materias colorantes son pigmentos de las plantas, de la misma naturaleza que los de las flores y de otras partes coloreadas del vegetal (carotenoides, clorofila, xantofila), de acuerdo a la cantidad que posea las

hace más oscuras o claras. Sin embargo, el calor y la cristalización pueden afectar también el color que tendrá la miel haciendo que parezca más oscura o clara.<sup>3</sup>

### I.8.1. Parámetros de calidad de la miel.

Debido a la gran variedad de propiedades terapéuticas, la miel se considera antibiótico natural y por los tantos beneficios que proporciona gracias a la gran cantidad de compuestos químicos, al igual que ser fuente de energía natural para el ser humano, debe estar presente en la dieta cotidiana, siempre y cuando cumpla con los estándares de calidad para la misma. Son muchas las organizaciones, normativas y autores que proponen que los parámetros de calidad de la miel están dados por: índice de refracción, humedad, acidez, pH, índice de diastasa, contenido de HMF (hidroximetilfurfural), cenizas, conductividad eléctrica, azúcares, el análisis de metales y residuos de antibióticos, entre otros. Además, se debe añadir el análisis sensorial u organoléptico que consiste en traducir cualitativa, cuantitativa y objetivamente las sensaciones que el catador percibe al observar, oler y degustar la miel.

**Tabla N° 7.** Resumen de algunos de los parámetros más importantes para evaluar la calidad de la miel.

<b>Parámetros de calidad de la miel.</b>	<b>Intervalo de referencia</b>
<b>Índice de refracción.<sup>1</sup></b>	1.504 a 1.4815 nD.
<b>Densidad.<sup>6</sup></b>	1.38 a 1,44 kg/l (20 °C )
<b>Humedad.<sup>1</sup></b>	14-22%, > 25% fermenta.
<b>Acidez y pH.<sup>66</sup></b>	3.5-4.5 miel de flores, 4,5-5.5 miel de mielada.
<b>Grados Brix.<sup>68</sup></b>	70-88 grados Brix.
<b>Índice de diastasa.<sup>69</sup></b>	Actividad mínima:8 DN (escala Schade).
<b>Contenido de HMF (hidroximetilfurfural).<sup>67</sup></b>	No superior a 40mg/kg.
<b>Cenizas (contenido de mineral)<sup>14</sup></b>	0,1-0,6% para mieles de origen floral y mayores a 1% para mieles de mielada.
<b>conductividad eléctrica.<sup>66</sup></b>	Mieles florales $\leq 0,8\text{mS/cm}$ (800 $\mu\text{S/cm}$ ) y mayor de 0,8mS/cm (800 $\mu\text{S/cm}$ ) para miel de mielada.
<b>Azúcares.<sup>1</sup></b>	Fructosa con 42.3% - 32.9%, glucosa con un 37% - 23.2%, sacarosa 2.3%, maltosa 2.9% y melecitosa 0.21% - 0.10%.

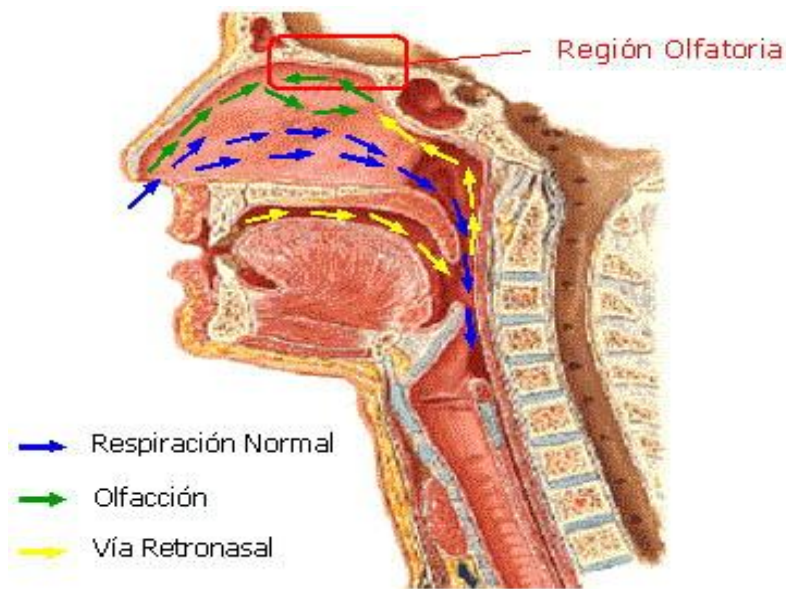
## **I.9. Análisis sensorial u organoléptico.**

El análisis sensorial u organoléptico, es el examen de un producto a través de la evaluación de los atributos perceptible por los cinco órganos de los sentidos (atributos organolépticos), tales como color, olor, gusto, tacto, textura y ruido. Es simple y de bajo costo, pero requiere reproductibilidad para ser considerada un método analítico, se trata de una tarea compleja, dado que en la percepción sensorial intervienen numerosos factores, las personas tienen diferentes niveles de sensibilidad y también diferentes experiencias previas, por tanto, un olor podría asociarse a la memoria olfativa del catador e influir sobre su percepción. La importancia del análisis sensorial en miel, radica en la determinación del origen botánico y el cumplimiento de las exigencias que el consumidor tiene acerca de este producto (calidad), que depende netamente de la región donde se producen (clima y vegetación), así como del manejo (cosecha, desoperculado, extracción, filtrado, etc.) y el almacenamiento durante la producción de la miel por parte de los apicultores, quienes además deben tener en cuenta el manejo sanitario y nutricional, la renovación de las reinas y el recambio periódico de la cera de los panales para maximizar los rendimientos de la producción.<sup>3,70,71</sup>

En la boca se localizan los receptores del gusto. Los cinco gustos básicos son dulce, amargo, ácido, salado y umami. También se perciben en la boca sensaciones como el picor, la astringencia y las sensaciones táctiles y térmicas. El sabor es considerado una percepción global integrada por excitaciones de los sentidos del gusto y del olfato, acompaña de otros estímulos. El sabor de la miel resulta de la combinación de muchas "notas" producidas por los azúcares, los ácidos orgánicos y otros compuestos presentes en pequeñas cantidades, por ejemplo, la presencia de ácido glucónico con gluconolactona le da un tono ácido. Los polialcoholes, aminoácidos, en cambio, le da un tono más específico a amargas o compuestos no volátiles, y compuestos que originan el dulzor. Los estímulos sonoros y de temperatura son relevantes en la evaluación sensorial de algunos alimentos, pero no de la miel. sensaciones táctiles brindan información sobre la textura de la miel, en las mieles cristalizadas, está dada por el tamaño y homogeneidad de los cristales.<sup>3,71</sup>

Los compuestos volátiles específicos pueden ser considerados "huellas dactilares" del aroma, debido a que proporcionan información sobre el origen botánico de la miel. Los compuestos aromáticos se perciben de dos maneras, en primer lugar, por vía nasal, pero una vez que la miel está en la boca, se volatilizan y llegan a los receptores olfativos por vía retronasal a través de la

comunicación de las fosas nasales con el paladar. Debido a la volatilidad de estos compuestos, la miel se debe conservar a temperaturas bajas.<sup>71</sup>



**Figura 5.** Flujo de compuestos aromáticos hacia la región olfativa por la vía nasal y retronasal.<sup>72</sup>

Las mieles pueden presentar defectos que pueden incluso descalificarlas, por ello, deben ser considerados al iniciar la evaluación sensorial. Algunos se observan visualmente, como la presencia de espuma, fermentación, impurezas, malos olores, sabores y heterogeneidad de fases. Los aromas y sabores originales pueden alterarse en la etapa de producción a campo, en la sala de extracción o en el manejo posterior. Por ejemplo, el olor a humo puede enmascarar los aromas propios de una miel, mientras que el envejecimiento y el calentamiento provocan la pérdida de sustancias aromáticas o la fermentación que modifica los aromas y gustos de la miel.<sup>70,71</sup>

### **I.9.1. Método de la rueda de la miel de aromas y sabores.**

Para el análisis sensorial de los alimentos, se han desarrollado diversos métodos, empleando escalas sensoriales y ruedas de familias de aromas y sabores como la que se presenta en la figura 2, creada por la comisión internacional de miel (IHC, 2001a), que ha permitido caracterizar las diferentes mieles europeas, con la definición de terminología estandarizada (términos convencionales) la cual consta de 7 familias: Floral-frutal, fresco, madera, vegetal, químico, estropeado y cálido. El método de la rueda de la miel de aromas y sabores es un análisis sensorial

descriptivo, que permite identificar los muchos aromas de la miel, de una manera más precisa, sistemática y agradable. Este método consiste en que los participantes (catadores) previamente entrenados, realicen un examen visual de la miel (color, cristalización o no de la miel, defectos y limpieza), junto con una valoración olfativa por vía nasal (descripción de olores, presencia de defectos, intensidad), continuando con la evaluación olfato-gustativa (sabor o gusto, descripción aroma por vía olfativa indirecta o retronasal, retrogusto y ausencia de defectos), sin embargo, la experiencia ha demostrado que este dispositivo también puede tener un impacto positivo sobre comunicación y percepción del producto, en que los términos definidos a efectos técnicos son adoptados gradualmente por los consumidores.<sup>70,71,73</sup>.

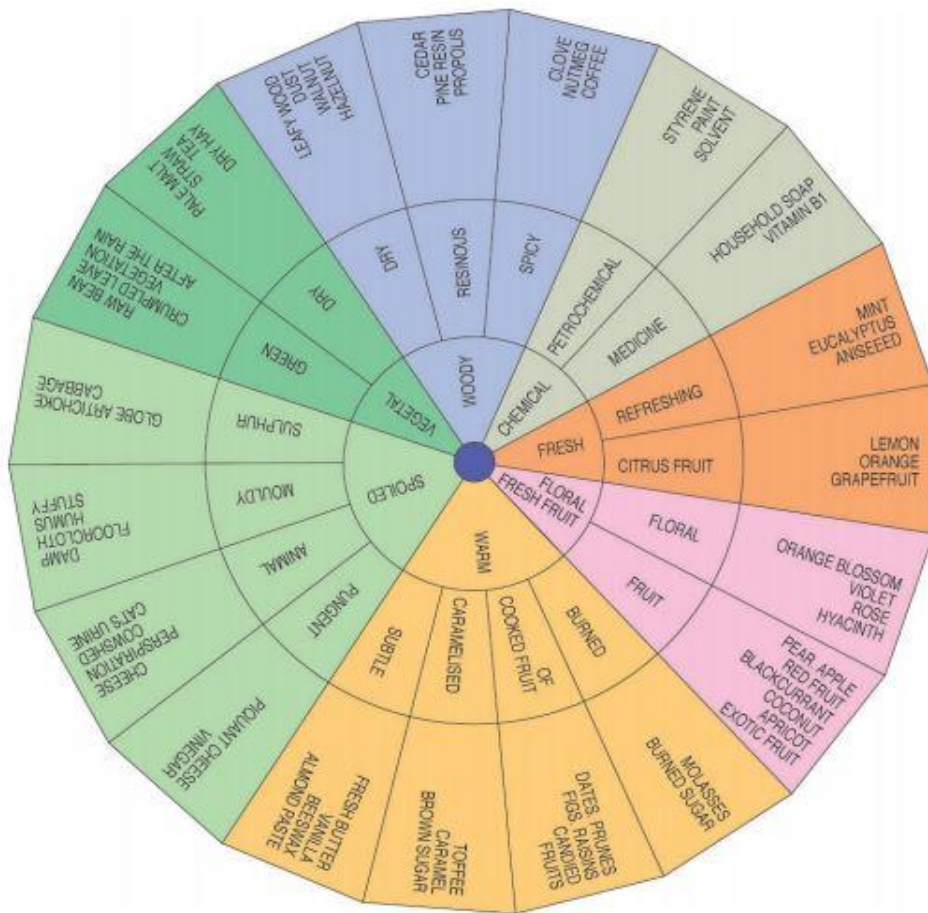


Figure 2. Odour and aroma wheel (IHC, 2001a).

Figura 6. Rueda de y aromas de la miel (IHC, 2001a).<sup>67</sup>

## CAPÍTULO II.

### II.1. Antecedentes para la investigación.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos de investigación y publicaciones a nivel mundial, respecto a la calidad de la miel y sus sub productos como el polen y propóleos, beneficios en la dieta del ser humano, entre otros, lo cual permite tener normas y parámetro de calidad que deben de cumplir las mieles para considerarse adecuadas para el consumo humano, además de utilizarse en algunos estudios relacionados a la medicina moderna, así como bioindicador ambiental de la contaminación local, debido a la facilidad de transporte, manejo de la colmena y bajo costo.

En el año 2008, Vit, P., realizó el trabajo titulado “*Valoración de la miel de abejas sin aguijón (Meliponini)*”.<sup>73</sup> Donde se realiza una recopilación de los parámetros fisicoquímicos, melisopolinológicos y una aproximación a la evaluación sensorial realizada por un grupo de investigadores de las mieles de abeja sin aguijón. La degustación de las mieles de abejas sin aguijón se inició con el sistema utilizado para las mieles de abeja de *A. mellifera*, basado en siete familias, las cuales fueron modificadas a ocho familias sensoriales: 1. Floral-frutal. 2. Vegetal. 3. Fermentado. 4. Madera. 5. Colmena. 6. Meloso. 7. Primitivo. 8. Uimicos industriales. Se presentan diferencias entre mieles producidas por *Melipona spp.* y por otras especies, junto con la valorización de miel de *Melipona Favosa*.

El Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR), Universidad Experimental Sur del Lago, en conjunto con el Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, año 2011, Gutiérrez L.; Prada M.; Rodríguez P.; Contreras K.; Bonive F. & Carrero P., realizaron el trabajo e investigación titulado “*Determinación Espectrofotométrica de plomo, cadmio, níquel, cobre, zinc en mieles en el Municipio Antonio Pinto Salinas, del Estado Mérida Venezuela*”.<sup>74</sup> En este trabajo se evaluó por espectroscopia de absorción atómica (AAS) la concentración de Pb, Cd, Ni, Cu y Zn, en miel de abeja, producida en el Municipio Antonio Pinto Salinas del Estado Mérida. Se encontró una concentración promedio de Pb entre (0,19 - 1,25) mg/Kg Cd (0,039 - 0,234) mg/Kg Ni (0,019-0,189) mg/Kg, Cu (0,98-2,89) mg/Kg y Zn (0,69-1,69) mg/Kg. Los métodos empleados para el análisis de estos metales fueron validados mediante estudios de recuperación, obteniéndose un valor de 98-101 ± 4,8 %, con una desviación estándar relativa (RSD%) menor a un 5 %.

La Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Venezuela, en conjunto con la Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina. Año 2011. Mohtar L.; Noreyma Hernández N.; Maidana J.; Leal I. & Yegres F. Realizaron el trabajo de investigación titulado “*Evaluación de la calidad de las mieles expendidas en Coro, Estado Falcón, Venezuela*”.<sup>75</sup> Determinaron la calidad fisicoquímica y microbiológica y verificaron posibles adulteraciones o envejecimiento de las mieles en esta localidad.

No se encontraron trabajos más recientes, ni referencias de trabajos de investigación realizados en Venezuela, referente a la determinación de selenio en miel con la técnica de espectroscopia de absorción atómica acoplado a generación de hidruros. Sin embargo, en el 2014 Gutiérrez Peña, L. V., et al. Realizó la investigación "Desarrollo de un método analítico para la determinación de selenio en huevos fortificados de gallinas (Isa Brown) por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros." *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 45.2 (2014): 30-49.<sup>76</sup> Evaluaron la incorporación del Selenio con el objeto de obtener huevos fortificados con selenio. Estos fueron evaluados empleando la técnica HGAAS. digestión de la muestra: se empleó una mezcla de HNO<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Intervalo lineal: 6,0 a 200,0 µg/L, L.D.: 0,11 µg/L. Precisión: 0,82%. Recuperación de 97-104,4 % y una frecuencia de análisis de 24 muestras/hora.

La Revista Costarricense de Salud Pública 20.1 (2011): 31-35. Publicó el trabajo de investigación "*Validación de la metodología analítica para cuantificación de Selenio en alimentos de la canasta básica del costarricense.*" Realizado por Silva Trejos, P.<sup>77</sup> Objetivo: Validar la metodología analítica para la determinación de selenio en alimentos de la canasta básica costarricense por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros. La cuantificación se realizó sobre las muestras digeridas en horno de microondas por HGAAS, utilizando como reductor borohidruro de sodio al 0,6 % en hidróxido de sodio al 0,5 % y ácido clorhídrico 10 mol/L. Acidificaron de muestra y patrón: HCL pH 1, calentamiento: 70-90 °C por 15 minutos para garantizar el estado de oxidación +4. Intervalo lineal: 1,3-50 µg/L, L.D.: 1,3 ± 0,2 µg/L y L.C.: 2,2 ± 0,2 µg/L.

En México, 2019. Quintero Lira, A., et al. Realizaron la "*Determinación de compuestos bioactivos y contenido de selenio en diversas mieles del estado de hidalgo.*"<sup>78</sup> Realizaron estudios en diversas mieles recolectadas en el estado de Hidalgo, Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides, así como actividad antioxidante por medio de los radicales ABTS y DPPH. Por otra

parte, Determinaron el contenido de selenio por medio de espectroscopia de absorción atómica acoplada a generador de hidruros (HG AAS), con una digestión ácida previa. Donde, el valor más alto para el contenido de selenio, se presenta en la miel de San Felipe con  $(172.75 \pm 3.18) \mu\text{g/Kg}$  de miel y contenido más bajo se presenta en la miel de Huejutla  $(145.85 \pm 0.35) \mu\text{g/Kg}$  de miel.

En Formosa, Argentina, año 2021, Mabel Cabrera, M. Licenciada en Botánica, presentó su tesis doctoral, titulada "*Identidad de las mieles de la región nordeste del Distrito Oriental del Parque Chaqueño*".<sup>79</sup> Objetivo general: Tipificar las mieles del nordeste del Distrito Chaqueño Oriental, desde el punto de vista botánico, fisicoquímico y sensorial como contribución a los sectores productivo, comercial y turístico para valorizar las mieles de la región. Las metodologías aquí desarrolladas, sirvieron de referencia para el análisis sensorial de las muestras de miel analizadas.

www.bdigital.ula.ve



## II.2. Planteamiento del problema.

En Venezuela se han realizado varios trabajos respecto a la Miel, liderados casi siempre por Vit, P. Sin embargo, no hay información reciente respecto a determinación de metales en mieles en el estado Mérida, propiedades fisicoquímicas como el pH, conductividad, etc., o caracterización por análisis organoléptico. Teniendo presente que, la miel es un producto de procedencia natural que no debe de tener alteraciones por tratamientos químicos o adulteración en el proceso de obtención y que la concentración de los metales puede ser variante de acuerdo a las condiciones ambientales de donde se produzcan, se hace necesario la implementación de metodologías analíticas para realizar estudios recientes, apoyados en trabajos de investigación actualizados, que permitan el desenlace de ésta investigación con los equipos y recursos disponibles en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, enfocados a los parámetros de calidad de la mieles del Estado Mérida, proveniente de las abejas apis mellífera, que incluya el análisis de los metales cobre, hierro, zinc y el no metal selenio. A modo de complementar este estudio, en conjunto con el Laboratorio de Investigación de Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA), de la universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, realizar el análisis de las propiedades fisicoquímicas y el análisis sensorial u organoléptico, para así tener un control de calidad de las mieles en esta localidad.

### **II.3. Justificación.**

El presente trabajo especial de grado está orientado a la optimización y desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación de los metales cobre, hierro, zinc y el no metal selenio, todos ellos aportan beneficiosos para el ser humano, si se consumen en el intervalo establecido. Así mismo, se plantea desarrollar el análisis sensorial u organoléptico a las muestras obtenidas para los análisis anteriores con el fin de complementar los estudios de control de calidad de éstas mieles en el estado Mérida. Estas metodologías contemplan un equilibrio entre los aspectos fisicoquímicos de la problemática a abordar y el desarrollo instrumental necesario, permitiendo no solo resultados exactos, precisos y rápidos, sino que también resultan fácilmente implementables en trabajos de rutina en el laboratorio.

### **II.4. Hipótesis.**

La miel, es de considerable valor energético y calidad nutricional, que debe de cumplir ciertas características fisicoquímicas y organolépticas para ser considerada adecuada para el consumo, no debe contener elementos tóxicos para el organismo humano, ni exceder los límites establecidos de los elementos beneficiosos. Es posible conocer la composición química de la miel utilizando metodologías analíticas para tener un control de calidad de acuerdo a la zona geográfica del Estado Mérida y asegurar un producto de calidad.

## **II.5. Objetivo general.**

Determinar metales en muestras de mieles recolectadas en casas apícolas y de producción artesanal en el Estado Mérida, mediante espectroscopia de absorción atómica en llama y parámetros de calidad.

## **II.6. Objetivos específicos.**

- Realizar el muestreo de las mieles en las casas apícolas y de producción artesanal en el estado Mérida.

-Implementar un diseño experimental para la optimización de la digestión de las muestras y los parámetros para la determinación de selenio en miel por espectroscopia de absorción atómica en llama con generación de hidruros.

- Determinar selenio como elemento traza en miel empleando la técnica de espectroscopia de absorción atómica en llama con generación de hidruros.

-Aplicar una metodología desarrollada en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular para la determinación de Cu, Fe y Zn en las muestras de miel por espectroscopia de absorción atómica en llama.

-Realizar un estudio fisicoquímico y organoléptico a cada una de las muestras recolectadas, en el Laboratorio de Investigación de Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA), de la universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

- Interpretar y discutir los resultados analíticos haciendo uso de la estadística.

## CAPITULO III

### III. Metodologías experimentales y resultados.

La presente investigación comprende cuatro fases: (1) muestreo de las mieles en casa apícolas y de producción artesanal en el Estado Mérida y conservación de las mismas, (2) determinación de los metales por espectroscopia de absorción atómica en llama y con generación de hidruros, (2) análisis fisicoquímico y organoléptico de las muestras y finalmente (4) el procesamiento estadístico de la información, su análisis, discusión de los resultados y presentación de los mismos.

#### III.1. Muestreo.

El muestreo a emplear para la recolección de las muestras es del tipo aleatorio simple, donde se extrajeron todos los individuos al azar de una lista (marco de la encuesta),<sup>80</sup> (anexo 1), esta permitió la recolección de muestras de miel de abejas provenientes del Estado Mérida, Venezuela. Además, se logró obtener la información que se presenta a continuación:

La vegetación cerca de los apiarios comprende árboles como Bucare (*Eritrina poeppigiana*) y (*Eritrina glauca*), Roble (*Platyniscium jambos* L.) Gallito (*Spathodea campanulata*), Dividive (*Caesalpina spinosa*), Ceiba (*Ceiba pentandra* L.), Higuerón (*Ficus urbaniana* Warb.), Laurel (*Ficus máxima* P. Miller), Lechero Rojo (*Euphorbia cotinifolia* L.), Cedros (*Cederela odorata* L.), Caucho (*Ficus elastica*), Mucuteno (*Cassia spectabilis* D.C.), Acacia (*Delonix regia* Bojer.), Cují (*Calliandra stipulacea* Benth), Samán (*Pithecellobium saman* Jacq.), Majagua (*Hibiscus tiliacens* L.), Caobo (*Swietenia macrophylla* G. King), Cayena (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), Cepillo (*Callistemon speciosus* D.C.), diversas especies de Eucaliptos, como el Eucalipto Grande (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) de hojas largas en forma de lanza y el Eucalipto Azul (*Eucalyptus globulus* Labil); Guayabo (*Psidium guajava* L.), Pomarroza (*Syzigium jambos* L.), Cínaro (*Psidium caudatum* Mc Vugh), Anime (*Montanoa quadrangularis*), Yagrumo (*Cecropia peltata* L.), Fresno (*Fraxinus chinensis* Roxb.), Sauce (*Salix humboldtiana*), Araguaney (*Tabebuia chrysantha* Jacq.), entre otros.<sup>81</sup> Además de arbustos, flores silvestres como Garbancillo (*Duranta*) y frutos de montaña como moras silvestres, etc.

Cerca de los apiarios se encontraban cultivos de áster morado y blanco, hortalizas chinas, maíz, lechuga, calabacín, pimentón, café, caraotas, apio, papas, zanahorias, a una distancia de entre 20 a 50mts los más cercanos y 1000 metros la mayoría.

Los apicultores empleaban cajones de tipo Tradicional, Langstroth y Movilista Layens, usando mayormente el cajón Langstroth, al igual que la instrumentación adecuada para manipulación de las colmenas, a excepción de dos apicultores que castran las abejas haciéndolo de manera tradicional, ellos no cuentan con instrumentación adecuada, haciéndolo con técnicas rudimentarias que han sido heredada de generación en generación. Algunos de los apicultores se han capacitado para realizar esta práctica, pero la mayoría lo hacen desde las enseñanzas que les dejaron sus antepasados.

Los apiarios cuentan con uno a tres cajones como mínimo, la mayoría entre 15 a 16 cajones albergando entre 15000 a 30000 abejas, y un máximo de 80 cajones productivos, albergando alrededor de 120000 abejas, cada cajón aloja 1 colmena, contando con las especies Apis Melifica (italiana), Apis Melífera Africanizadas y Apis Melífera (carneola e ibéricas). Al año ocurren dos procesos de floración, diciembre y entre mayo a junio, por cada uno se recoge cosecha. La producción anual se encuentra entre los 5 Kg a 300 Kg, esto depende de la cantidad de enjambres, estabilidad del panal, proceso de floración, alimentación y el clima.

Teniendo esta información se procedió a la recolección de las muestras, con un número de unidades variable según la zona y la disponibilidad de los apicultores que estuvieron dispuestos a colaborar, recolectando 12 muestras en total en el Estado Mérida, de las cuales 5 muestras (muestra 1, muestras 2, muestra 3, muestra 4 y muestra 5), se recolectaron en casas apícolas del centro de la ciudad de Mérida, Municipio Libertador; 5 muestras (muestra 6, muestras 7, muestra 8, muestra 9 y muestra 10), se recolectaron en apiarios ubicados en las localidades de Bailadores, La Playa y sector El Potrero, Municipio Rivas Dávila. Las muestras 11 y 12 de producción artesanal se recolectaron en el Molino, Municipio Arzobispo Chacón. Cada una con 500 g de miel, en envases de vidrio (botellas) color ámbar, cerrados herméticamente con una tapa de plástico correspondiente a cada botella de modo que las muestras no absorban humedad, una vez recolectadas se almacenaron en un lugar limpio y seco, a temperatura ambiente y sin exposición a la luz, dentro de las instalaciones del Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida- Venezuela donde además se realizaron los análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica.

## **III.2. Determinación de Se en miel por espectroscopia de absorción atómica en llama con generación de hidruros (HGAAS) en flujo continuo.**

### **III.2.1. Reactivos.**

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y de alta pureza disponible. Se utilizó ácido nítrico Riedel-de Haen, con un 65 % de pureza; peróxido de hidrógeno Sigma – Aldrich, (34,5 - 36,5) %; ácido clorhídrico de Riedel-de Haen con un 37 % de pureza; hidróxido de sodio de Riedel-de Haen y borohidruro de sodio de Sigma - Aldrich, con un 98 % de pureza. El agua empleada para la preparación de soluciones y lavado de material de laboratorio, fue doblemente destilada y desionizada con resistividad específica de 18 MΩ/cm, obtenida en un sistema Millipore Milli-Q plus. Se preparó una solución estándar de 1000 mg/L de Se a partir de selenio metálico siguiendo el procedimiento descrito en el PerKin Elmer.<sup>82</sup>

### **III.2.2. Soluciones.**

Se prepararon las siguientes soluciones patrón:

- Solución estándar de 1000 mg/L (ppm) de Se, preparada a partir de selenio metálico, para lo cual se disolvió 1,000 g de Selenio metal, en un volumen mínimo de HNO<sub>3</sub> concentrado. Se evaporó a sequedad, se agregó 2 mL de agua y evaporó a sequedad, 3 veces adicionales. Luego se disolvió en HCl al 10 % (v/v) y se diluyó en un litro de solución con HCl.
- Se preparó una dilución de 5000 µg/L (ppb) de la solución patrón de 1000 mg/L (ppm) de Se. A partir de esta, se prepararon las soluciones de trabajo de 5, 50, 100, 150 y 200 µg/L, adicionando 10 mL de HCl al 10 %, enrazando con agua.
- Solución de 1000 mL de HCl 1 M, 2 M y 3 M, preparada a partir de HCl concentrado.
- Solución de 1000 mL de NaBH<sub>4</sub> / NaOH (0,5 %/0,25 %) m/v, (0,75 %/0,5 %) m/v, y (1 %/0,75 %) m/v. Las soluciones de borohidruro de sodio fueron preparadas diariamente. Para evitar la descomposición del reactivo, las soluciones fueron estabilizadas preparándolas en un medio de NaOH % m/v.

### **III.2.3. Digestión de la muestra.**

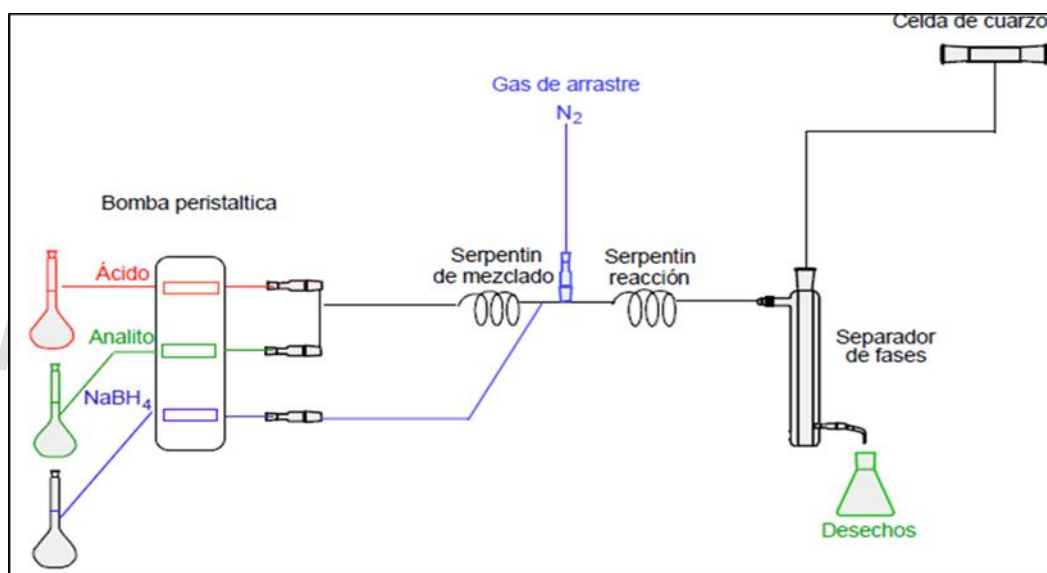
La digestión húmeda es un método de pretratamiento de muestras ambientales ampliamente descrito. En el caso de matrices orgánicas como la miel, se usa ácidos concentrados oxidantes para destruir la matriz orgánica entera y solubilizar la muestra. Comúnmente es usado el ácido nítrico concentrado, debido a que no hay posibilidad de formar sales insolubles como puede suceder con el HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Seguido por calentamiento de la muestra en sistemas cerrados. El peróxido de hidrógeno se añade para incrementar el poder oxidante de la solución digestora, con esta mezcla se logra destruir las sustancias orgánicas y liberar los metales de la compleja matriz de la miel, dejándolos en solución, lo cual es requisito para la adecuada cuantificación por absorción atómica.<sup>83,84</sup>

Para la digestión de las muestras de miel por vía húmeda con plancha de calentamiento, se empleó ácido concentrado con adición de agente oxidante (HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las muestras se pesaron por triplicado y se colocaron en erlenmeyers, el agente digestor se añade, luego el recipiente se cubre con un vidrio de reloj y se colocada en la base caliente (plancha de calentamiento, anexo 2) aplicando temperatura suavemente para prevenir las salpicaduras y la evaporación de los analitos. Una vez que termina el calentamiento para la digestión, se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade el agente oxidante, para luego de 24 horas hacer el análisis por espectrometría de absorción atómica y con generación de hidruros acoplado a ésta técnica. Los parámetros para la digestión de la muestra se optimizaron mediante un diseño experimental adecuado a la investigación el cual se detalla más adelante.<sup>85,86</sup>

### **III.2.4. Generación del hidruro de selenio para su determinación por EAA.**

El selenio, elemento traza en la miel, se determinó por espectroscopía de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN SpectrAA 110, controlado mediante un software SpectrAA 110 version 2.0. Como unidad de atomización se utilizó una celda en forma de 'T', como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco de selenio marca Perkin Elmer, a una longitud de onda de 196,0 nm (rango lineal 0-200 µg/L). A éste equipo se adicionó un sistema de generación de hidruro, en modo de flujo continuo como el mostrado en la figura 7, donde un flujo constante de la solución de la muestra acidificada con HCL, se mezcla con un flujo contante de la solución de borohidruro de sodio mediante un sistema de mangueras múltiples, siendo aspirados desde las soluciones y propulsados por los canales hacia el serpentines de

mezclado y de reacción y luego hasta el separador de fases gas-líquido por una bomba peristáltica. El gas de arrastre ( $N_2$ ), junto con el  $H_2$  formado en la descomposición del agente derivatizante, llevan el hidruro formado hasta el separador de fases, en donde se obtienen dos flujos: el hidruro gaseoso con hidrógeno y gas de purga que fluye hacia el atomizador y el efluente líquido drenado que es succionado por otra bomba peristáltica al recipiente de los desechos (anexo 3). La concentración de ácido y agente reductor, al igual que NaOH como agente estabilizador de la solución de  $NaBH_4$ , y otros parámetros importantes como la longitud de manguera de reacción y la manguera de transporte del hidruro, las velocidades de los flujos, se optimizaron mediante un diseño experimental adecuado a la investigación que se detalla en el siguiente punto.<sup>12,44,87</sup>



**Figura 7.** Esquema del sistema de generación de hidruros en flujo continuo.<sup>12</sup>

### III.2.5. Diseño experimental.

En vista de la gran cantidad de parámetros a evaluar en las metodologías a emplear para la determinación del selenio en miel, se seleccionó la optimización multivariada y el diseño de Box-Behnken, por bloque, aleatorizado, enmarcado en la quimiometría, ya que este es el que mejor se acopla al sistema experimental diseñado. A partir de éste, se obtuvieron los parámetros óptimos a emplear en la digestión de las muestras de miel y en la generación del hidruro de selenio, el cual consta de dos bloques, el primero corresponde a los parámetros de la digestión de las muestras y el segundo a los parámetros implicados en la generación del hidruro de selenio, tal como se muestra a continuación.



### III.2.5.1. Bloque 1. Digestión de la muestra.

**Tabla N° 8.** Diseño experimental seleccionado. Bloque 1. Digestión de la muestra.

<i>Tipo de Factores</i>	Proceso	Diseño de Box-Behnken
<i>Puntos Centrales</i>	Por Bloque	6
<i>Punto Central</i>	Colocación	Aleatorio
Diseño	Aleatorizado	Sí
Número de	Replicaciones	0
<i>Total</i>	<i>Ejecuciones</i>	46
<i>Total</i>	<i>Bloques</i>	1

Número de muestras por ejecución: 1

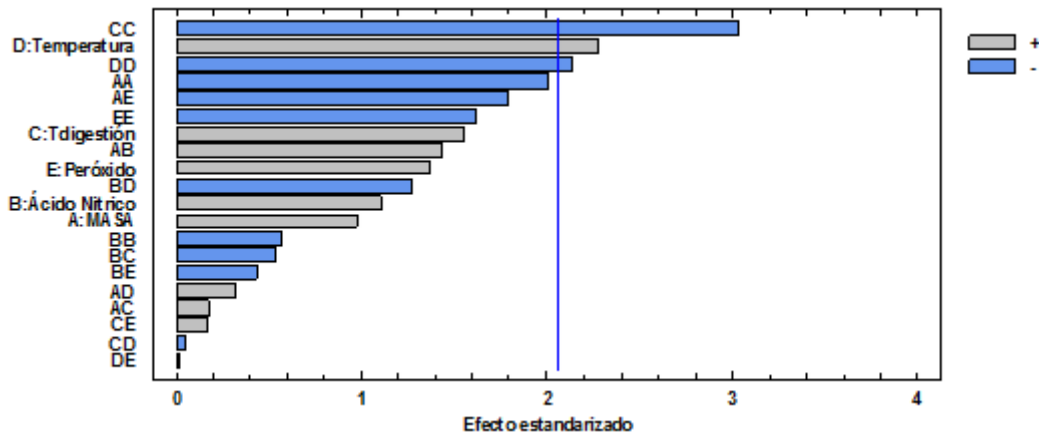
El bloque 1 constituye una serie de experimentos, donde se optimizaron los parámetros implicados en la digestión de la muestra, variando la cantidad de muestra de miel “*masa (g)*” en 1, 1,5 y 2; el agente reductor “*HNO<sub>3</sub> (mL)*” en 2, 3 y 4; temperatura de la plancha de calentamiento (°C) en 25, 30 y 35; tiempo de digestión “*Tiempo (horas)*” en 2,3 y 4; cantidad de agente oxidante “*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mL)*” en 2, 3 y 4, teniendo como respuesta analítica a la variación de cada uno de ellos en conjunto la absorbancia medida en el equipo de absorción atómica VARIAN SpectrAA 110. (Anexo 4), Los resultados obtenidos se presentan a continuación. Los efectos para el análisis de varianza ANOVA de la absorbancia son: A: MASA; B: Ácido Nítrico, C: T digestión; D: Temperatura; E: Peróxido; AA; AB; AC; AD; AE; BB; BC; BD; BE; CC; CD; CE; DD; DE; EE. Se seleccionó el modelo cuadrático para ajustar a los resultados del experimento con 21 coeficientes. No se excluyó ningún efecto.

Se especificó 1 variable de respuesta y 5 factores experimentales. El diseño seleccionado tiene 46 ejecuciones, con 1 una muestra para ser tomada en cada ejecución. El modelo por defecto es cuadrático con 21 coeficientes. Los modelos estadísticos han sido ajustados a las variables de respuesta. Modelos con P-valores por debajo de 0,05; de los cuales hay 1, indicando que el modelo ajustado es estadísticamente significativo al 5,0 % de nivel de significación. También es interesante el estadístico R-cuadrado, el cual muestra el porcentaje de variación en la respuesta ha sido explicado por el modelo ajustado. Para ABSORBANCIA, R-cuadrado es igual a 74,00 %.

El diagrama de Pareto es una herramienta gráfica donde los datos se ordenan de mayor a menor, lo que deja más claro qué aspectos deben resolverse primero. Este se seleccionó para graficar los estimados en orden decreciente de importancia. Para probar la significancia

estadística de los efectos, se seleccionó la Tabla N° 9, Análisis de Varianza para ABSORBANCIA (ANOVA), que particiona la variabilidad de ABSORBANCIA en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, tres efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0 %. Estos se presentan a continuación.

**Gráfica N° 1.** Diagrama de Pareto Estandarizada para Absorbancia.



**Tabla N° 9.** Análisis de Varianza para ABSORBANCIA (ANOVA).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:MASA	0,000497103	1	0,000497103	0,95	0,3396
B:Ácido Nítrico	0,000635208	1	0,000635208	1,21	0,2816
C:Tdigestión	0,00126211	1	0,00126211	2,41	0,1334
D:Temperatura	0,00272398	1	0,00272398	5,19	<b>0,0315</b>
E:Peróxido	0,000987862	1	0,000987862	1,88	0,1821
AA	0,00212129	1	0,00212129	4,04	0,0552
AB	0,00107912	1	0,00107912	2,06	0,1638
AC	0,00001681	1	0,00001681	0,03	0,8594
AD	0,0000540225	1	0,0000540225	0,10	0,7509
AE	0,00169612	1	0,00169612	3,23	0,0842
BB	0,000165315	1	0,000165315	0,32	0,5795
BC	0,000157503	1	0,000157503	0,30	0,5885
BD	0,000838102	1	0,000838102	1,60	0,2178
BE	0,0001	1	0,0001	0,19	0,6661
CC	0,00484437	1	0,00484437	9,24	<b>0,0055</b>
CD	0,0000015625	1	0,0000015625	0,00	0,9569
CE	0,0000152384	1	0,0000152384	0,03	0,8660

DD	0,00238933	1	0,00238933	4,56	0,0428
DE	9,E-8	1	9,E-8	0,00	0,9897
EE	0,00137256	1	0,00137256	2,62	0,1183
Error total	0,0131109	25	0,000524437		
Total (corr.)	0,0504171	45			

En el diagrama de Pareto estandarizada para la absorbancia (Grafica N° 1), los factores que causan más impacto sobre la digestión de la muestra son la temperatura aplicada y el tiempo de digestión al momento de agregar el HNO<sub>3</sub>. El ácido empleado en la digestión es un elemento de gran importancia, el HNO<sub>3</sub> es uno de los ácidos más ampliamente usados en la descomposición de materia orgánica y liberación de los elementos trazas, formando sales de nitrato altamente solubles. Sin embargo, debido a su punto de ebullición relativamente bajo, no siempre se logra oxidar totalmente la materia orgánica por lo que adicionalmente, es necesario el agregar un agente oxidante más fuerte como el peróxido de hidrógeno, que además tiene la particularidad de no contener ningún ion y descomponerse en agua y oxígeno. Es bien sabido que en muchas digestiones la temperatura actúa como un catalizador de la reacción, puesto que el aplicar temperatura, proporciona energía térmica con lo que ocurre más rápido la descomposición de la materia orgánica por el ácido nítrico, siempre y cuando esté por debajo del punto de ebullición de HNO<sub>3</sub>, para evitar perder analitos con los vapores desprendidos, es por ello que se prueban diferentes temperaturas. El tiempo que se deja para que ocurra la reacción también es un factor importante, de este depende que la reacción de descomposición de la materia orgánica se lleve en su totalidad.

Las características óptimas de los factores experimentales han sido determinadas y mostradas en el resumen Tabla N° 10. Con estas características, las variables respuesta generan un índice de deseabilidad de 99,60%.

**Tabla N° 10.** Factores establecidos y Óptimo

<b>Factor</b>	<b>Establecimiento</b>
<b>MASA</b>	1,99999
<b>Ácido Nítrico</b>	4,0
<b>T digestión</b>	3,12175
<b>Temperatura</b>	33,0606
<b>Peróxido</b>	2,00082

### III.2.5.2. Bloque 2. Generación de hidruro.

**Tabla N° 11.** Diseño experimental seleccionado. Bloque 2. Generación de hidruro.

<i>Tipo de Factores</i>	Proceso	Diseño de Box-Behnken
<i>Puntos Centrales</i>	Por Bloque	8
<i>Punto Central</i>	Colocación	Aleatorio
Diseño	Aleatorizado	Sí
Número de	Replicaciones	0
<i>Total</i>	<i>Ejecuciones</i>	64
<i>Total</i>	<i>Bloques</i>	1

Número de muestras por ejecución: 1

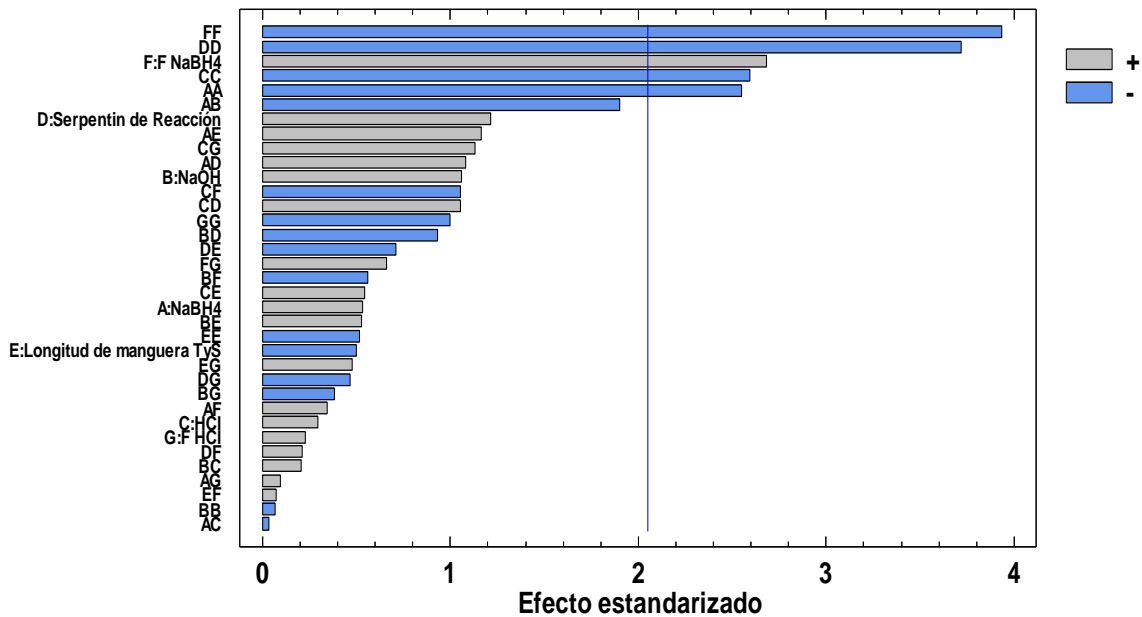
En este segundo bloque, se desarrolló una serie de experimentos que permitió la optimización de los parámetros implicados en la generación del hidruro de selenio, como lo son la concentración del agente reductor  $\text{NaBH}_3$  (% g/mL) en 0,5; 0,75 y 1; la concentración del NaOH como agente estabilizador de la solución del  $\text{NaBH}_3$  (% g/mL) en 0,25; 0,5 y 0,75; la concentración del HCl (M, mol/L) en 1, 2 y 3; el tamaño de la manguera de reacción en 8 cm (valor mínimo a construir con el material disponible), 12 cm y 18 cm; tamaño de la manguera de arrastre en 8 cm, 12 cm, y 18 cm; frecuencia en la bomba peristáltica de la manguera del flujo del  $\text{NaBH}_4$  (ml/min) en 25, 30 y 35; frecuencia en la bomba peristáltica del flujo del HCl (ml/min) en 25, 30 y 35. Seguidamente de la determinación del selenio en miel, en el equipo de absorción atómica VARIAN SpectrAA 110, donde nuevamente la respuesta analítica es la absorbancia. A continuación, se presenta los valores del bloque 2, (anexo 5).

Los efectos para el análisis de varianza ANOVA de la absorbancia son: A:  $\text{NaBH}_4$ ; B: NaOH; C: HCl; D: Serpentin de Reacción; E: Longitud de manguera T y S; F: Flujo de  $\text{NaBH}_4$ ; G: Flujo de HCl; FF; DD; CC; AA; AB; AE; CG; AD; CF; CD; GG; BD; DE; FG; BF; CE; BE; EE; EG; DG; BG; AF; DF; BC; AG; EF; BB y AC. Se seleccionó el modelo cuadrático para ajustar a los resultados del experimento con 18 coeficientes. Los efectos excluidos son: AE, AG, BB, BD, BE, BG, CF, CG, DD, DE, DF, DG, EE, EF, EG, FF, FG y GG.

Se especificó 1 variable respuesta y 7 factores experimentales. El diseño seleccionado tiene 64 ejecuciones, con 1 una muestra para ser tomada en cada ejecución. El modelo por defecto es cuadrático con 18 coeficientes. Los modelos estadísticos han sido ajustados a las variables de respuesta. Modelos con P-valores por debajo de 0,05, de los cuales hay 1, indican que el modelo ajustado es estadísticamente significativo al 5,0 % de nivel de significación. También es

interesante el estadístico R-cuadrado, el cual muestra el porcentaje de variación en la respuesta que ha sido explicado por el modelo ajustado. Para ABSORBANCIA, R-cuadrado igual as 73,51 %. Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, se seleccionó el Diagrama de Pareto.

**Gráfica N° 2.** Diagrama de Pareto Estandarizada para la Absorbancia.



En el estudio de los factores implicados en la generación del hidruro, A: NaBH<sub>4</sub>; B: NaOH; C: HCl; D: Serpentin de Reaccion; E: Longitud de manguera T y S; F: Flujo de NaBH<sub>4</sub>; G: Flujo de HCl y la combinación de estos, sin considerar los efectos excluidos.

Como se observa en la Gráfica N° 2, correspondiente al diagrama de Pareto estandarizada para la absorbancia, los factores que causan más impacto sobre el sistema y la generación del hidruro son las concentraciones de NaBH<sub>4</sub> y HCl, el tamaño del serpentín donde ocurre la reacción y el flujo del NaBH<sub>4</sub>. La concentración y el flujo del NaBH<sub>4</sub> son factores influyentes en la generación del hidruro, debido a que la cantidad de agente reductor añadida debe ser eficiente para que la reducción del analito sea eficaz, rápida y cuantitativa, pero es necesario mantener un equilibrio entre el volumen y concentración del agente reductor, puesto que en esta reacción se usa en exceso de este con respecto a la concentración del analito y una cantidad excesiva produce gran cantidad de hidrógeno que diluye el hidruro generado y con ello perdida de la señal.<sup>46</sup>

El HCl es el agente acidificante del analito, el borohidruro de sodio se hidroliza en presencia del HCl, esto garantiza una abundante liberación de hidrógeno atómico que favorece la transición del hidruro a la fase gaseosa a través de la aparición de burbujas que promueven la desorción del gas, que posteriormente es arrastrado por el gas de purga. El hidrógeno resultante conduce el hidruro desde la mezcla de reacción a la fase gaseosa dado que la concentración del hidruro en la mezcla es típicamente mucho menor que la solubilidad del hidruro, en particular en el caso de selenio, esta es la función adicional del agente reductor.<sup>46</sup>

En cuanto al serpentín de reacción también es un factor influyente por el tiempo de residencia de los reactivos que forman los productos en este tramo, y como los hidruros son compuestos más o menos inestables, cuanto más pequeño sea el camino del hidruro a atravesar en la disolución mayor será el rendimiento de reacción.

**Tabla N° 12.** Deseabilidad del experimento.

	<i>Observado</i>	<i>Predicho</i>	<i>Observado</i>	<i>Predicho</i>
<i>Ejecutar</i>	<i>ABSORBANCIA</i>	<i>ABSORBANCIA</i>	<i>Deseabilidad</i>	<i>Deseabilidad</i>
1	0,0229	0,0478593	0,943723	0,954356
2	0,1412	0,113513	0,994121	0,982326
3	0,1104	0,10408	0,981	0,978307
4	0,0719	0,0709857	0,964598	0,964208
5	0,0876	0,086482	0,971286	0,97081
6	0,1281	0,127887	0,98854	0,988449
7	0,1088	0,0817891	0,980318	0,968811
8	0,1055	0,0999812	0,978912	0,976561
9	0,0564	0,0763944	0,957995	0,966513
10	0,1277	0,10699	0,98837	0,979547
11	0,1445	0,142772	0,995527	0,994791
12	0,0869	0,08332	0,970988	0,969463
13	0,0843	0,108482	0,969881	0,980183
14	0,1027	0,108057	0,977719	0,980002
15	0,1182	0,103085	0,984323	0,977883
16	0,1405	0,105275	0,993823	0,978816
17	0,1514	0,123389	0,998466	0,986533
18	0,0575	0,073694	0,958463	0,965362
19	0,1479	0,142772	0,996975	0,994791
20	0,1182	0,10129	0,984323	0,977119
21	0,144	0,142772	0,995314	0,994791
22	0,1078	0,11128	0,979892	0,981375
23	0,1103	0,0931678	0,980957	0,973658
24	0,0681	0,0737042	0,962979	0,965367
25	0,1458	0,142772	0,996081	0,994791
26	0,1361	0,117661	0,991948	0,984093
27	0,0771	0,0883791	0,966813	0,971618
28	0,1398	0,142772	0,993525	0,994791
29	0,0822	0,109495	0,968986	0,980614

30	0,1145	0,127113	0,982746	0,988119
31	0,0882	0,114326	0,971542	0,982672
32	0,1153	0,104199	0,983087	0,978358
33	0,1345	0,129533	0,991267	0,989151
34	0,1273	0,108083	0,988199	0,980013
35	0,0667	0,0874014	0,962383	0,971202
36	0,1064	0,131622	0,979296	0,99004
37	0,1454	0,142772	0,99591	0,994791
38	0,1413	0,142772	0,994164	0,994791
39	0,1033	0,107411	0,977975	0,979726
40	0,1295	0,111539	0,989137	0,981485
41	0,0939	0,0742913	0,97397	0,965617
42	0,1433	0,126682	0,995016	0,987936
43	0,1393	0,141154	0,993312	0,994101
44	0,1353	0,133084	0,991607	0,990664
45	0,0843	0,0737319	0,969881	0,965378
46	0,0873	0,0775442	0,971159	0,967002
47	0,1087	0,116572	0,980275	0,983629
48	0,0987	0,0901121	0,976015	0,972357
49	0,0416	0,064091	0,95169	0,961271
50	0,1392	0,142772	0,993269	0,994791
51	0,0995	0,125576	0,976356	0,987465
52	0,1194	0,0924336	0,984834	0,973346
53	0,141	0,147855	0,994036	0,996956
54	0,1232	0,150341	0,986453	0,998015
55	0,0613	0,0421229	0,960082	0,951912
56	0,0635	0,0832928	0,961019	0,969451
57	0,0852	0,0900032	0,970264	0,97231
58	0,155	0,145612	1,0	0,996
59	0,1072	0,122915	0,979636	0,986331
60	0,0667	0,0826029	0,962383	0,969158
61	0,1393	0,136163	0,993312	0,991975
62	0,1068	0,118158	0,979466	0,984305
63	0,055	0,0665333	0,957398	0,962312
64	0,0797	0,0900855	0,967921	0,972345

Esta tabla muestra la conveniencia (deseabilidad) calculada de las respuestas en cada ejecución en el experimento. Basada en las respuestas observadas, los resultados más convenientes son obtenidos para la ejecución 58. Basada en las respuestas predichas del modelo ajustado, los resultados más convenientes corresponden a la ejecución 54, mostrados en la tabla que se presenta continuación, en donde se puede observar que el tamaño óptimo del serpentín de reacción para la generación del hidruro resultó ser el más pequeño evaluado experimentalmente, tal como se discute en el diagrama de Paretos para este segundo bloque. También se observa que la concentración del NaOH es mayor que la del NaBH<sub>4</sub>, esto se deba a que el agente reductor es tan energético, que se hidroliza fácilmente en agua, por lo que es necesario usar esta concentración de NaOH para estabilizar la disolución.

**Tabla N° 13.** Factores establecidos y Óptimo, correspondiente a la ejecución 54.

<b>Factor</b>	<b>Establecimiento</b>
% NaBH <sub>4</sub> (g/ml)	0,5
% NaOH (g/ml)	0,75
HCl (mol/L)	2
Serpentín de reacción (cm)	8
Longitud de la manguera de separación y transporte (cm)	12
Flujo de NaBH <sub>4</sub> (ml/min)	9,4
Flujo de HCl (ml/min)	9,4

### **III.2.6. Características analíticas para la validación del método de la determinación de selenio por HGAAS en flujo continuo.**

Una vez optimizado el sistema experimental, se procedió a realizar la validación del método, para lo cual se empleó el patrón estándar de 1000mg/L de Se, a partir de este se prepararon las soluciones de trabajo en µg/L, para las curvas de calibración sencilla y adición estándar. La adición estándar se hizo sobre un pool de las muestras de miel y en la muestra N° 6, para corroborar el comportamiento de la curva. Luego se procedió a validar las principales características analíticas del método, evaluando la linealidad, el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto de cada uno de los resultados de dichas curvas, así como el %DSR. Con los resultados obtenidos se determinó el “estadístico F” y el estadístico “t de student” para evaluar si hay o no diferencia significativa entre las pendientes de ambos métodos.

#### **III.2.6.1. Curva de Calibración Sencilla para el selenio en miel.**

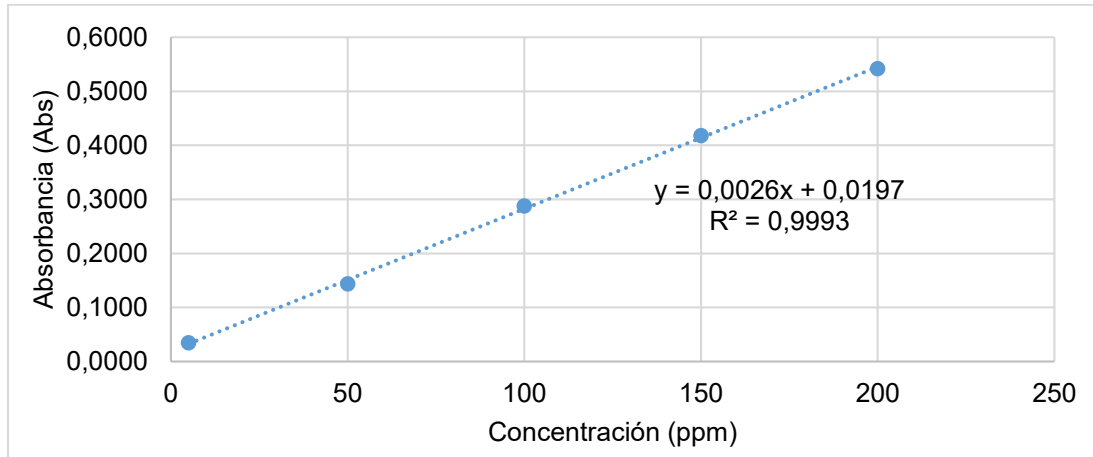
Una curva de calibración es la representación gráfica que relaciona una señal instrumental en función de la concentración de un analito y define un intervalo de trabajo con resultados que tienen una precisión y exactitud conocida. Este método permite verificar que la respuesta instrumental del equipo se mantenga dentro de los mismos niveles de sensibilidad y determinar la concentración de una sustancia (analito) en una muestra desconocida, sobre todo en disoluciones.<sup>88</sup>

Para el Se, partiendo del patrón de 1000 ppm, se preparó una solución de 5000 ppb en 100 ml de agua desionizada, a partir de esta se prepararon las soluciones de 5, 50, 100, 150 y 200 µg/L, adicionando 10 mL de HCl y llevando un volumen final de 100 mL, estos puntos comprenden el intervalo de concentraciones que se espera obtener en las muestras de miel analizadas. Las



curvas se prepararon diariamente. A continuación, se presenta la gráfica de la curva de calibración sencilla obtenida para el selenio en HCl al 10 %.

**Gráfica N° 3.** Curva de calibración sencilla del Se en HCl al 10%.



**Tabla N° 14.** Datos de la curva de calibración sencilla para el Se en HCl al 10 %.

Ecuación de la curva ( $y = mx + b$ )	$y = 0,0026x + 0,0197$
Pendiente (m)	0,0026
Desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ )	$3,9 \times 10^{-5}$
Corte con el eje Y (b)	0,0197
Desviación estándar del corte ( $S_b$ )	0,0048
Coefficiente de correlación lineal $R^2$	0,9993
Desviación estándar respecto al origen $S_{xy}$	0,0061
Desviación estándar relativa de m	$7,9 \times 10^{-4} \%$

La Gráfica N° 3, muestra que el comportamiento para el selenio es aproximado a la linealidad. El valor del coeficiente de correlación lineal es de 0,9993. Asimismo, el valor de la desviación estándar relativa de la pendiente es de  $7,9 \times 10^{-4} \%$ .

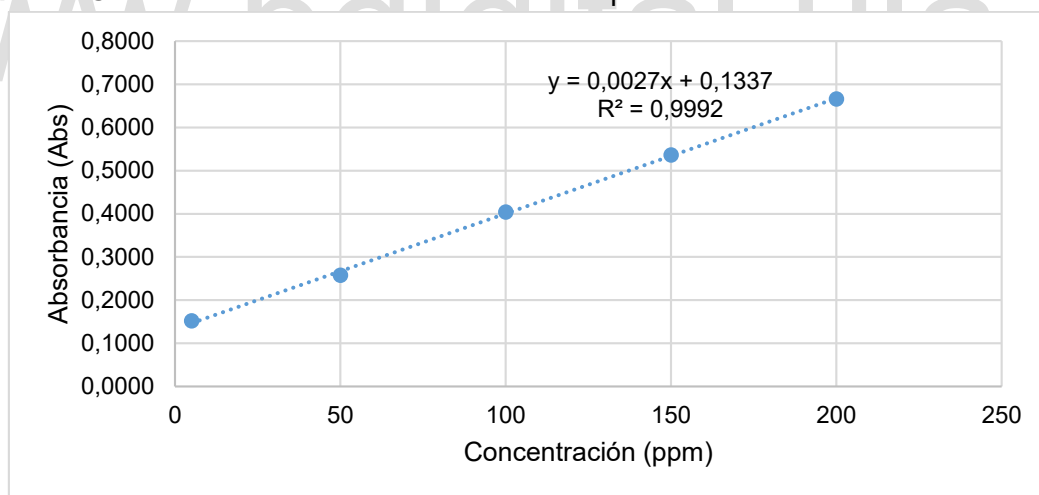
### III.2.6.2. Curva de adición estándar para el selenio en un pool de las muestras de miel.

La preparación de estándares que reproduzcan la composición de la muestra es muy complicada cuando se trata del análisis de muestras complejas (suelos, minerales, sangre completa, orina, etc.) ya que, en este tipo de muestras, usualmente, los componentes de la matriz afectan las medidas de la señal analítica ya sea por exceso o por defecto, en el caso de la miel se trata de una matriz compleja.

Con el objetivo de minimizar los efectos de la matriz, se utiliza el método de adición de estándar en el que la muestra se utiliza como una especie de “blanco” al que se añade más analito. Para ello, se añaden cantidades conocidas y crecientes del analito a determinar a alícuotas de la muestra desconocida y todas se diluyen al mismo volumen final. Posteriormente, se procede a determinar la señal de todas estas soluciones (las muestras enriquecidas y la desconocida) y se representa gráficamente la señal analítica en función de la concentración del estándar añadido. Este método no elimina las interferencias, solo las compensa ya que se obtienen todas las señales analíticas bajo las mismas condiciones.<sup>89</sup>

La metodología a seguir para adición de estándar consistió en tomar 2 g de un pool de las muestras de miel, para luego realizarle el mismo tratamiento de digestión previamente optimizado, posteriormente se tomaron 5 alícuotas con 2 mL de este pool y se le adicionaron cantidades exactamente conocidas de selenio, llevándolas a un volumen final de 10 mL, para evaluar que no había interferencia por parte de la matriz.<sup>73</sup> A continuación, se muestra la curva de adición de estándar para el selenio en un pool de las muestras de miel.

**Gráfica N° 4.** Curva de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.



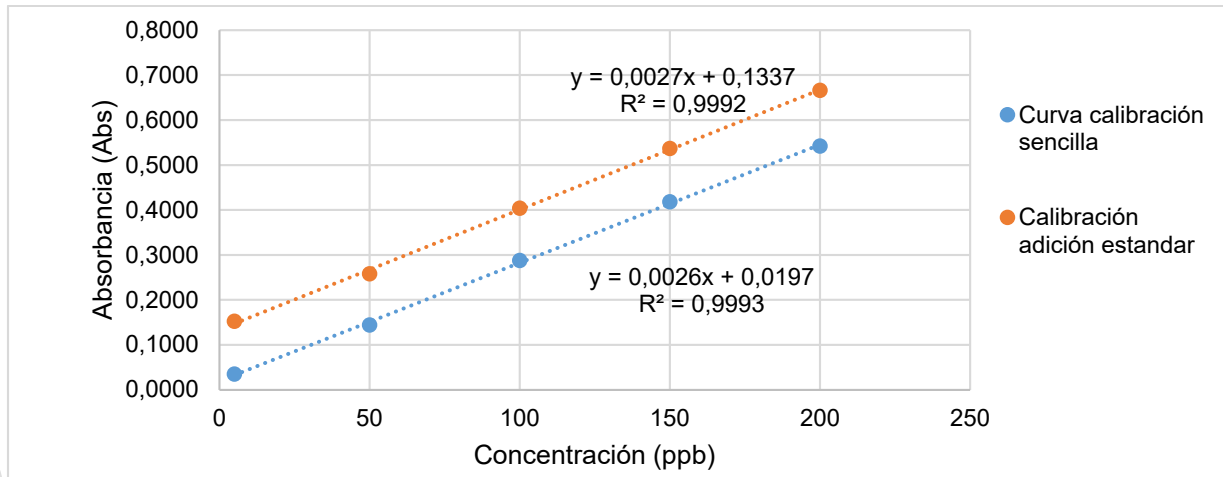
**Tabla N° 15.** Datos de la curva de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.

Ecuación de la curva ( $y = mx + b$ )	$y = 0,0027x + 0,1337$
Pendiente (m)	0,0027
Desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ )	$4,2 \times 10^{-5}$
Corte con el eje Y (b)	0,1337
Desviación estándar del corte ( $S_b$ )	0,0052
Coefficiente de correlación lineal $R^2$	0,9992
Desviación estándar respecto al origen $S_{xy}$	0,0066
Desviación estándar relativa de m	$8,5 \times 10^{-4} \%$

**Tabla N° 16.** Resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla de Se y con adición de estándar de Se para un pool de las muestras de miel.

Curva de calibración sencilla		Curva de adición estándar	
Pendiente (m)	(0,00263 ± 0,00004)	Pendiente (m)	(0,00267 ± 0,00004)
Corte (b)	(0,0197 ± 0,0048)	Corte (b)	(0,1337 ± 0,0052)
Coefficiente de Correlación lineal (R <sup>2</sup> )	0,9993	Coefficiente de Correlación lineal (R <sup>2</sup> )	0,9992

**Gráfica N° 5.** Curva de calibración sencilla vs. Curva de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.



### III.2.6.3. Estudio estadístico de la curva de calibración sencilla del Se y de adición estándar del Se en un pool de las muestras de miel.

La curva de adición estándar realizada sobre el pool de las muestras de miel, permitió corroborar la ausencia de efectos de matriz, para ello se realizó un estudio estadístico con el fin de comparar las pendientes de la curva de calibración sencilla y de adición estándar y sus varianzas. El estudio efectuado corresponde al “criterio F” para la comparación de las desviaciones estándar de las pendientes:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Ecuación (15).}$$

Donde 1 y 2 se disponen de modo que en la ecuación F sea  $\geq 1$ . El número de grados de libertad del numerador y el denominador, viene dado por  $n_1 - 1$  y  $n_2 - 2$ , tomando los valores de referencia para un contraste de dos colas. Si la hipótesis nula es verdadera, entonces la relación de las varianzas deberá ser próxima a 1, las diferencias respecto a 1 se deben a variaciones

aleatorias, a menos que la diferencia sea demasiado grande. Si el valor F calculado supera el F tabulado (obtenido de las tablas), se rechaza la hipótesis nula.<sup>90</sup>

Además, se empleó el estadístico “t” de Student, el cual consiste en la asociación de dos variables comparando dos coeficientes de regresión o pendientes para estimar con un 95 % de confianza. Para contrastar la hipótesis nula  $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ , se calcula el estadístico t:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación (16).}$$

s, se calcula a partir de:

$$s = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Ecuación (17).}$$

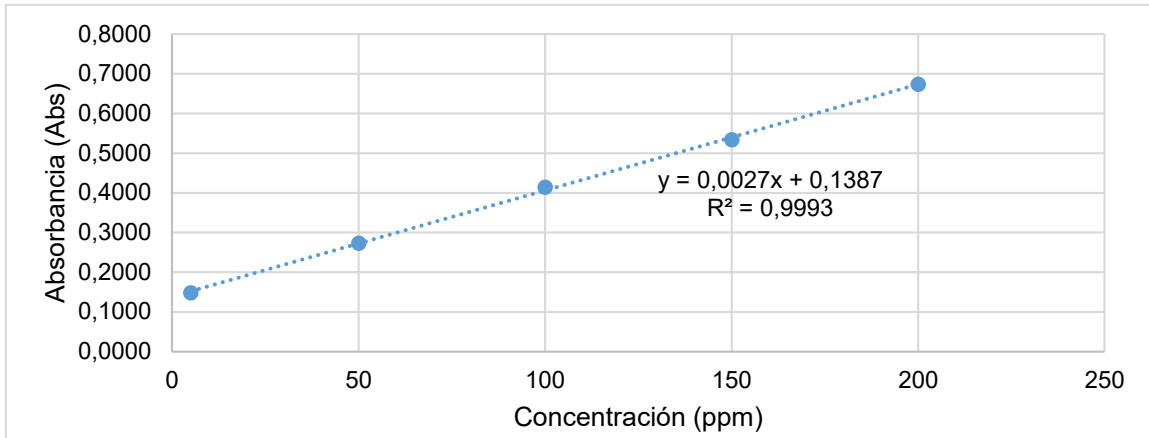
Donde “t” tiene  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad. Si “t” calculado < “t” tabulado, se acepta la hipótesis nula  $H_0$ , pero si “t” calculado > “t” tabulado, se rechaza  $H_0$ . Este método supone que las muestras se extraen de dos poblaciones con desviaciones estándar iguales.<sup>90</sup>

Una vez aplicada las pruebas estadísticas, se encontró que el valor calculado para el criterio F es 1,16 y al compararlo con el valor tabulado para un contraste de dos colas (95% de confianza, Probabilidad 0,05),  $F_{4,3:15,10}$ ; donde los subíndices indican los grados de libertad del numerador y del denominador, se tiene que el valor calculado es menor que el tabulado, por tanto, no hay diferencia significativa entre las varianzas y las variaciones respecto a 1 se deben a errores aleatorios. En cuanto al estadístico “t” se obtuvo el valor de “t” calculado: 1,54, este es menor que el “t” tabulado, para 8 grados de libertad y un 95 % de confianza: 2,31, por lo que se acepta la hipótesis nula indicando que no existe diferencia significativa entre las pendientes evaluadas, asimismo se puede indicar que el método propuesto está libre de interferencias de tipo físico y químico por parte de la matriz.

#### **III.2.6.4. Curva de adición estándar para el selenio en la muestra de miel N° 6.**

El procedimiento anterior se realizó a la muestra N° 6, a continuación, se muestra los resultados obtenidos para la curva de adición de estándar y su estudio estadístico.

**Gráfica N° 6.** Curva de adición estándar del Se en la muestra de miel N° 6.



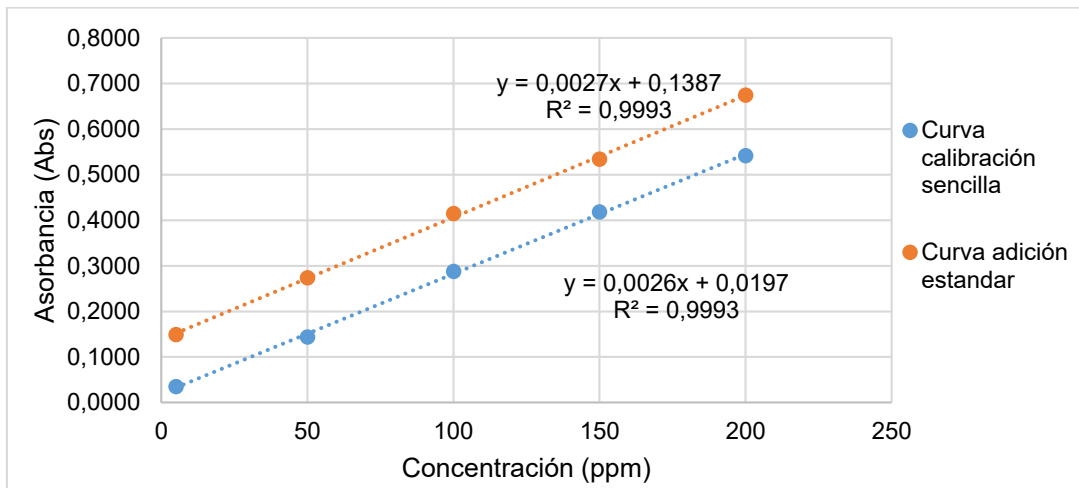
**Tabla N° 17.** Datos de la curva de adición estándar del Se en la muestra de miel N° 6.

Ecuación de la curva ( $y = mx + b$ )	$y = 0,0027x + 0,1338$
Pendiente (m)	0,0027
Desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ )	$4,01 \times 10^{-5}$
Corte con el eje Y (b)	0,1387
Desviación estándar del corte ( $S_b$ )	0,0049
Coeficiente de correlación lineal $R^2$	0,9993
Desviación estándar respecto al origen $S_{xy}$	0,0062
Desviación estándar relativa de m	$8,03 \times 10^{-4}\%$

**Tabla N° 18.** Resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla de Se y con adición de estándar de Se en la muestra de mie N° 6.

Curva de calibración sencilla		Curva de adición estándar	
Pendiente (m)	$(0,00263 \pm 0,000004)$	Pendiente (m)	$(0,00268 \pm 0,00004)$
Corte (b)	$(0,0197 \pm 0,0048)$	Corte (b)	$(0,1387 \pm 0,0049)$
Coeficiente de Correlación lineal ( $R^2$ )	0,9993	Coeficiente de Correlación lineal ( $R^2$ )	0,9993

**Gráfica N° 7.** Curva de calibración sencilla vs. Curva de adición estándar del Se en la muestra de miel N° 6.



### III.2.6.5. Estudio estadístico de la curva de calibración sencilla del Se y de adición estándar del Se en la muestra de miel N°6.

Luego de aplicar las pruebas estadísticas, se encontró que el valor calculado para el estadístico F es 1,04 y al compararlo con el valor tabulado para un contraste de dos colas (95% de confianza, Probabilidad 0,05),  $F_{4,3:15,10}$ ; donde los subíndices indican los grados de libertad del numerador y del denominador, se tiene que el valor calculado es menor que el tabulado, por tanto, no hay diferencia significativa entre las varianzas y las variaciones respecto a 1 se deben a errores aleatorios. Al aplicar el estadístico “t” se tiene que el valor de “t” calculado: 1,89, es menor que el “t” tabulado, para 8 grados de libertad y un 95 % de confianza: 2,31, se acepta la hipótesis nula indicando que no existe diferencia significativa entre las pendientes evaluadas, asimismo se puede indicar que el método propuesto está libre de interferencias del tipo físico y químico por parte de la matriz.

- Límite de detección (LOD): se refiere a la mínima concentración de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado, mediante la aplicación de un método de análisis. Matemáticamente, se define como el cociente de tres veces la desviación estándar de la medida del blanco ( $S_b$ ) entre la pendiente (m) de la curva de calibración.<sup>89</sup>

$$LOD = \frac{3S_b}{m} \quad \text{Ecuación (18).}$$

Para método analítico desarrollado, se empleó la ecuación descrita, encontrando que el límite de detección es 0,7 µg/L.

- Límite de cuantificación (LOC): indica la mínima concentración de analito con que se puede realizar medidas precisas. Matemáticamente, se define como el cociente de diez veces la desviación estándar de la medida del blanco ( $S_b$ ) entre la pendiente (m) de la curva de calibración.<sup>89</sup>

$$LC = \frac{10S_b}{m} \quad \text{Ecuación (19).}$$

Para establecer el límite de cuantificación del método analítico realizado, se aplicó la formula descrita, encontrando que el límite de cuantificación es 2,4 µg/L.

- Límite de respuesta lineal (LOL): se refiere a la concentración de analito a partir de la cual la curva de calibración no presenta un comportamiento lineal con respecto a la señal analítica.<sup>89</sup>
- Intervalo de linealidad: señala el intervalo útil de trabajo de un método analítico y el cual va desde el límite de cuantificación al límite de respuesta lineal.<sup>89</sup> El intervalo de linealidad para la determinación de Se con el método empleado está comprendido entre los valores de (2,4 - 200) µg/L.
- Porcentaje de recuperación: Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente un analito que ha sido adicionado a una muestra. Se expresa como porcentaje (% R).<sup>80,91</sup>

$$\% R = \frac{[Se] \text{ recuperado}}{[Se] \text{ agregado}} \times 100 \quad \text{Ecuación (20).}$$

#### II.2.6.6. Precisión y exactitud del método analítico para el análisis de selenio en miel.

Para evaluar la precisión del método analítico utilizado se procedió a realizar el cálculo de los porcentajes de recuperación donde se realizó el dopaje de tres muestras con patrón de selenio, a tres distintas concentraciones bajo, medio y alto, realizando tres repeticiones por muestra en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, se seleccionó la muestra N° 6, siendo usada durante toda la validación. En la Tabla N° 19, que sigue a continuación, se muestran los porcentajes de recuperación para las concentraciones 5, 100, 200 µg/L, evaluados por triplicado, en las mismas condiciones operativas y el mismo día.

**Tabla N° 19.** Porcentajes de recuperación del Se, para las concentraciones 5, 100, 200 µg/L en la muestra N° 6 de miel, evaluado por triplicado.

Concentración (ppb)	% Réplica 1	% Réplica 2	% Réplica 3	Promedio %	%RDS
5	(98,3 ± 0,1)	(98,9 ± 0,1)	(99 ± 0,1)	(98,4 ± 0,3)	4
100	(103,3 ± 0,1)	(103,3 ± 0,1)	(103,4 ± 0,1)	(103,3 ± 0,3)	2
200	(94,4 ± 0,1)	(95,0 ± 0,1)	(94,4 ± 0,1)	(94,6 ± 0,1)	3

Como se observa, los porcentajes de recuperación promedio del selenio en la muestra de miel N° 6 se encuentra entre el (94,6 ± 0,1) % y (103,3 ± 0,3) %. por tanto, el método que se está

utilizando para la cuantificación del selenio en miel presenta buena exactitud puesto que, los valores obtenidos para la recuperación de selenio en las diferentes muestras estudiadas, se encuentran entre el intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Adicional a esto se pueden observar el % DSR, varían del 2 % al 4 %, los mismos son menores al 5 %, obteniendo como resultado una buena repetibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del selenio en miel es óptimo.

Para estudiar la reproducibilidad del método se realizó el dopaje de tres concentraciones de la muestra de miel N° 6, a 5, 100 y 200 µg/L, y se realizó una medición por triplicado con la metodología anteriormente descrita durante 10 días para un total de 30 réplicas. Los resultados se presentan a continuación en la siguiente tabla.

**Tabla N° 20.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 5, 100, 200 µg/L de la muestra N° 6, para 10 días.

Concentración (ppb)	% Réplica Día 1	% Réplica Día 2	% Réplica Día 3	% Réplica Día 4	% Réplica Día 5	% Réplica Día 6	% Réplica Día 7	% Réplica Día 8	% Réplica Día 9	% Réplica Día 10	% Promedio	% DSR
5,0	(98,2 ± 0,1)	(96,3 ± 0,1)	(98,2 ± 0,1)	(98,1 ± 0,1)	(97,1 ± 0,1)	(97,3 ± 0,1)	(98,8 ± 0,1)	(99,1 ± 0,2)	(98,4 ± 0,1)	(98,0 ± 0,1)	(98,0 ± 0,8)	3
100,0	(106,1 ± 0,1)	(102,8 ± 0,1)	(103,8 ± 0,1)	(102,6 ± 0,2)	(102,8 ± 0,1)	(105,3 ± 0,2)	(105,9 ± 0,2)	(104,4 ± 0,1)	(104,3 ± 0,1)	(102,7 ± 0,2)	(104 ± 1)	4
200,0	(97,1 ± 0,2)	(95,9 ± 0,2)	(97,1 ± 0,2)	(96,4 ± 0,3)	(97,1 ± 0,3)	(96,4 ± 0,1)	(94,6 ± 0,2)	(94,7 ± 0,2)	(97,4 ± 0,2)	(95,4 ± 0,2)	(96 ± 1)	3

Se puede observar que los porcentajes de recuperación promedio del selenio en la muestra de miel N° 6, se encuentran entre el  $(96 \pm 1) \%$  y  $(104 \pm 1) \%$ , nuevamente el método que se está utilizando para la cuantificación del selenio en miel presenta buena exactitud, puesto que, los valores obtenidos para la recuperación de selenio en las diferentes muestras estudiadas, se encuentran entre el intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Adicional a esto se puede observar que el % DSR varían del 2 % al 4 %, los mismos son menores al 5 %, obteniendo como resultado una buena reproducibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del selenio en miel es óptimo.



### III.2.6.7. Determinación del contenido de selenio en las muestras de miel del Estado Mérida.

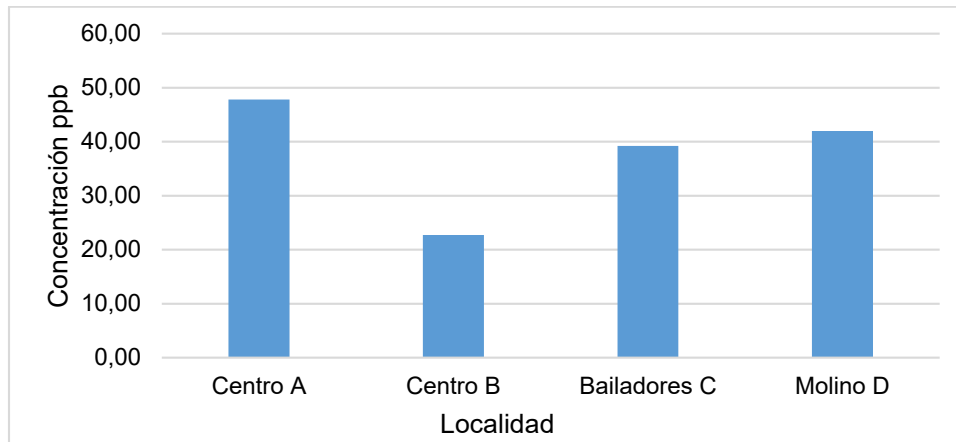
A continuación, se presenta Tabla N° 21, correspondiente a los resultados obtenidos para la determinación del selenio en las muestras de miel recolectadas en el Estado Mérida, donde se observa que las concentraciones de selenio encuentran entre el  $(17 \pm 1) \mu\text{g/L}$  y  $(55,4 \pm 0,9) \mu\text{g/L}$ .

**Tabla N° 21.** Resultados obtenidos para el selenio presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.

Muestra	Replica 1 ( $\mu\text{g/L}$ )	Replica 2 ( $\mu\text{g/L}$ )	Replica 3 ( $\mu\text{g/L}$ )	concentración ( $\mu\text{g/L}$ )
1	41,3	39,1	40,3	<b><math>(40,3 \pm 0,9)</math></b>
2	54,1	55,7	56,3	<b><math>(55,4 \pm 0,9)</math></b>
3	29,7	27,8	31,1	<b><math>(30 \pm 1)</math></b>
4	22,3	20,2	21,8	<b><math>(21,4 \pm 0,9)</math></b>
5	16,7	16,2	19,1	<b><math>(17 \pm 1)</math></b>
6	29,6	30,3	27,0	<b><math>(29 \pm 1)</math></b>
7	39,7	41,1	40,5	<b><math>(40,4 \pm 0,6)</math></b>
8	40,6	40,4	42,0	<b><math>(41,0 \pm 0,7)</math></b>
9	39,4	37,7	38,8	<b><math>(38,6 \pm 0,7)</math></b>
10	46,1	48,5	46,3	<b><math>(47 \pm 1)</math></b>
11	42,2	41,6	41,1	<b><math>(41,6 \pm 0,4)</math></b>
12	43,2	41,9	42,1	<b><math>(42,4 \pm 0,5)</math></b>

Como se menciona en el muestreo, las muestras corresponden a tres localidades del estado Mérida: Centro de la Ciudad, Municipio Libertador; Bailadores, Municipio Rivas Dávila y El Molino, Municipio Arzobispo Chacón. Con el fin de estudiar si hay o no diferencia significativa en los valores encontrados en cada localidad, se realizó un estudio, empleando la estadística básica para evaluar si había diferencia entre las concentraciones de Se, como el estadístico F y el estadístico t de student, para ello, se subdividió las muestras provenientes del Centro de Mérida en dos grupos de acuerdo a la procedencia de las casas apícolas, el grupo A, corresponde a las 2 primeras muestras y el grupo B, corresponde a las 3 últimas muestras; las 5 muestra procedentes de Bailadores corresponden al grupo C y las muestras procedente del Molino corresponden al grupo D. Estos se presentan la siguiente Gráfica N° 8.

**Gráfica N° 8.** Concentración de Se Vs. Localidad



Los resultados obtenidos de las combinaciones posibles para los grupos de ese estudio, Tabla N° 22, que sigue a continuación, muestran que (A y C); (A y D); (C y D), no presentaron diferencias significativas entre las concentraciones del selenio para estas localidades. Sin embargo, las combinaciones de los grupos (A y B); (D y B); (B y C), si presentaron diferencias significativas, por lo que se puede decir que, cualquiera de las combinaciones que implicara el grupo B, que es el que dio menores concentraciones de selenio, resultó tener diferencias significativas, esto se debe a que el contenido de metales en la miel depende de varios factores como el clima, la altura, la vegetación, y la biodisponibilidad de estos en el ambiente. Mérida es un estado que posee micro climas en diversas localidades, y con ellos variedad de vegetación, donde metabolismo del Se puede variar dependiendo de la especie vegetal, la etapa de crecimiento de la planta y el órgano de transporte y acumulación del Se, por lo que el contenido del selenio varía entre las zonas el mismo estado.

**Tabla N° 22.** Resultados de la evaluación de la concentración de Se respecto a cada localidad.

Combinación	Resultado
<b>A y B</b>	Si hay diferencia significativa
A y C	No hay diferencia significativa
A y D	No hay diferencia significativa
<b>B y C</b>	Si hay diferencia significativa
<b>B y D</b>	Si hay diferencia significativa
A y D	No hay diferencia significativa

### **III.3. Determinación de Fe, Zn y Cu por espectroscopia de absorción atómica en llama.**

La determinación de Fe, Zn y Cu, en las muestras de miel, se realizó empleando una metodología preestablecida en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), Facultad de Ciencias, ULA, Mérida-Venezuela. Mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica en llama, utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin – Elmer modelo 3100 Norwalk Ct USA, controlado mediante un programa Perkin – Elmer, modelo “3100 Enhanced Data Sistem”. Como fuente de radiación lámparas de cátodo hueco marca Perkin Elmer. Lámparas de cátodo hueco y longitudes de onda: 327,4 nm para cobre (rango lineal 0-5 mg/L); 248,3 nm para hierro (rango lineal 0-5 mg/L) y 213,9 nm para zinc (rango lineal 0-1 mg/L).

#### **III.3.1. Reactivos.**

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y de alta pureza disponible. Se utilizó ácido nítrico Riedel-de Haen, con un 65% de pureza; peróxido de hidrógeno Sigma – Aldrich, (34,5 - 36,5) %; ácido clorhídrico de Riedel-de Haen con un 37 % de pureza. El agua empleada para la preparación de soluciones y lavado de material de laboratorio, fue doblemente destilada y desionizada con resistividad específica de 18 MΩ/cm, obtenida en un sistema Millipore Milli-Q plus. Se prepararon soluciones estándar de 1000 mg/L de Cu, Fe y Zn, siguiendo el procedimiento descrito en el PerKin Elmer.<sup>82</sup>

#### **III.3.2. Soluciones.**

Se prepararon las siguientes soluciones patrón:

- Solución estándar de 1000 mg/L (ppm) de Cu, preparada a partir de cobre metálico, para lo cual se disolvió 1,000 g, en un volumen mínimo de HNO<sub>3</sub> (1+1). Diluyendo en un litro de solución con HNO<sub>3</sub> al 1 % (v/v).
- Solución estándar de 1000 mg/L (ppm) de Fe, preparada a partir de hierro metálico, para lo cual se disolvió 1,000 g, en 50 mL de HNO<sub>3</sub> (1+1). Diluyendo a un litro de solución con agua desionizada.
- Solución estándar de 1000 mg/L (ppm) de Zn, preparada a partir de zinc metálico, para lo cual se disolvió 0,500 g, en el mínimo volumen de HCl (1+1), Diluyendo a un litro de solución con HCl al 1 % (v/v).

- Se prepararon soluciones de trabajo 100 mL con 0,5; 1; 2; 3 y 4 mg/L para el cobre, mediante dilución del volumen apropiado de la solución de 1000 mg/L.
- Se prepararon soluciones de trabajo 100 mL con 1; 2; 3; 4 y 5 mg/L para el hierro, mediante dilución del volumen apropiado de la solución de 1000 mg/L.
- Se prepararon soluciones de trabajo 100 mL con 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mg/L para el zinc, mediante dilución del volumen apropiado de la solución de 1000 mg/L.

### III.3.3. Validación del método.

Una vez definidos los parámetros de partida del equipo y a partir de los estándares certificados de 1000 mg/L se prepararon las soluciones patrón, con cada uno de los tres metales (Cu, Fe y Zn) y sus respectivas curvas de calibración sencilla y adición estándar. Luego se procedió a validar las principales características analíticas del método (figuras de mérito), al evaluar la linealidad, el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto. Con los resultados obtenidos se determinó el “estadístico F” y el estadístico “t de student” para evaluar si hay o no diferencia significativa entre las pendientes de ambos métodos y con ello se descartó el efecto matriz, además se determinó el límite de detección, límite de cuantificación y el intervalo lineal para cada curva de calibración sencilla.

Se empleó el porcentaje de recuperación con el fin de evaluar la precisión y exactitud del método analítico utilizado, mediante la preparación de un pool de las muestras de miel, enriquecido para cobre, hierro y zinc realizando el estudio por separado, en tres puntos de cada curva, bajo, medio y alto, realizando 3 réplicas y analizándolas por triplicado, en las mismas condiciones operativas y el mismo día, evaluando así la variabilidad de método (repetibilidad). Para estudiar la variabilidad de los resultados (reproducibilidad del método) se aplicó la misma metodología durante 5 días, evaluando además el % DSR, obtenido a de las réplicas analizadas. Posteriormente, se realizó la medición de las muestras previamente tratadas con el método en cuestión, para determinar las concentraciones de los analitos presente en cada una de las muestras de miel. A continuación, se muestra los resultados obtenidos del análisis por Espectroscopia de Absorción Atómica en llama para cada uno de los metales analizados.

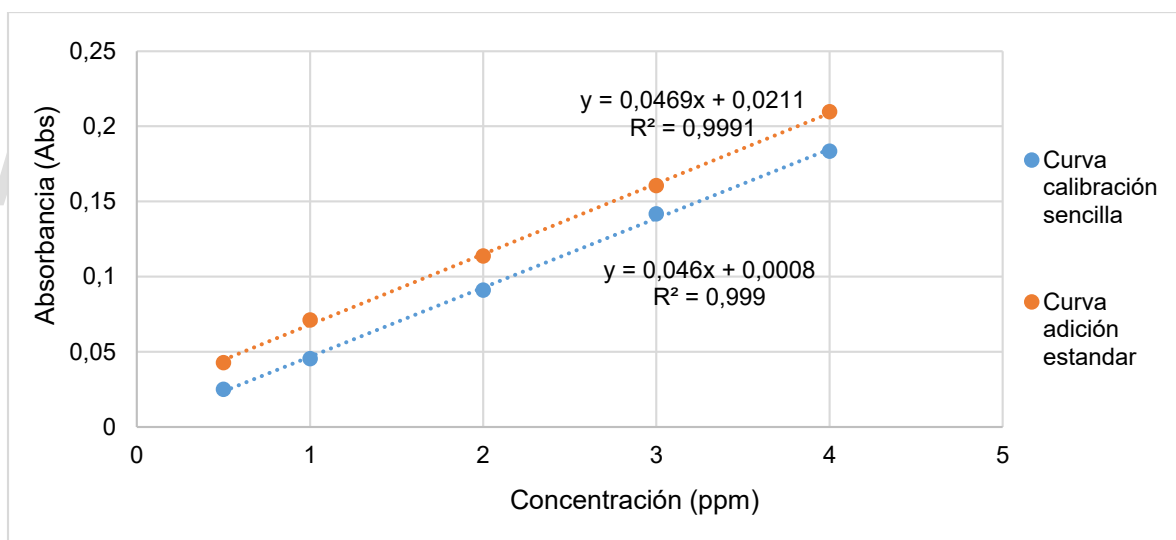
### III.3.3.1. Curva de calibración sencilla del Cu y de adición de estándar en un pool de las muestras de miel.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla empleada para la cuantificación del Cu y la curva de adición de estándar del Cu en un pool de las muestras de miel para corroborar la existencia o no del efecto matriz en la muestra.

**Tabla N° 23.** Resultados de la curva de calibración sencilla de Cu y la curva de adición de estándar de Cu para un pool de las muestras de miel.

Curva de calibración sencilla		Curva de adición estándar	
Pendiente (m)	(0,0460 ± 0,0008)	Pendiente (m)	(0,0469 ± 0,0008)
Corte (b)	(0,0008 ± 0,0021)	Corte (b)	(0,0211 ± 0,0020)
Coefficiente de Correlación lineal (R2)	0,9990	Coefficiente de Correlación lineal (R2)	0,9991

**Gráfica N° 9.** Curva de calibración sencilla del Cu vs. Curva de adición estándar del Cu en un pool de las muestras de miel.



### III.3.3.2 Estudio estadístico de la curva de calibración sencilla del Cu y de adición estándar en un pool de las muestras de miel.

Luego de aplicar el “estadístico F” (ecuación 15), para comparar las pendientes de las curvas de calibración sencilla y adición estándar, se encontró que el valor calculado para el estadístico F es 1,05 siendo menor que el valor tabulado para un contraste de dos colas (95% de confianza, Probabilidad 0,05),  $F_{4,3;15,10}$ ; por tanto, no hay diferencia significativa entre las varianzas y las variaciones respecto a 1 se deben a errores aleatorios. Al aplicar el “estadístico t” (ecuaciones 16

y 17), se tiene que el valor de “t” calculado: 1,75; es menor que el “t” tabulado, para 8 grados de libertad y un 95% de confianza: 2,31, por tanto, se acepta la hipótesis nula indicando que no existe diferencia significativa entre las pendientes evaluadas, asimismo se puede indicar que el método propuesto está libre de interferencias del tipo físico y químico por parte de la matriz.

En la Tabla N° 24, se muestran los resultados de las figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Cu, empleada para la cuantificación de este en las muestras de miel, las cuales se determinaron a partir de la ecuación 18 y ecuación 19, y consultando el manual para el equipo Perkin Elmer.<sup>82</sup>

**Tabla N° 24.** Figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Cu.

Límite de detección (LOD)	Límite de cuantificación (LOC)	Intervalo Lineal
0,05 mg/L.	0,2 mg/L.	0,2 mg/L – 5,0 mg/L.

### III.3.3.3. Precisión y exactitud de método para cuantificar Cu en miel.

Se estudió la variabilidad del método (reproducibilidad), efectuando el análisis de porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,5; 2,0 y 4,0 mg/L de cobre en un pool de las muestras de miel evaluados por triplicado, en las mismas condiciones operativas y el mismo día, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla N° 25, que sigue a continuación, donde los porcentajes de recuperación promedio del cobre en un pool de las muestras de miel, se encuentra entre el  $(96,6 \pm 2) \%$  y  $(104,0 \pm 0,4) \%$ , por lo que el método empleado para la cuantificación del cobre en miel, presenta buena exactitud, puesto que, los valores obtenidos en las réplicas estudiadas, se encuentran dentro del intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Adicional a esto se pueden observar el % DSR, varían del 2 % al 4 %, los mismos son menores al 5 %, obteniendo como resultado una buena repetibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del hierro en miel es óptimo.

**Tabla N° 25.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,5; 2,0 y 4,0 mg/L de cobre en un pool de las muestras de miel evaluados por triplicado.

Concentración (ppb)	% Réplica 1	% Réplica 2	% Réplica 3	Promedio %	%RDS
0,5	$(96,8 \pm 0,1)$	$(96,4 \pm 0,1)$	$(96,7 \pm 0,1)$	$(96,6 \pm 0,2)$	2
2,0	$(103,4 \pm 0,1)$	$(104,3 \pm 0,1)$	$(104,2 \pm 0,1)$	$(104,0 \pm 0,4)$	4
4,0	$(98,6 \pm 0,1)$	$(98,3 \pm 0,3)$	$(98,0 \pm 0,1)$	$(98,3 \pm 0,3)$	3

Luego de estudiar variabilidad en los resultados (reproducibilidad del método), utilizando el porcentaje de recuperación para las concentraciones 0,5; 2 y 4 mg/L del Cu en un pool de las muestras de miel, evaluados por 5 días, se obtuvo como resultado mostrados en la Tabla N° 26, que se presenta a continuación, donde los porcentajes de recuperación promedio del Cu, se encuentran entre el  $(98,0 \pm 0,3) \%$  y  $(103,8 \pm 0,4) \%$ , por lo que el método que se está utilizando para la cuantificación del cobre en miel presenta buena exactitud, encenrándose entre el intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Además, se pueden observar que los % DSR son del 2 % al 4 %, siendo menor al 5 %, obteniendo como resultado una buena reproducibilidad, por tanto, el método empleado para la cuantificación del cobre en miel es óptimo.

**Tabla N° 26.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,5; 2 y 4 mg/L del Cu en un pool de las muestras de miel, evaluados por 5 días.

Concentración (ppb)	% Réplica Día 1	% Réplica Día 2	% Réplica Día 3	% Réplica Día 4	% Réplica Día 5	% Promedio	% RDS
0,5	$(97,4 \pm 0,1)$	$(98,3 \pm 0,1)$	$(98,0 \pm 0,1)$	$(98,3 \pm 0,1)$	$(97,9 \pm 0,1)$	$(98,0 \pm 0,3)$	2
2,0	$(103,2 \pm 0,1)$	$(103,6 \pm 0,2)$	$(104,2 \pm 0,1)$	$(103,7 \pm 0,1)$	$(104,3 \pm 0,1)$	$(103,8 \pm 0,4)$	3
4,0	$(101,7 \pm 0,2)$	$(102,4 \pm 0,2)$	$(102,3 \pm 0,2)$	$(101,8 \pm 0,1)$	$(102,6 \pm 0,1)$	$(102,2 \pm 0,4)$	3

#### III.3.3.4. Determinación del contenido de cobre en las muestras de miel del Estado Mérida.

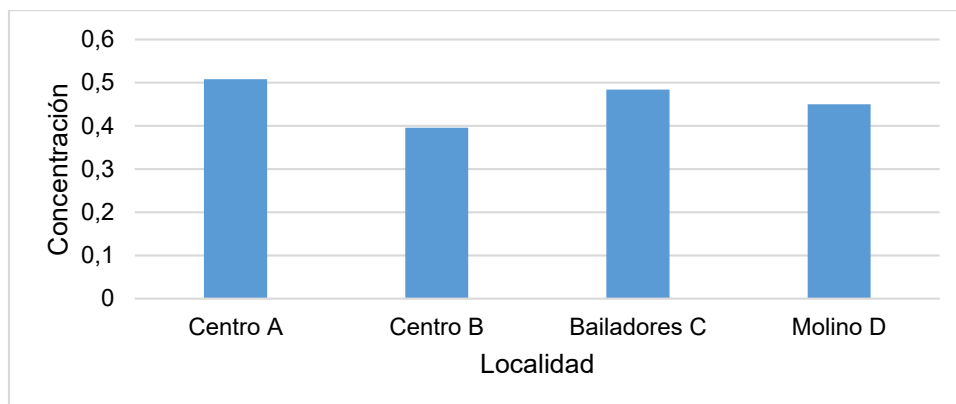
Una vez validado el método para determinación cobre en miel, se procedió a la cuantificación del Cu en cada una de las muestras. A continuación, se presenta la Tabla N° 27, donde se muestra las concentraciones de cobre en cada una de las muestras recolectadas en el Estado Mérida, estas encuentran entre el  $(0,33 \pm 0,02) \text{ mg/L}$  y  $(0,57 \pm 0,02) \text{ mg/L}$ .

**Tabla N° 27.** Resultados obtenidos para el cobre presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.

Muestra	Replica 1 (mg/L)	Replica 2 (mg/L)	Replica 3 (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	0,59	0,53	0,55	<b>(0,56 ± 0,03)</b>
2	0,48	0,44	0,46	<b>(0,46 ± 0,02)</b>
3	0,48	0,42	0,40	<b>(0,43 ± 0,04)</b>
4	0,33	0,37	0,31	<b>(0,34 ± 0,03)</b>
5	0,42	0,40	0,44	<b>(0,42 ± 0,02)</b>
6	0,57	0,53	0,55	<b>(0,55 ± 0,02)</b>
7	0,33	0,35	0,31	<b>(0,33 ± 0,02)</b>
8	0,46	0,42	0,46	<b>(0,45 ± 0,02)</b>
9	0,55	0,59	0,57	<b>(0,57 ± 0,02)</b>
10	0,50	0,55	0,53	<b>(0,53 ± 0,02)</b>
11	0,46	0,42	0,46	<b>(0,45 ± 0,02)</b>
12	0,48	0,46	0,42	<b>(0,45 ± 0,03)</b>

Con el fin de estudiar si hay o no diferencia significativa en los valores encontrados en cada localidad, al igual que con el selenio, se realizó un estudio, empleando la estadística básica para evaluar si había diferencia entre las concentraciones de Cu, como el estadístico F y el estadístico t de student, para ello, se subdividió las muestras provenientes del centro de la ciudad en dos grupos de acuerdo a la procedencia de las casas apícolas, el grupo A corresponde a las 2 primeras muestras y el grupo B corresponde a las 3 últimas muestras del Centro de Mérida, las 5 muestra procedentes de Bailadores corresponden al grupo C y las muestras procedente del Molino corresponden al grupo D, mostrados en la Gráfica N° 10, que sigue a continuación.

**Gráfica N° 10.** Concentración de Cu Vs. Localidad.



Luego de realizar estas pruebas, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de Cu en las distintas localidades.



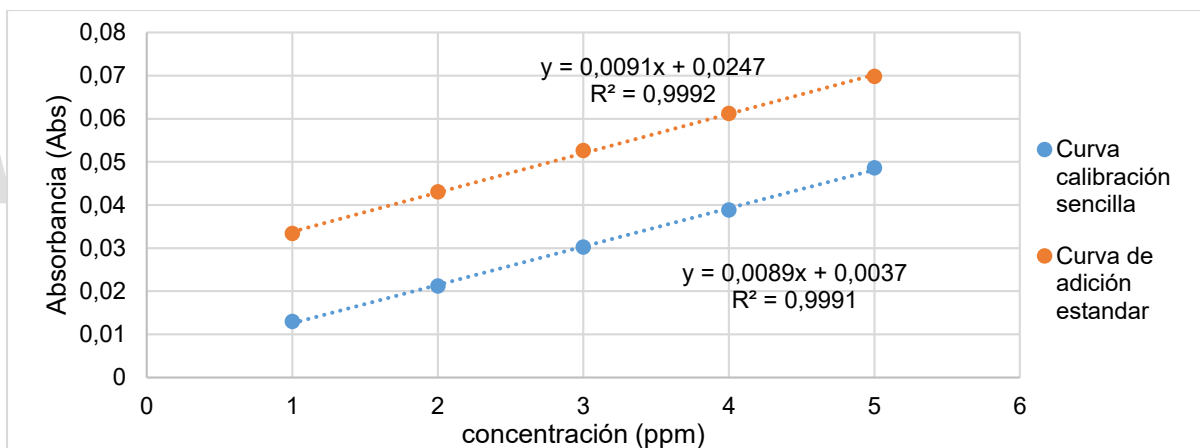
### III.3.4.1. Curva de calibración sencilla del Fe y de adición de estándar en un pool de las muestras de miel.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla empleada para la cuantificación del Fe y la curva de adición de estándar del Fe en un pool de las muestras de miel para comprobar la existencia o no del efecto matriz en la muestra.

**Tabla N° 28.** Resultados de la curva de calibración sencilla del Fe y la curva de adición de estándar del Fe para un pool de las muestras de miel.

Curva de calibración sencilla		Curva de adición estándar	
Pendiente (m)	(0,0089 ± 0,0002)	Pendiente (m)	(0,0091 ± 0,0002)
Corte (b)	(0,0037 ± 0,0005)	Corte (b)	(0,0247 ± 0,0005)
Coefficiente de Correlación lineal (R <sup>2</sup> )	0,9991	Coefficiente de Correlación lineal (R <sup>2</sup> )	0,9992

**Gráfica N° 11.** Curva de calibración sencilla del Fe vs. Curva de adición estándar de Fe en un pool de las muestras de miel.



### III.3.4.2. Estudio estadístico de la curva de calibración sencilla del Fe y de adición estándar del Fe en un pool de las muestras de miel.

Luego de aplicar el “estadístico F” (ecuación 15), para comparar las pendientes de las curvas de calibración sencilla y adición estándar, se encontró que el valor calculado para el estadístico F es 1,02 siendo menor que el valor tabulado para un contraste de dos colas (95 % de confianza, Probabilidad 0,05),  $F_{4,3;15,10}$ ; por tanto, no hay diferencia significativa entre las varianzas. Al aplicar el “estadístico t” (ecuación 16 y 17) se tiene que el valor de “t” calculado: 2,29; es menor que el “t” tabulado, para 8 grados de libertad y un 95 % de confianza: 2,31, por tanto, se acepta la hipótesis nula indicando que no existe diferencia significativa entre las pendientes evaluadas,

asimismo se puede indicar que el método propuesto está libre de interferencias del tipo físico y químico por parte de la matriz.

En la Tabla N° 29, se muestran los resultados para las figuras de mérito principales, de la curva de calibración sencilla del Fe, empleada para la cuantificación de este en las muestras de miel, las cuales se determinaron a partir de la ecuación 18 y ecuación 19, y consultando el manual para el equipo Perkin Elmer.<sup>82</sup>

**Tabla N° 29.** Figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Fe.

Límite de detección (LOD)	Límite de cuantificación (LOC)	Intervalo Lineal
0,3 mg/L.	0,9 mg/L.	0,9 mg/L – 5mg/L.

### III.3.4.3. Precisión y exactitud de método para cuantificar Fe en miel.

Posterior al estudio de la repetibilidad del método, efectuando el análisis de porcentajes de recuperación para las concentraciones 1,0; 3 y 5 mg/L de Fe, en un pool de las muestras de miel, evaluados por triplicado, en las mismas condiciones operativas y el mismo día, se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla N° 30, que se presenta a continuación, donde los porcentajes de recuperación promedio se encuentra entre el  $(94,9 \pm 0,2) \%$  y  $(105,6 \pm 0,2) \%$ , por lo que el método empleado para la cuantificación del hierro presenta buena exactitud, puesto que los porcentajes de recuperación en las diferentes réplicas estudiadas, están dentro del intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Adicional a esto se pueden observar el % DSR, varían del 2 % al 4 %, los mismos son menores al 5 %, obteniendo una buena repetibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del hierro en miel es óptimo.

**Tabla N° 30.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 1,0; 3 y 5 mg/L de Fe en un pool de las muestras de miel, evaluados por triplicado.

Concentración (ppb)	% Réplica 1	% Réplica 2	% Réplica 3	Promedio %	%RDS
1,0	$(101,8 \pm 0,1)$	$(100,9 \pm 0,1)$	$(101,6 \pm 0,1)$	$(101,5 \pm 0,4)$	4
3,0	$(105,4 \pm 0,1)$	$(105,7 \pm 0,2)$	$(105,8 \pm 0,1)$	$(105,6 \pm 0,2)$	2
5,0	$(95,2 \pm 0,1)$	$(94,8 \pm 0,1)$	$(94,8 \pm 0,1)$	$(94,9 \pm 0,2)$	2

Luego de estudiar variabilidad de los resultados (reproducibilidad del método), utilizando el porcentaje de recuperación para las concentraciones 1; 3 y 5 mg/L del Fe en un pool de las muestras de miel, evaluados por 5 días, se encontraron los resultados mostrados en la Tabla N° 31, que se muestra a continuación, donde se puede observar que los porcentajes de recuperación

promedio se encuentran entre el  $(95,2 \pm 0,5) \%$  y  $(105,0 \pm 0,4) \%$ , por lo que el método que se está utilizando para la cuantificación del Fe en miel presenta buena exactitud, encontrando estos resultados en el intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Además, se pueden observar que los % DSR se encuentra entre el 3 % y el 4 %, siendo menor al 5 %, cuyo resultado tiene una buena reproducibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del hierro en miel es óptimo.

**Tabla N° 31.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 1; 3 y 5 mg/L del Fe en un pool de las muestras de miel, evaluado por 5 días.

Concentración (ppb)	% Réplica Día 1	% Réplica Día 2	% Réplica Día 3	% Réplica Día 4	% Réplica Día 5	% Promedio	% RDS
1,0	$(94,5 \pm 0,1)$	$(95,4 \pm 0,1)$	$(94,7 \pm 0,1)$	$(95,5 \pm 0,1)$	$(95,7 \pm 0,2)$	$(95,2 \pm 0,5)$	3
3,0	$(104,7 \pm 0,1)$	$(105,5 \pm 0,2)$	$(104,6 \pm 0,1)$	$(105,5 \pm 0,2)$	$(104,7 \pm 0,3)$	$(105,0 \pm 0,4)$	3
5,0	$(98,4 \pm 0,2)$	$(96,8 \pm 0,1)$	$(97,5 \pm 0,3)$	$(96,7 \pm 0,3)$	$(97,2 \pm 0,4)$	$(97,3 \pm 0,7)$	4

#### III.3.4.4. Determinación del contenido de hierro en las muestras de miel del Estado

##### Mérida.

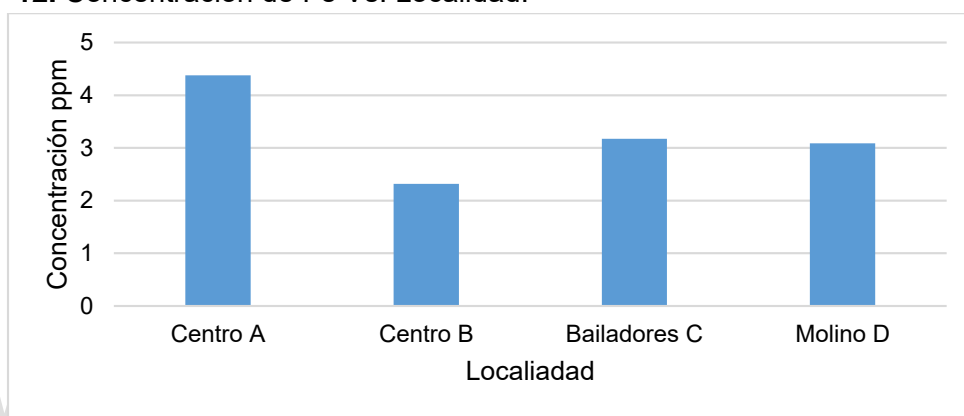
En la siguiente tabla N° 32, se muestran los resultados de las concentraciones de hierro en cada una de las muestras recolectadas en el Estado Mérida, estas encuentran entre  $(2,3 \pm 0,1)$  mg/L y  $(4,5 \pm 0,2)$  mg/L.

**Tabla N° 32.** Resultados obtenidos para el hierro presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.

Muestra	Replica 1 (mg/L)	Replica 2 (mg/L)	Replica 3 (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	4,1	4,5	4,3	$(4,3 \pm 0,2)$
2	4,8	4,4	4,2	$(4,5 \pm 0,2)$
3	1,8	2,1	1,9	$(1,9 \pm 0,1)$
4	2,6	2,7	2,8	$(2,7 \pm 0,1)$
5	2,4	2,3	2,2	$(2,3 \pm 0,1)$
6	3,6	4,0	3,3	$(3,6 \pm 0,3)$
7	2,8	3,0	2,7	$(2,8 \pm 0,1)$
8	2,6	3,0	2,4	$(2,7 \pm 0,2)$
9	3,0	2,7	3,1	$(2,9 \pm 0,1)$
10	3,9	4,0	3,6	$(3,8 \pm 0,1)$
11	3,3	3,6	4,0	$(3,6 \pm 0,3)$
12	2,6	2,7	2,3	$(2,5 \pm 0,2)$

Para estudiar si hay o no diferencia significativa en los valores encontrados en cada localidad, al igual que con el selenio y el cobre, se realizó un estudio, empleando la estadística básica para evaluar si había diferencia entre las concentraciones de Fe, como el estadístico F y el estadístico t de student, para ello, se emplearon os grupos realizados en los metales anteriores, donde el grupo A corresponde a las 2 primeras muestras y el grupo B corresponde a las 3 últimas muestras del Centro de Mérida, las 5 muestra procedentes de Bailadores corresponden al grupo C y las muestras procedentes del Molino corresponden al grupo D, mostrados en la siguiente Gráfica N° 12.

**Gráfica N° 12.** Concentración de Fe Vs. Localidad.



Luego de realizar estas pruebas y al comparar todas las posibles combinaciones entre los grupos, Tabla N° 33 que se presenta a continuación, se encontró que solo las combinaciones (A y B); (B y C), presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de hierro. Si bien se puede relacionar al clima y su biodisponibilidad en el ambiente, en especial en las plantas visitadas por las abejas en el proceso de recolección del néctar, que pueden absorber en mayor o menor cantidad el hierro, también se debe tener presente el manejo de utensilios a base de hierro en el proceso de cosecha.

**Tabla N° 33.** Resultados de la evaluación de la concentración de Fe respecto a cada localidad.

Combinación	Resultados
<b>A y B</b>	Si hay diferencia significativa
A y C	No hay diferencia significativa
A y D	No hay diferencia significativa
<b>B y C</b>	Si hay diferencia significativa
B y D	No hay diferencia significativa
A y D	No hay diferencia significativa

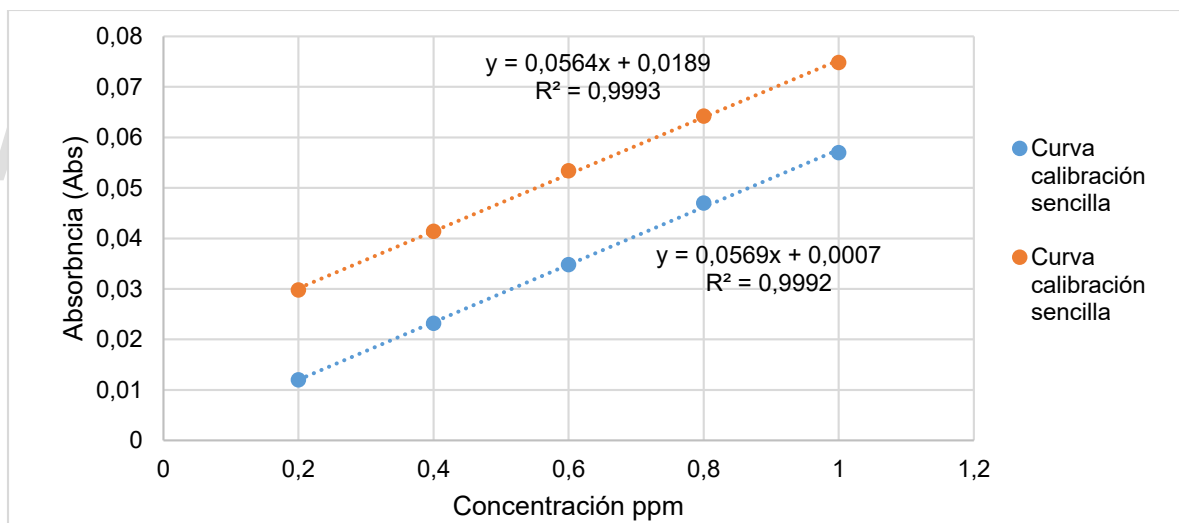
### III.3.5.1. Curva de calibración sencilla del Zn y de adición de estándar en un pool de las muestras de miel.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla empleada para la cuantificación del Zn y la curva de adición de estándar del Zn en un pool de las muestras de miel para corroborar la existencia o no del efecto matriz en la muestra.

**Tabla N° 34.** Resultados de la curva de calibración sencilla del Zn y la curva de adición de estándar de Zn en un pool de las muestras de miel.

Curva de calibración sencilla		Curva de adición estándar	
Pendiente (m)	(0,0569 ± 0,0009)	Pendiente (m)	(0,0564 ± 0,0008)
Corte (b)	(0,0007 ± 0,0006)	Corte (b)	(0,0189 ± 0,0006)
Coefficiente de Correlación lineal (R <sup>2</sup> )	0,9992	Coefficiente de Correlación lineal (R <sup>2</sup> )	0,9993

**Gráfica N° 13.** Curva de calibración sencilla del Zn vs. Curva de adición estándar del Zn en un pool de las muestras de miel.



### III.3.5.2. Estudio estadístico de la curva de calibración sencilla del Zn y de adición estándar del Zn un pool de las muestras de miel.

Luego de aplicar el “estadístico F” (ecuación 15), para comparar las pendientes de las curvas de calibración sencilla y adición estándar, se encontró que el valor calculado para el estadístico F es 1,20 siendo menor que el valor tabulado para un contraste de dos colas (95 % de confianza, Probabilidad 0,05),  $F_{4,3;15,10}$ ; por tanto, no hay diferencia significativa entre las varianzas y las variaciones respecto a 1 se deben a errores aleatorios. Al aplicar el “estadístico t” (ecuación 16 y

17), se tiene que el valor de “t” calculado: 0,89; es menor que el “t” tabulado, para 8 grados de libertad y un 95 % de confianza: 2,31; por tanto, se acepta la hipótesis nula indicando que no existe diferencia significativa entre las pendientes evaluadas, asimismo se puede indicar que el método propuesto está libre de interferencias del tipo físico y químico por parte de la matriz.

En la Tabla N° 35, se muestran los resultados para las figuras de mérito principales, de la curva de calibración sencilla del Zn, empleada para la cuantificación de este en las muestras de miel, las cuales se determinaron a partir de la ecuación 18 y ecuación 19, y consultando el manual para el equipo Perkin Elmer.<sup>82</sup>

**Tabla N° 35.** Figuras de mérito para la curva de calibración sencilla del Zn.

Límite de detección (LOD)	Límite de cuantificación (LOC)	Intervalo Lineal
0,04 mg/L.	0,1 mg/L.	0,1 mg/L – 1,0mg/L.

### III.3.5.3. Precisión y exactitud del método para cuantificar Zn en miel.

Una vez estudiada la repetibilidad del método, realizando el análisis de porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,2; 0,6 y 1,0 mg/L del zinc, en un pool de las muestras de miel, evaluados por triplicado, en las mismas condiciones operativas y el mismo día, se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla N° 36, que se presenta continuación, donde los porcentajes de recuperación promedio del zinc, se encuentra entre el  $(97,6 \pm 0,2) \%$  y  $(104,1 \pm 0,2) \%$ , por lo que el método empleado para la cuantificación del zinc en miel tiene buena exactitud, puesto que, los resultados obtenidos para los porcentajes de recuperación, se encuentran entre el intervalo aceptable para este estudio. Además, el % DSR, se encuentra entre el 2 % y 3 %, siendo menor al 5 %, obteniendo una buena repetibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del zinc en miel es óptimo.

**Tabla N° 36.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,2; 0,6 y 1,0 mg/L del zinc, en un pool de las muestras de miel, evaluados por triplicado.

Concentración (ppb)	% Réplica 1	% Réplica 2	% Réplica 3	Promedio %	%RDS
0,2	$(97,8 \pm 0,1)$	$(97,3 \pm 0,1)$	$(97,6 \pm 0,1)$	$(97,6 \pm 0,2)$	2
0,6	$(103,2 \pm 0,1)$	$(102,6 \pm 0,1)$	$(102,8 \pm 0,1)$	$(102,9 \pm 0,3)$	3
1	$(104,2 \pm 0,1)$	$(103,8 \pm 0,1)$	$(104,3 \pm 0,1)$	$(104,1 \pm 0,2)$	2

Los resultados tras la evaluación de la reproducibilidad del método, utilizando porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,2; 0,6 y 1,0 mg/L del zinc en un pool de las muestras de

miel, evaluado por 5 días, mostrados en la Tabla N° 37, que sigue a continuación, se encuentran entre el  $(96,8 \pm 0,6) \%$  y  $(105,2 \pm 0,5) \%$ , estos indican que el método que se está utilizando para la cuantificación del zinc en miel presenta buena exactitud, encontrándose entre el intervalo aceptable para los estudios de recuperación. Así mismo, se pueden observar que los % DSR se encuentra entre el 3 % al 4 %, siendo menor al 5 %, obteniendo una buena reproducibilidad, comprobando que el método empleado para la cuantificación del zinc en miel es óptimo.

**Tabla N° 37.** Porcentajes de recuperación para las concentraciones 0,2; 0,6 y 1,0 mg/L del zinc en un pool de las muestras de miel, evaluado por 5 días.

Concentración (ppm)	% Réplica Día 1	% Réplica Día 2	% Réplica Día 3	% Réplica Día 4	% Réplica Día 5	% Promedio	% RDS
0,2	$(96,5 \pm 0,1)$	$(97,4 \pm 0,3)$	$(96,4 \pm 0,2)$	$(96,3 \pm 0,2)$	$(97,6 \pm 0,2)$	$(96,8 \pm 0,6)$	4
0,6	$(105,5 \pm 0,1)$	$(104,5 \pm 0,3)$	$(105,4 \pm 0,1)$	$(104,8 \pm 0,1)$	$(105,5 \pm 0,2)$	$(105,2 \pm 0,5)$	3
1	$(102,0 \pm 0,2)$	$(101,8 \pm 0,1)$	$(103,2 \pm 0,1)$	$(102,7 \pm 0,2)$	$(101,8 \pm 0,1)$	$(102,3 \pm 0,6)$	4

#### III.3.5.4. Determinación del contenido de zinc en las muestras de miel del Estado

##### Mérida.

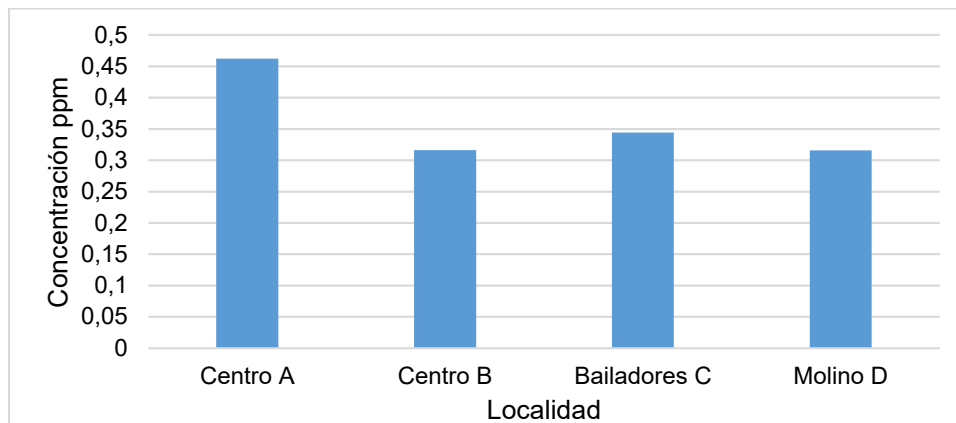
En los resultados de la Tabla N° 38, que se presenta a continuación, se muestra las concentraciones del zinc en cada una de las muestras recolectadas en el Estado Mérida, estas encuentran entre el  $(0,25 \pm 0,01) \text{ mg/L}$  y  $(0,51 \pm 0,01) \text{ mg/L}$ .

**Tabla N° 38.** Resultados obtenidos para el zinc presente en las muestras de miel recolectadas en el estado Mérida.

Muestra	Replica 1 (mg/L)	Replica 2 (mg/L)	Replica 3 (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	0,41	0,43	0,41	$(0,42 \pm 0,01)$
2	0,51	0,50	0,51	$(0,51 \pm 0,01)$
3	0,29	0,30	0,28	$(0,29 \pm 0,01)$
4	0,36	0,39	0,37	$(0,37 \pm 0,01)$
5	0,30	0,27	0,29	$(0,29 \pm 0,01)$
6	0,30	0,32	0,31	$(0,31 \pm 0,01)$
7	0,27	0,32	0,28	$(0,29 \pm 0,02)$
8	0,48	0,46	0,46	$(0,47 \pm 0,01)$
9	0,37	0,43	0,40	$(0,40 \pm 0,02)$
10	0,23	0,27	0,25	$(0,25 \pm 0,01)$
11	0,27	0,23	0,25	$(0,25 \pm 0,01)$
12	0,36	0,39	0,39	$(0,38 \pm 0,02)$

Luego de este estudio, nuevamente se aplicó el estadístico F y el estadístico t de Student para estudiar si hay o no diferencia significativa en los valores de concentración de zinc encontrados en cada localidad, para ello se utilizó la misma comparación de grupos pero con las concentraciones de zinc, donde el grupo A corresponde a las 2 primeras muestras y el grupo B corresponde a las 3 últimas muestras de las casas apícolas del Centro de Mérida; las 5 muestra procedentes de Bailadores corresponden al grupo C y las muestras procedente del Molino corresponden al grupo D, Mostrados en la Gráfica N° 14, que sigue a continuación.

**Gráfica N° 14.** Concentración de Zn Vs. Localidad.



Luego de realizar estas pruebas, no se encontró diferencias significativas entre las concentraciones de zinc en las distintas localidades.



### III.4. Análisis fisicoquímico.

Todas las muestras recolectadas se caracterizaron desde el punto de vista fisicoquímico, para lo cual se determinó el pH, conductividad eléctrica, el índice de refracción, el % de humedad (método indirecto) y grados brix.

#### III.4.1. pH.

Metodología: Las muestras de miel se homogeneizan. Luego se pesa 1 g de miel en un vaso de precipitados de 25 mL limpio y seco, disolviendo con porciones de agua desionizada. Se trasvasan cuantitativamente a un matraz de 10 mL, completando el volumen con agua desionizada. Para las determinaciones se utilizó un phmetro SPER SCIENTIFIC BENCHTOP pH-mV Meter - 0 to 14 pH Range phmetro. Previo a las mediciones, se calibra utilizando soluciones reguladoras comerciales, una de pH 7 y otra de pH 4. Entonces, se trasvasa una alícuota de la solución preparada de la muestra a un vaso de precipitado, donde se sumerge el electrodo y se lee el pH una vez estabilizado el valor.<sup>85</sup> A continuación se presenta la Tabla N° 39, con los resultados obtenidos de este estudio.

**Tabla N° 39.** pH de las muestras de miel.

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3	pH promedio
1	3,75	3,77	3,79	(3,77 ± 0,02)
2	4	4,02	4,01	(4,01 ± 0,01)
3	3,62	3,64	3,67	(3,64 ± 0,02)
4	3,96	3,98	3,98	(3,97 ± 0,01)
5	3,48	3,53	3,51	(3,51 ± 0,02)
6	4,13	4,09	4,14	(4,12 ± 0,02)
7	3,52	3,54	3,57	(3,54 ± 0,02)
8	3,91	3,94	3,95	(3,93 ± 0,02)
9	4,16	4,18	4,16	(4,17 ± 0,01)
10	3,91	3,9	3,95	(3,92 ± 0,02)
11	3,94	4,01	4	(3,98 ± 0,03)
12	3,9	3,91	3,93	(3,91 ± 0,01)

El pH es un parámetro que se debe evaluar durante la obtención y almacenamiento de los alimentos por su influencia sobre el desarrollo de microorganismos y enzimas. Éste además afecta las propiedades físicas del producto como la textura, estabilidad y resistencia. Los resultados obtenidos para la medición del pH de las muestras de miel Tabla N° 39, posee valores

en el intervalo comprendido entre  $(3,51 \pm 0,02)$  y  $(4,17 \pm 0,01)$ . Según Suescún y Vit (2008), el pH de las mieles debe estar entre 3,0 y 4,5; debido a la presencia de ácidos orgánicos,<sup>92</sup> por lo que las mieles recolectadas en las distintas localidades del Estado Mérida se encuentran en el intervalo establecido para estas, contribuyendo a la conservación y estabilidad de la misma, ante el ataque microbiano, además estos resultados son un indicativo de que las mieles son del néctar de flores, de acuerdo a la referencia citada en la Tabla N° 7, capítulo I, donde el pH de la miel de flores está comprendido entre 3,5 y 4,5.<sup>66</sup>

#### **III.4.1.1. Comparación entre las concentraciones de los metales y el pH de las muestras de miel, empleando el coeficiente de correlación de Pearson.**

El coeficiente de correlación de Pearson, es una prueba estadística que mide la relación lineal que existe entre las variables cuantitativas continuas. Si la asociación entre los elementos no es lineal, entonces el coeficiente no se encuentra representado adecuadamente. El coeficiente de correlación de Pearson puede tomar un rango de valores de +1 a -1. Un valor de 0 indica que no hay asociación entre las variables. Un valor mayor a 0 indica una asociación positiva. Es decir, a medida que aumenta el valor de una variable, también lo hace el valor de la otra. Un valor menor que 0 indica una asociación negativa; es decir, a medida que aumenta el valor de una variable, el valor de la otra disminuye. El coeficiente de correlación de Pearson viene definido por la siguiente expresión:

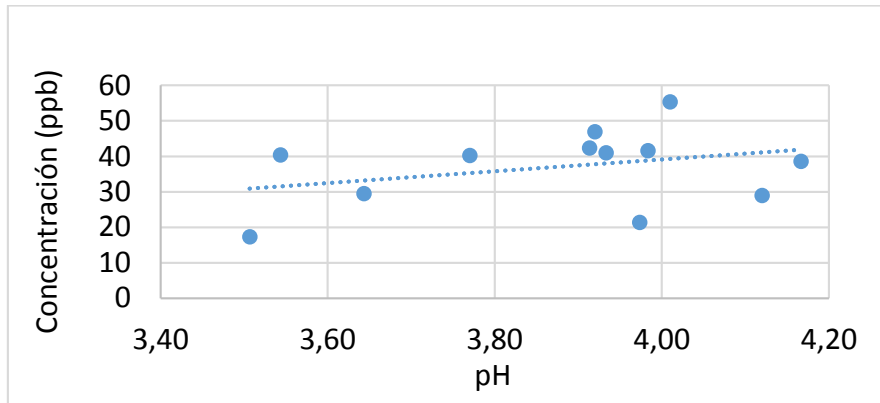
$$r_{xy} = \frac{\sum Z_x Z_y}{N} \quad \text{Ecuación (21)}$$

Esto es, el coeficiente de correlación de Pearson hace referencia a la media de los productos cruzados de las puntuaciones estandarizadas de X y de Y, donde “x” es igual a la variable número uno, “y” pertenece a la variable número dos, “zx” es la desviación estándar de la variable uno, “zy” es la desviación estándar de la variable dos y “N” es número de datos.<sup>93</sup>

Empleando el coeficiente de correlación de Pearson, ecuación (21), se compara a continuación las concentraciones de cada uno de los metales evaluados en las mieles, respecto a los valores obtenidos para el pH de las muestras de miel.

En la Gráfica N° 15 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Se en las muestras de miel respecto al pH, cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,3303, este valor a pesar de ser positivo se encuentra por debajo de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva débil entre las concentraciones de Se y el pH en las muestras de miel.

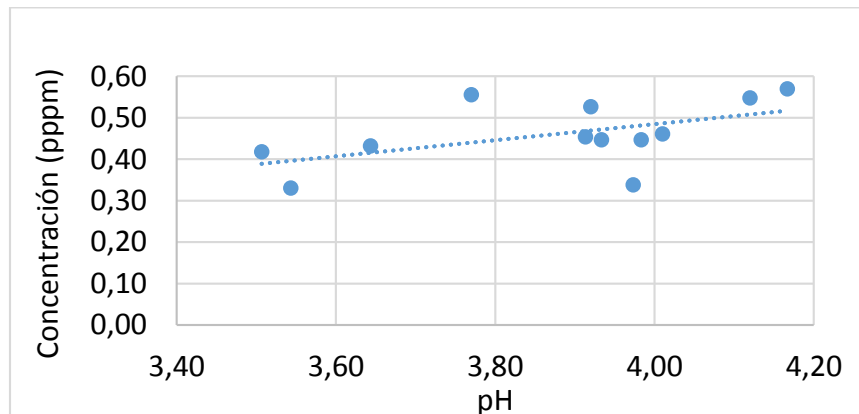
**Gráfica N° 15.** Concentración de Se Vs. pH.



Coeficiente de correlación de Pearson: 0,3303.

En la Gráfica N° 16 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Cu en las muestras de miel respecto al pH, cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,5267, este valor positivo se encuentra por arriba de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva moderada o media entre las concentraciones de Cu y el pH en las muestras de miel.

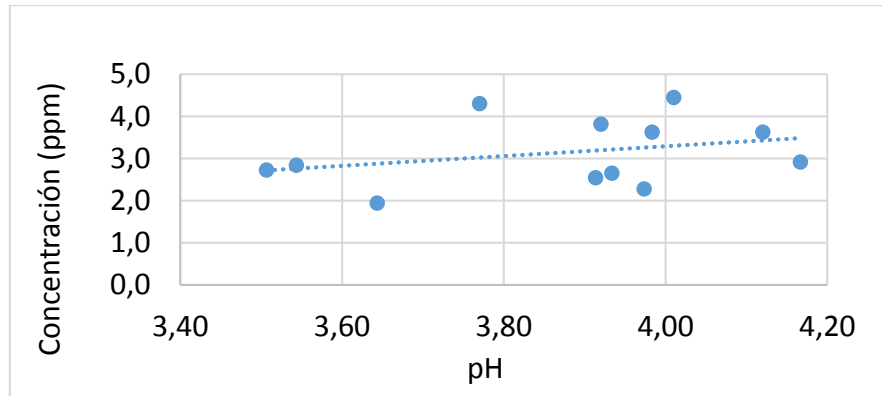
**Gráfica N° 16.** Concentración de Cu Vs. pH.



Coeficiente de correlación de Pearson: 0,5267.

En la Gráfica N° 17 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Fe en las muestras de miel respecto al pH, cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,3101, este valor positivo al igual que en el caso del Se, se encuentra por debajo de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva débil entre las concentraciones de Fe y el pH en las muestras de miel.

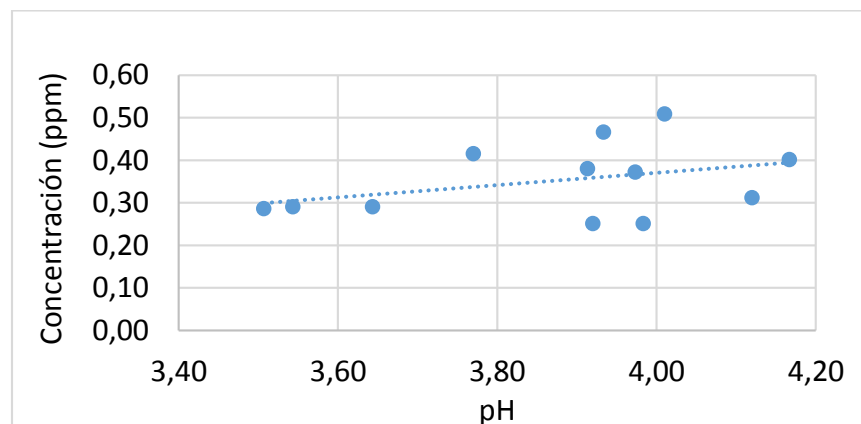
**Gráfica N° 17.** Concentración de Fe Vs. pH.



Coeficiente de correlación de Pearson: 0,3101.

En la Gráfica N° 18 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Zn en las muestras de miel respecto al pH, cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,3630, este valor positivo al igual que en el caso del Se y el Fe, se encuentra por debajo de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva débil entre las concentraciones de Zn y el pH en las muestras de miel.

**Gráfica N° 18.** Concentración de Zn Vs. pH.



Coeficiente de correlación de Pearson: 0,3630.

### III.4.2. Conductividad eléctrica.

Metodología: las muestras de miel se homogenizan. Luego se pesa 2 g de miel en un Erlenmeyer de 25 mL limpio y seco y se disolvieron con porciones de agua. Se trasvasan cuantitativamente a matraz de 10 mL, completando el volumen con agua destilada. Para las mediciones se utilizó un conductímetro Benchtop Conductivity Meter, el cual se calibra antes de su empleo. Luego de enjuagar cuidadosamente los electrodos con solución de la muestra correspondiente, se determinó la conductividad introduciendo el electrodo en un vaso de precipitado conteniendo la solución preparada de la muestra, leyendo el valor de conductividad una vez estabilizado el valor.<sup>85</sup> En la Tabla N° 40, se presenta los resultados para este estudio.

**Tabla N° 40.** Conductividad de las muestras de miel.

Muestra	Replica 1 ( $\mu\text{S}$ )	Replica 2 ( $\mu\text{S}$ )	Replica 3 ( $\mu\text{S}$ )	Promedio ( $\mu\text{S}$ )
1	396	401	403	(400 $\pm$ 3)
2	443	441	444	(443 $\pm$ 1)
3	225	228	227	(227 $\pm$ 1)
4	429	428	427	(428 $\pm$ 1)
5	278	277	277	(277 $\pm$ 1)
6	272	273	268	(271 $\pm$ 2)
7	301	301	303	(302 $\pm$ 1)
8	416	420	425	(420 $\pm$ 4)
9	255	259	259	(258 $\pm$ 2)
10	489	484	483	(485 $\pm$ 3)
11	286	293	289	(289 $\pm$ 3)
12	508	516	509	(511 $\pm$ 4)

El valor de conductividad de la miel puede ser útil para diferenciar el origen de una muestra de miel, de néctar o de mielada. En términos generales, las mieles de néctar poseen valores de conductividad inferior a 0,8 mS/cm, mientras que las mieles de mielada presentan valores superiores a dicho número. Los reglamentos en Venezuela, argentino y MERCOSUR no legislan los valores de conductividad en miel. Pero sí lo hace la Norma del CODEX para la miel. Rev.2001 y la Unión Europea (Directiva 2001/110/CE), que exigen no más de 0,8 mS/cm para las mieles de flores y no menos de 0,8 mS/cm para miel de mielada, castaño, y mezclas de las mismas.<sup>66</sup>

Los resultados obtenidos para la determinación de conductividad en las muestras de miel Tabla N° 40, se encuentran entre (227  $\pm$  1)  $\mu\text{S}$  y (511  $\pm$  4)  $\mu\text{S}$ , por lo que las muestras recolectadas en estas localidades del Estado Mérida, se originaron a partir del néctar de las flores, puesto que

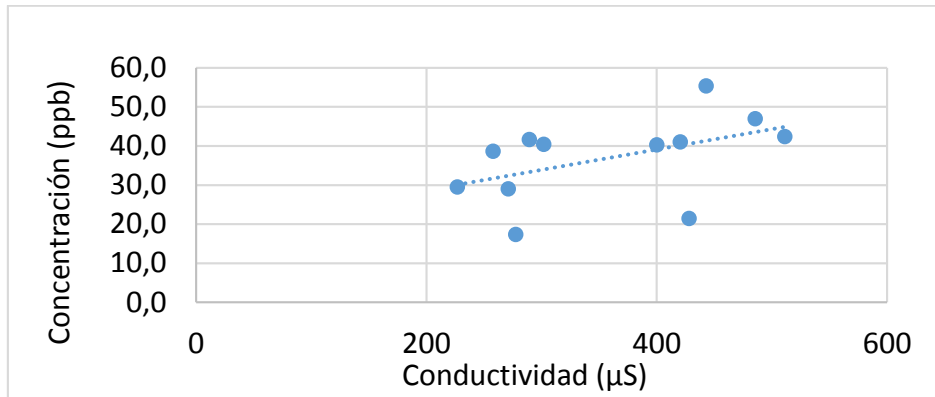
se encuentran por debajo de los 800  $\mu\text{S}$  o 0,8 mS. Las muestras con los valores más elevados de conductividad como la muestra 7, fueron capaces de conducir más corriente eléctrica comparado con las otras mieles en este estudio. Esto se debe a que contienen mayor cantidad de iones de los minerales y ácidos orgánicos que se encuentran en la solución de la miel, por lo que la conductividad eléctrica también se puede relacionar con el contenido mineral de la miel, tal es el caso de la muestra 2 y la ya mencionada muestra 12, donde los resultados para los metales analizados por EAA, estuvieron entre los valores más altos determinados experimentalmente, coincidiendo con los valores de conductividad, sin embargo, no ocurre con todas las muestras, por lo que hay que ampliar el estudio a una mayor cantidad de metales y así realizar una comparación asertiva entre las concentraciones de los metales de la miel y su conductividad eléctrica.

#### **III.4.2.1. Comparación entre las concentraciones de los metales y la conductividad de las muestras de miel, empleando el coeficiente de correlación de Pearson.**

Haciendo uso nuevamente del coeficiente de correlación de Pearson, ecuación (21), se compara a continuación las concentraciones de cada uno de los metales evaluados en las mieles, respecto a los valores obtenidos para la conductividad de las muestras de miel.

En la Gráfica N° 19 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Se en las muestras de miel respecto a los valores de conductividad (Tabla N° 40), cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,4748, este valor positivo se encuentra cerca de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva moderada entre las concentraciones de Se y la conductividad en las muestras de miel.

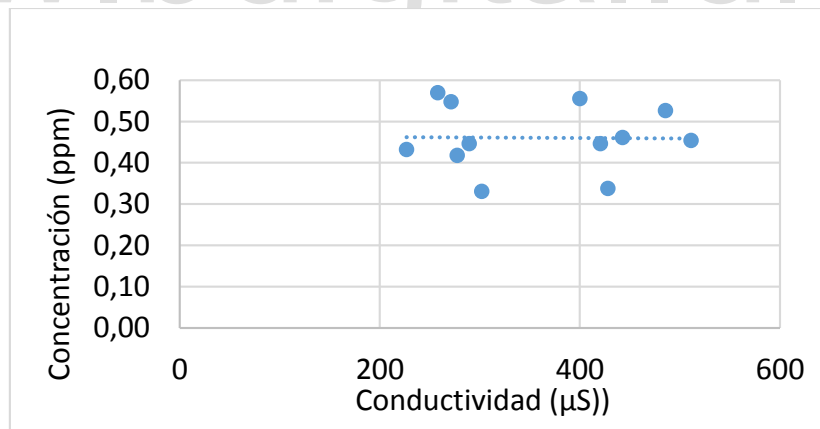
**Gráfica N° 19.** Concentración de Se Vs. conductividad.



Coefficiente de correlación de Pearson: 0,4748.

En la Gráfica N° 20 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Cu en las muestras de miel respecto a la conductividad (Tabla N° 40), cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de -0,0138, este valor negativo cercano a cero, representa que hay una correlación negativa débil entre las concentraciones de Cu y la conductividad en las muestras de miel.

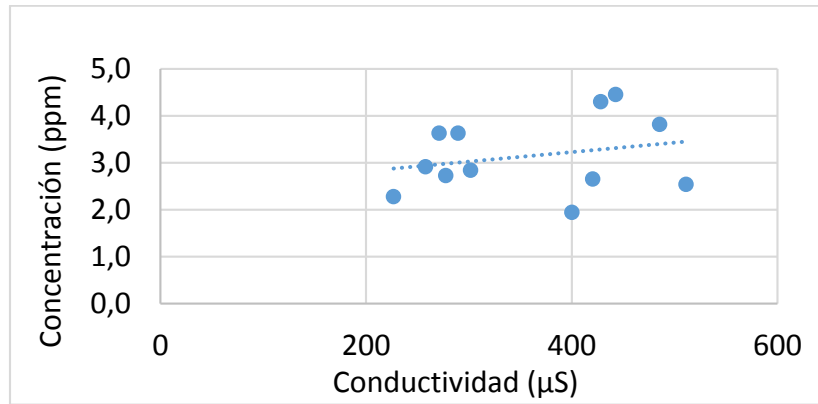
**Gráfica N° 20.** Concentración de Cu Vs. conductividad.



Coefficiente de correlación de Pearson: -0,0138.

En la Gráfica N° 21 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Fe en las muestras de miel respecto los valores de conductividad (Tabla N° 40), cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,2483, este valor a pesar de ser positivo se encuentra por debajo de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva débil entre las concentraciones de Fe y la conductividad en las muestras de miel.

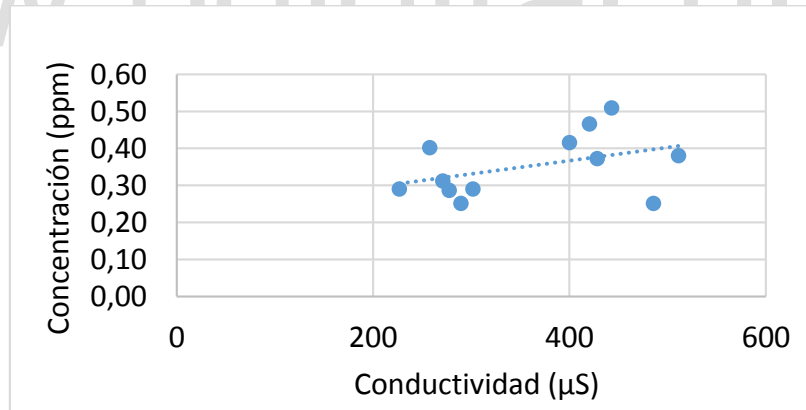
**Gráfica N° 21.** Concentración de Fe Vs. conductividad.



Coefficiente de correlación de Pearson: 0,2483.

En la Gráfica N° 22 que sigue a continuación se representa las concentraciones del Zn en las muestras de miel respecto al pH, cuyo coeficiente de correlación de Pearson calculado es de 0,4165, este valor positivo se encuentra cercano de 0,5; por tanto, hay una correlación positiva moderada entre las concentraciones de Zn y la conductividad en las muestras de miel.

**Gráfica N° 22.** Concentración de Zn Vs. conductividad.



Coefficiente de correlación de Pearson: 0,4165.



### III.4.3. Porcentaje de Humedad en la miel.

La determinación de humedad se realizó por medición indirecta, mediante la medición del índice de refracción con un Equipo: Marca Reichent AR200 Digital Refractometer Catalogo No 13950000. Luego se calculó del contenido de agua sobre la base de la tabla de Chataway 1932, completada por Wedmore 1955, método indirecto. Las muestras de miel líquida se midieron directamente, las muestras solidas se colocaron en un baño de agua a 60°C por una hora, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se realizó la medición, para lo cual se colocó una gota de miel en el refractómetro. Se realizó la lectura del índice de refracción entre (23,4 - 24,9) °C, estos resultados se muestran en la Tabla N° 41, luego se hizo la corrección a 20 °C, empleando la siguiente ecuación:

$$I_{20}=I \pm 0,00023. \Delta T \quad \text{Ecuación (22)}$$

Dónde:  $I_{20}$  = índice de refracción a 20 °C,  $I$  = índice de refracción medido a una  $T$  y  $\Delta T = 20 - T$ . Si los valores se encuentran por debajo de los 20°C, se resta 0,00023, si los valores están por arriba de 20 °C se suma 0,00023 a cada valor.<sup>66</sup> Con los valores corregidos se leyó en la tabla de Wedmore (anexo 6),<sup>94</sup> determinando el contenido de humedad en gramos/100 g, los resultados obtenidos para este estudio se presentan en la Tabla N° 42.

**Tabla N° 41.** Índice de refracción de las muestras, medidos a temperatura ambiente.

Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3
M1	1,4868 nD 24,9°C	1,4865 nD 24,9°C	1,4864 nD 24,9°C
M2	1,4933 nD 23,9°C	1,4933 nD 23,9°C	1,4932 nD 23,9°C
M3	1,4904 nD 23,4°C	1,4905 nD 23,4°C	1,4905 nD 23,4°C
M4	1,4928 nD 23,7°C	1,4927 nD 23,7°C	1,4927 nD 23,7°C
M5	1,4890 nD 24,8°C	1,4885 nD 24,8°C	1,4883 nD 24,8°C
M6	1,4951 nD 24,0°C	1,4951 nD 24,1°C	1,4951 nD 24,1°C
M7	1,4837 nD 24,2°C	1,4835 nD 24,2°C	1,4835 nD 24,2°C
M8	1,4890 nD 24,6°C	1,4889 nD 24,6°C	1,4886 nD 24,6°C
M9	1,4943 nD 24,7°C	1,4943 nD 24,7°C	1,4943 nD 24,7°C
M10	1,4878 nD 24,7°C	1,4878 nD 24,7°C	1,4875 nD 24,7°C
M11	1,4912 nD 24,5°C	1,4908 nD 24,5°C	1,4906 nD 24,5°C
M12	1,4843 nD 24,4°C	1,4842 nD 24,4°C	1,4841 nD 24,4°C

**Tabla N° 42.** Porcentaje de Humedad de las muestras de miel empleando la tabla de Wedmore, a partir del nD corregido a 20°C.

Muestra	Replica1 (nD)20°C	Replica 2 (nD)20°C	Replica 3 (nD)20°C	Promedio (nD)20°C	Humedad (%)
M1	1,4857	1,4854	1,4853	(1,4854 ± 0,0002)	20,4
M2	1,4924	1,4924	1,4923	(1,49237 ± 0,00005)	17,6
M3	1,4896	1,4897	1,4897	(1,48968 ± 0,00005)	18,8
M4	1,4919	1,4918	1,4918	(1,49188 ± 0,00005)	17,8
M5	1,4879	1,4874	1,4872	(1,4875 ± 0,0003)	19,6
M6	1,4942	1,4942	1,4942	(1,49416 ± 0,00001)	17,0
M7	1,4827	1,4825	1,4942	(1,486 ± 0,005)	20,0
M8	1,4879	1,4878	1,4875	(1,4878 ± 0,0002)	19,4
M9	1,4932	1,4932	1,4932	(1,49322 ± 0,00001)	17,4
M10	1,4867	1,4867	1,4864	(1,4866 ± 0,0001)	20,0
M11	1,4902	1,4898	1,4896	(1,4898 ± 0,0003)	18,6
M12	1,4833	1,4832	1,4831	(1,48319 ± 0,00008)	21,4

El índice de refracción obtenido experimentalmente y corregido a 20 °C está entre (1,4832 ± 0,0001) nD y (1,49416 ± 0,00001) nD. Estos resultados se encuentran dentro del intervalo citado en el capítulo I (Tabla N° 7), cuya propiedad óptica varía de 1.504 a 1.4815 n, en el rango de temperatura de 20 °C, incrementando o disminuyendo según la cantidad de sólidos y agua en el producto.

El % de humedad en las muestras de miel a partir de la corrección del nD a 20°C empleando la tabla de Wedmore (anexo 6), se encuentra entre (17,0 % y 21,4) %, cumpliendo con el rango establecido para la recolección de miel madura de la especie *apis mellífera*, que es entre 14 y 22 %, siendo el idóneo 17 %, por lo que las mieles fueron cosechadas cuando ya se encontraban maduras, contribuyendo a su conservación.<sup>1</sup> Además, se observa que el valor más alto de índice de refracción corresponde al valor mínimo del porcentaje de humedad y viceversa, esto se debe a que este parámetro es inversamente proporcional al porcentaje de humedad.

#### III.4.4. Grados brix.

El Brix es una medida de la cantidad de sólidos disueltos que hay en un líquido, se obtiene a través de la gravedad específica y se usa sobre todo para medir la azúcar disuelta. Un grado Brix es igual a un gramo de sacarosa en 100 gramos de solución, lo que equivale a 1 % Brix. Por lo tanto, 1 °Brix = 1 % Brix (peso/peso). Un refractómetro es la herramienta más simple y exacta

para medir los grados Brix.<sup>68</sup> Para la determinación de los grados brix en la miel se empleó un Refractómetro/Medidor de Brix portátil, marca Reichent AR200 Digital Refractometer Catalogo No 13950000. En primer lugar, se comprobó el refractómetro con agua desionizada. Luego, estando configurado para medir el Brix a la temperatura deseada, se añadió una gota de la muestra de miel a la célula de medición y se efectuó la medición. A continuación, se presenta la Tabla N° 43, con los resultados obtenidos en este estudio.

**Tabla N° 43.** Grados Brix de las muestras de miel a 24,5 °C.

<b>Muestra</b>	<b>Replica 1</b>	<b>Replica 2</b>	<b>Replica 3</b>	<b>Promedio</b>
M1	76,3	76,4	76,5	(76,4 ± 0,1)
M2	80,0	80,1	80,2	(80,1 ± 0,1)
M3	78,3	78,4	78,6	(78,4 ± 0,1)
M4	79,9	80,1	80,0	(80,0 ± 0,1)
M5	78,2	78,3	78,1	(78,2 ± 0,1)
M6	80,4	80,3	80,5	(80,4 ± 0,1)
M7	76,8	76,9	77,0	(76,9 ± 0,1)
M8	76,1	76,3	76,4	(76,3 ± 0,1)
M9	79,6	79,5	79,4	(79,5 ± 0,1)
M10	78,7	78,8	78,9	(78,8 ± 0,1)
M11	77,9	78,1	78,0	(78,0 ± 0,1)
M12	77,8	77,9	78,0	(77,9 ± 0,1)

Los resultados de los grados Brix medidos en las muestras de miel se encuentra entre los (76,3 ± 0,1) °Brix y (80,4 ± 0,1) °Brix, encontrándose dentro del intervalo establecido, citado en el capítulo I, el cual se encuentra entre los 70 y 88 °Brix.<sup>68</sup> Lo que evidencia que el producto está libre de alteraciones con la adición externa de sacarosa, es decir que las muestras no fueron adulteradas con componentes artificiales. Sin embargo, se deben realizar otros estudios como el contenido de hidroximetilfurfural (HMF), contenido de azúcares, entre otros, en cada una de las muestras para corroborar este resultado.<sup>66</sup>

**Tabla N° 44.** Resultados de las propiedades fisicoquímicas determinadas para las muestras de miel recolectadas en el Estado Mérida.

Propiedad Fisicoquímica	Intervalo experimental	Intervalo de referencia
<b>pH</b>	(3,51 ± 0,02) y (4,17 ± 0,01)	3,5 – 4,5 miel de flores; 4,5 – 5,5 miel de mielada.
<b>Conductividad</b>	(227 ± 1) μS y (511 ± 4) μS	Mieles florales ≤ 0,8m S/cm (800 μS/cm) y mayor de 0,8 mS/cm (800 μS/cm) para miel de mielada.
<b>Índice de refracción 20°C</b>	(1,4832 ± 0,0001) nD y (1,49416 ± 0,00001) nD.	1,504 a 1,4815 nD.
<b>Humedad</b>	(17,0 % y 21,4) %	14 – 22 %, > 25 % fermenta.
<b>Grados Brix</b>	(76,3 ± 0,1) y (80,4 ± 0,1) °Brix	70 - 88 grados Brix.

### III.5. Evaluación sensorial del color de las muestras de miel.

El color de la miel corresponde a una propiedad física la cual es percibida por los consumidores. Su coloración varía desde incolora (blanco agua) a amarillo claro pasando de ámbar oscuro o casi negro, y algunas veces con reflejos verdes a rojos.<sup>21</sup> Existen dos formas de determinar el color en la miel, sensorialmente (netamente descriptivo) e instrumentalmente, sin embargo, en el laboratorio no se cuenta con un instrumento apropiado para realizar las medidas, por lo que éste estudio solo se realizó sensorialmente. Para la evaluación sensorial del color en las muestras de miel, el ojo humano se guió de un prisma coloreado estándar (Colorímetro Pfund).<sup>95,96</sup> El Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) ha establecido su propia clasificación descriptiva del color de la miel extraída, que se basa en valores Pfund, expresados en milímetros (anexo 7),<sup>97,98</sup> siendo ésta la escala empleada para la evaluación sensorial del color. A continuación, se muestra los resultados de la evaluación sensorial del color de las muestras de miel (anexo 8).

**Tabla N° 45.** Resultados para la evaluación sensorial del color de las muestras de miel.

<b>Muestra</b>	<b>Clasificación descriptiva del color de la miel basada en escala Pfund. (mm)</b>
<b>M1</b>	Extra blanco
<b>M2</b>	Blanco
<b>M3</b>	Blanco agua
<b>M4</b>	Ámbar extra claro
<b>M5</b>	Blanco
<b>M6</b>	Ámbar extra claro
<b>M7</b>	Blanco
<b>M8</b>	Extra blanco
<b>M9</b>	Ámbar extra claro
<b>M10</b>	Ámbar extra claro
<b>M11</b>	Ámbar
<b>M12</b>	Ámbar extra claro

El color de una miel está relacionado con su contenido de minerales y fundamentalmente con los pigmentos vegetales del néctar; por lo tanto, es característico de las fuentes florales visitadas por las abejas. En la guía para la caracterización de mieles argentinas, año 2019,<sup>96</sup> hace mención que entre más oscura es una miel, mayor es su contenido en minerales y en compuestos fenólicos. Las mieles de mielada son generalmente más oscuras que la mayoría de las mieles de néctar. De acuerdo al valor encontrado en los estudios de pH Tabla N° 37 y de conductividad Tabla N° 38, las mieles estudiadas son de origen floral. En cuanto a su color, como se observa en la Tabla N° 43, solo la muestra M3 era la más clara, blanco agua según la clasificación de la escala Pfund, seguida de la muestra M1 y M8 con un color extra blanco, luego se encontraban las muestras M2, M5 y M7 con un color blanco; la mayoría de las muestras tenían un color ámbar extra claro, éstas comprenden la M4, M6, M9, M10 y M11; Finalmente la muestra M11 resultó ser la más oscura con un color ámbar. La evaluación sensorial del color, es un método cualitativo que, a pesar de no ser tan preciso a realizarlo de manera instrumental, permite tener una idea aproximada del color de las mieles evaluadas.

### **III.6. Análisis sensorial de los aromas y sabores de las muestras de miel.**

Este análisis consiste en dos etapas, en la primera etapa se capacitó a los evaluadores en cuanto a reconocimiento de olores en la miel, sabores básicos y evaluación visual (anexo 9). En la segunda etapa se realizó la evaluación sensorial de las muestras (anexo 10), donde se describen los aromas en nariz (vía nasal) y en boca (vía retronasal) utilizando una rueda de aromas y sabores para la miel (anexo 11). Traducida al castellano de acuerdo al leguaje local para una mayor comprensión, de la rueda de aromas y sabores de la miel, Figura 6.

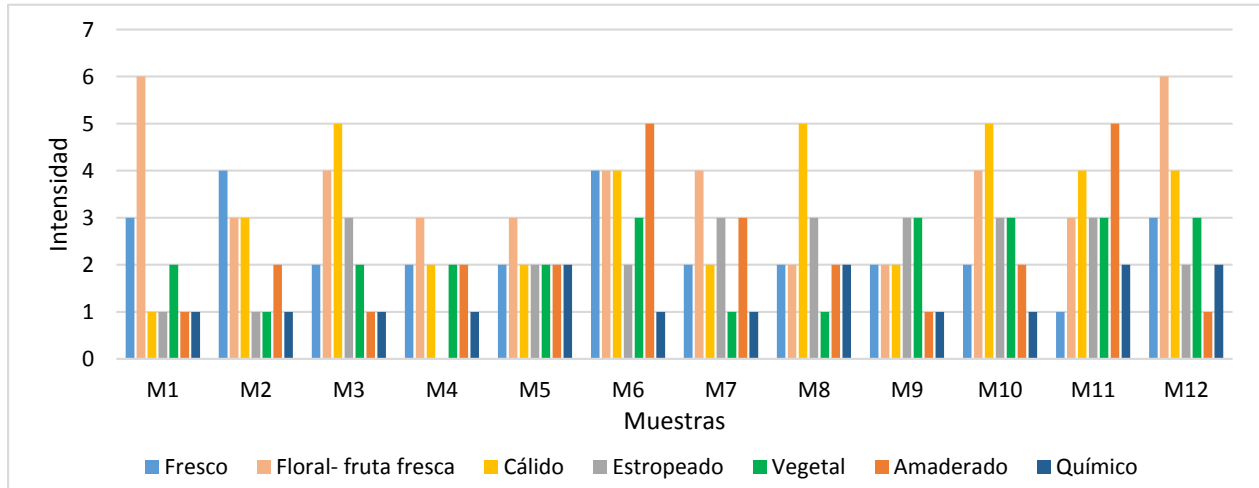
La preparación de las muestras para su análisis se llevó a cabo en el área de preparación de muestras del Laboratorio de Investigación de Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA), de la universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. La capacitación de los evaluadores y el análisis sensorial, también se realizó en estas instalaciones.

La metodología empleada consta de una planilla de evaluación sensorial (anexo 12). Donde en la primera parte se registran los aromas en nariz (vía nasal), aromas en boca (vía retronasal), gustos y sensaciones, con una escala de intensidad del 0 a 10 puntos, En la segunda parte (anexo 13), se registra la consistencia y cristalización, indicado la categoría con la letra X. También se designó un área para describir los defectos visuales y olfativos. En cada sesión se evaluó un máximo de seis muestras de miel para evitar la saturación en los sentidos de los panelistas. Los participantes se apoyaron en un glosario de términos (anexo 14), donde se describe la escala de intensidad para la evaluación y las familias de la rueda de aromas y sabores de la miel. En cuanto a la evaluación sensorial, los participantes realizaron la evaluación olfativa a través de la vía nasal directa, registraron los aromas para cada muestra, realizando sucesivas inspiraciones cortas para captar "la cabeza aromática", seguidas de varias inspiraciones largas con la finalidad de detectar los aromas más persistentes. Previo a la sesión de evaluación sensorial los evaluadores cumplieron las condiciones generales de la evaluación, como abstenerse de fumar, consumir alimentos y aplicarse perfumes. La sesión de evaluación de muestras se realizó entre las 9:15 y 10:00 am, cuando los panelistas no manifiesten tener hambre ni estar llenos.<sup>79</sup> A continuación, se presenta gráficamente los resultados obtenidos tras la evaluación sensorial de las muestras de miel por los panelistas, para cada una de las familias de la rueda de aromas y sabores de la miel y para cada una de las muestras evaluadas.

Como se observa en la Gráfica N° 23, que sigue a continuación, correspondiente a los resultados obtenidos de la evaluación vía nasal de cada una de las muestras de miel analizadas y para cada una de las familias de la rueda de aromas y sabores; las familias mejor representadas luego de la evaluación vía nasal, son floral - fruta fresca y cálido, la familia amaderado, se encuentra en todas las muestras, pero con menor intensidad, a excepción de la muestra M6 y M11 presente con mediana intensidad. Los aromas de las familias vegetal, estropeado y químico, difirió notablemente entre muestras, estando comprendidas en el intervalo de baja intensidad, algunas de las cuales no presentaron estos aromas, mientras que en otras tuvieron una

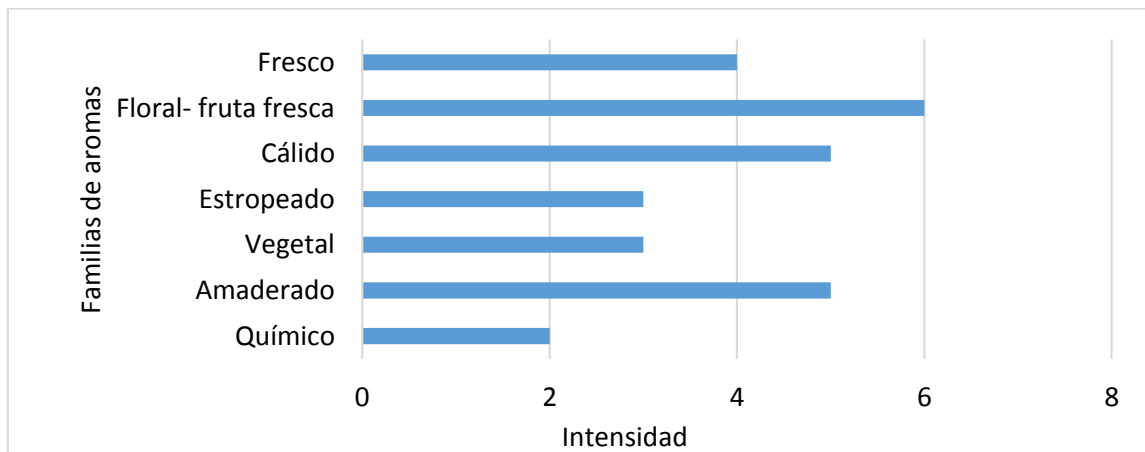
intensidad promedio como en el caso de la familia vegetal, cuya intensidad está alrededor de 3 en la mayoría de las muestras.

**Gráfica N° 23.** Aromas vía nasal de las muestras.



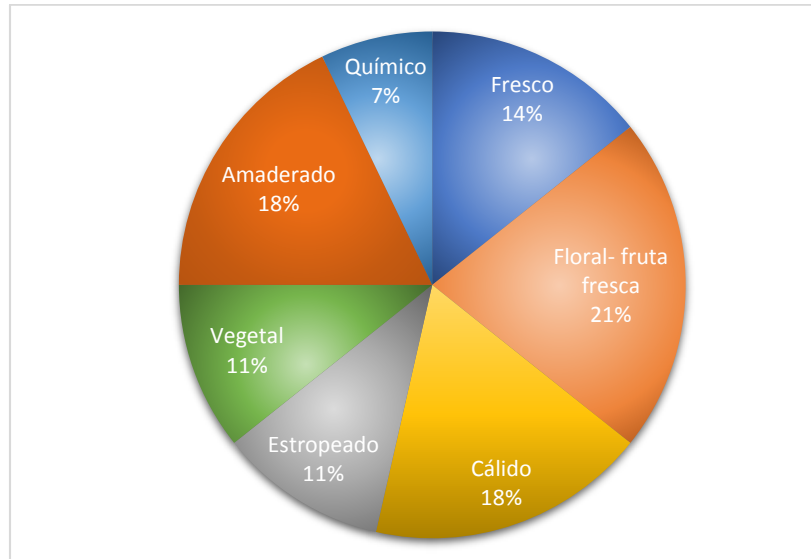
En la siguiente Gráfica N° 24, se resume la información mostrada en la Gráfica N° 23, donde se puede observar con mejor claridad que las familias mejor representadas luego de la evaluación vía nasal son, floral – fruta fresca, cálido y amaderado, seguido de fresco; por su parte las familias menos perceptibles al olfato fueron estropeado, vegetal y químico.

**Gráfica N° 24.** Resumen de la evaluación de los aromas vía nasal de las muestras.



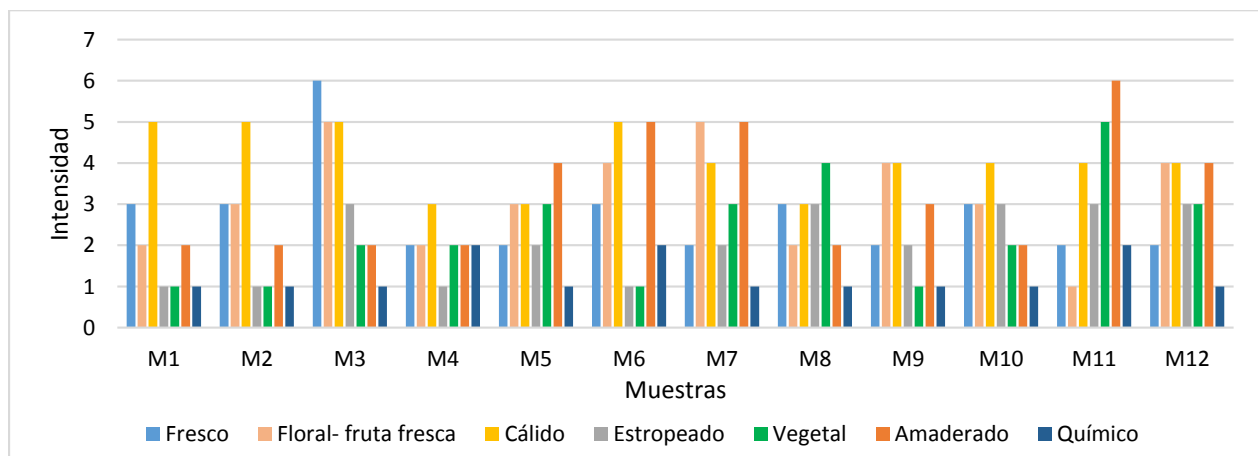
En la siguiente Gráfica N° 25, se presenta una rueda de aromas y sabores representativa de los resultados para las familias de aromas de las muestras analizadas vía nasal.

**Gráfica N° 25.** Rueda de las familias de aromas vía nasal, para las muestras de miel analizadas.



En la evaluación vía retronasal de los aromas y sabores en las muestras de miel, Gráfica N° 26, que se presenta a continuación, correspondiente a los resultados obtenidos para la evaluación vía retronasal de cada una de las muestras de miel y para cada una de las familias de la rueda de aromas y sabores; las familias mejor representadas son fresco y amaderado, seguido de las familias floral – fruta fresca, cálido y vegetal. Las familias estropeado y químico coinciden con el estudio anterior siendo poco perceptibles.

**Gráfica N° 26.** Aromas vía retronasal de las muestras.

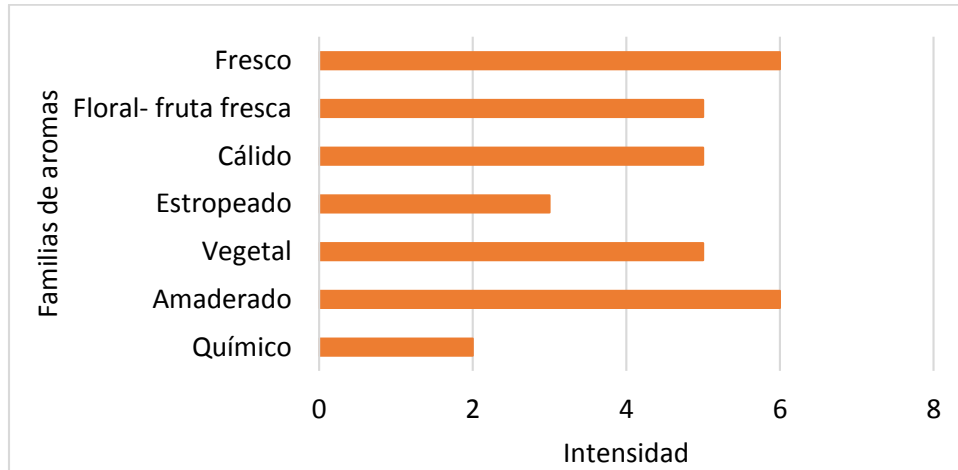


En la siguiente Gráfica N° 27, se resume la información mostrada en la Gráfica N° 26, donde se puede observar con mejor claridad que las familias mejor representadas luego de la evaluación



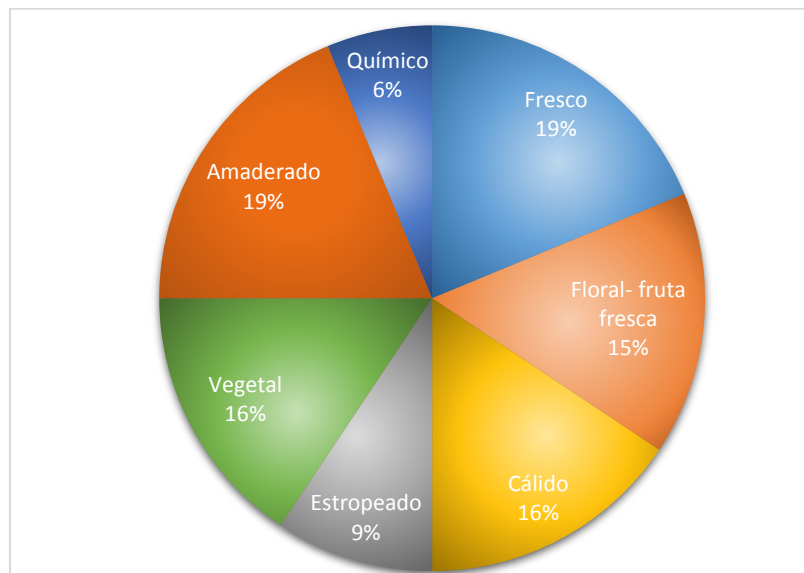
vía retronasal son fresco y amaderado, seguido de floral – fruta fresca, cálido y vegetal; las familias estropeado y químico, son poco perceptibles.

**Gráfica N° 27.** Resumen de la evaluación de los aromas vía retronasal de las muestras.



En la siguiente Gráfica N° 28, se presenta una rueda de aromas y sabores representativa de los resultados para las familias de aromas de las muestras analizadas vía retronasal.

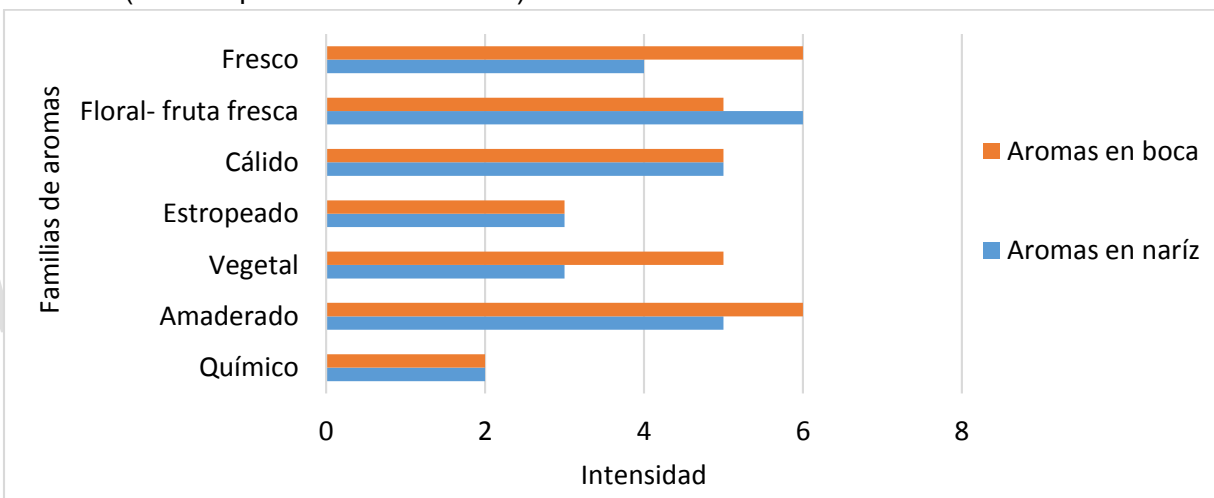
**Gráfica N° 28.** Rueda de las familias de aromas vía retronasal, para las muestras de miel analizadas.



En la Gráfica N° 29, que se presenta a continuación, se comparan los resultados de las evaluaciones vía nasal y vía retronasal, donde se puede observar que algunas de las familias con

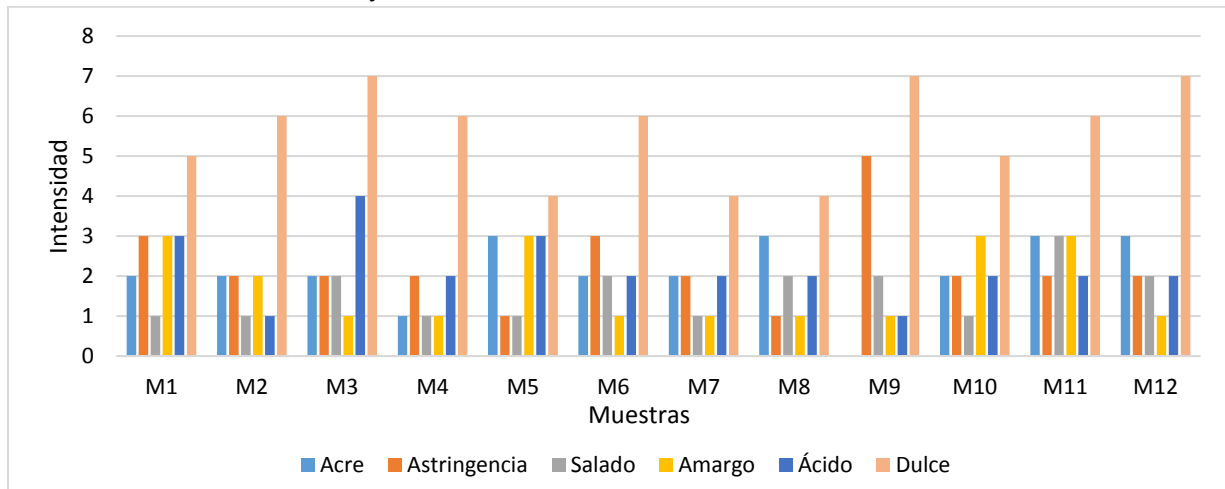
poca intensidad en la evaluación vía nasal, se percibieron mejor por la vía retronasal, como lo son las familias fresco, amaderado y vegetal, la familia floral – fruta fresca fue mejor percibida vía nasal pero la diferencia fue de un punto de intensidad, esto se debe a que los aromas en la nariz se volatilizan a temperatura ambiente, a diferencia de los que se perciben en la boca, es por ello que al observar la Gráfica N° 29, donde se comparan los aromas vía nasal y aromas vía retronasal, estos últimos resultan en su mayoría, tener más intensidad que los aromas percibidos vía nasal, como en el caso del aroma amaderado que fue poco perceptible en las muestras vía nasal, pero sí en la vía retronasal. Las familias cálido, estropeado y químico coincidieron en ambas evaluaciones.

**Gráfica N° 29.** Comparación ente los aromas por vía nasal (aromas percibidos en la nariz) y vía retronasal (aromas percibidos en la boca).



En la Gráfica N° 30, que sigue a continuación, se describen las sensaciones y sabores para cada una de las muestras analizadas, donde el dulzor de las muestras es marcado, esto se debe a que la fructosa es aproximadamente dos veces más dulce que la sacarosa, por ello, diferentes concentraciones en las mieles se relacionan con diferencias en el grado de dulzor. El gusto ácido estuvo presente en todas las muestras con baja intensidad, a excepción de las muestras M1, M3 y M5, que al observar la Tabla N° 45, estas muestras son de las más claras. La astringencia estuvo presente en todas las muestras con baja intensidad, a excepción de las muestras M1, M6 y M9, siendo característica en la muestra M9. El amargo y el salado estuvieron presente en todas las muestras con baja intensidad a excepción de las muestras M11, donde el sabor amargo está presente con mediana intensidad siendo esta la muestra más oscura.

**Gráfica N° 30.** Sensaciones y sabores de las muestras de miel analizadas.



Al estudiar la relación entre el color y los aromas, se observa que las muestras no son tan diferenciables, ya que en su mayoría son de tonos claros, sin embargo, se puede ver que las muestras más claras, tienden a representar mejor las familias fresco, floral - fruta fresca y cálido, mientras que la muestra más oscura M11, representa mejor las familias amaderado y vegetal (Gráficas N° 23 y N° 26). En cuanto al color y su relación con el gusto y las sensaciones en boca (Gráfica N° 30), la muestra M11 que es la más oscura tienen una mayor intensidad del salado, amargo y las sensaciones de astringencia y pungencia (acre) que las demás mieles. Las mieles más claras son más dulces y ácidas.

#### IV. Conclusiones.

- La optimización multivariada y el diseño experimental de Box-Behnken, por bloque, aleatorizado, enmarcado en la quimiometría, permitieron encontrar los parámetros óptimos (2 g de muestra; 4,0 mL de HNO<sub>3</sub>; tiempo de digestión de 3,12 horas; temperatura de digestión 33 °C y 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para la digestión ácida llevada a cabo en plancha de calentamiento empleada en el pretratamiento de muestras de miel y los parámetros óptimos (0,5 g/ml de NaBH<sub>4</sub>; 0,75 g/ml de NaOH; 2 mol/L de HCl; serpentín de reacción 8 cm; longitud de la manguera de separación y transporte 12 cm; 9,4 ml/min para el flujo de NaBH<sub>4</sub> y 9,4 ml/min para el flujo de HCl) en el sistema de generación de hidruros, reduciendo el costo y tiempo de análisis.
- La validación del método propuesto en base a los resultados obtenidos de las pruebas experimentales y al tratamiento estadístico de las mismas, comprobó la ausencia del efecto matriz. Las características analíticas para la determinación de selenio fueron: el límite de detección (LOD): 0,7 µg/L, el límite de cuantificación (LOQ): 2,4 µg/L y el intervalo lineal fue de (2,4 – 200) µg/L. El método presentó alta sensibilidad; buena exactitud al evaluar el porcentaje de recuperación en las mismas condiciones experimentales el mismo día ((94,6 ± 0,1) % y (103,3 ± 0,3) %). y repitiendo la metodología durante 10 días ((96 ± 1) % y (104 ± 1) %), dando resultados dentro del intervalo establecido para este estudio, además de presentar buena repetibilidad y reproducibilidad, encontrando los % DSR menores al 5%, por lo que el método de absorción atómica con generación de hidruros en flujo continuo es adecuado para la determinación de selenio en miel.
- El selenio presente en las muestras de miel recolectadas en casas apícolas y de producción artesanal el estado Mérida, se encuentra entre (17 ± 1) µg/L y (55 ± 1) µg/L, encontrándose dentro de los límites establecidos para el consumo humano.
- La metodología desarrollada en el laboratorio de espectroscopia molecular (LEM) y validada experimentalmente, de la técnica de espectroscopia de absorción atómica en llama, demostró poseer intervalos de exactitud, precisión y sensibilidad adecuados para la determinación de las concentraciones elementales en una matriz compleja como lo es la miel, permitiendo cuantificar el contenido de Cu, Fe y Zn en las muestras de miel en el estado Mérida. Las concentraciones obtenidas se encuentran entre (0,33 ± 0,02) mg/L y (0,57 ± 0,02) mg/L para el Cu; (2,3 ± 0,1) mg/L y (4,5 ± 0,2) mg/L, para el Fe y (0,25 ± 0,01) mg/L y (0,51 ± 0,01) mg/L

para el Zn. Estos resultados están dentro de los intervalos establecidos del Cu, Fe y Zn en la miel y están dentro de los límites aceptables para el consumo humano.

- La caracterización de las mieles desde el punto de vista fisicoquímico mostró que los valores de los pH determinados en las muestras son indicadores de mieles frescas, no envejecidas ni fermentadas. Las muestras analizadas corresponden a mieles de origen floral, ya que ninguna llega a tener valores de pH iguales o menores a 4,5 y además presentan una baja conductibilidad eléctrica. La mayoría de las mieles presentan un contenido en humedad bajo, lo que indica un buen grado de maduración y bajo riesgo de fermentación. El porcentaje de Brix determinado, se encuentra en el intervalo establecido para la miel, siendo un indicativo de que las muestras no fueron adulteradas con componentes artificiales.
- La evaluación sensorial con panelistas previamente entrenados, es el primer estudio en realizarse respecto a la miel proveniente de la abeja *Apis mellifera*, en esta localidad, brindando un soporte para posteriores estudios de calidad.
- La evaluación sensorial vía nasal directa, mostró que las familias de la rueda de aromas y sabores de la miel, mejor representadas, en las muestras de miel, fueron floral-fruta fresca, cálido y amaderado. La intensidad de los aromas de las familias vegetal, estropeado y químico, difirió notablemente entre muestras, estando comprendidas en el intervalo de baja intensidad sensorial.
- La evaluación sensorial vía retronasal, mostró que las familias de la rueda de aromas y sabores de la miel, mejor representadas, en las muestras de miel, fueron fresco y amaderado, seguido de floral-fruta fresca, cálido y vegetal, además presentaron tener más intensidad sensorial que los aromas percibidos vía nasal.
- La relación entre el color y los aromas, se observó que las muestras más claras, tienden a representar mejor las familias fresco, floral - fruta fresca y cálido, mientras que la muestra más oscura, representa mejor las familias amaderado y vegetal. En cuanto al color y su relación con el gusto y las sensaciones en boca, la muestra más oscura tiene una mayor intensidad del salado, amargo y las sensaciones de astringencia y pungencia (acre) que las demás mieles. Las mieles más claras son más dulces y ácidas.

- Los resultados de las concentraciones de Cu, Fe, Zn y Se analizados mediante las técnicas de espectroscopia de absorción atómica en las mieles recolectadas en el estado Mérida, los parámetros fisicoquímicos analizados y la evaluación sensorial, indican que estas mieles son aptas para el consumo humano. Sin embargo, no todas las muestras cumplen con un control de calidad adecuado, en cuanto a su manejo, almacenamiento y envasado, restando calidad al producto.

#### **V. Recomendaciones.**

- Ampliar el estudio de los metales, e incluir metales tóxicos y compuestos contaminantes como los plaguicidas.
- Ampliar el estudio a más parámetros de propiedades fisicoquímicas, como índice de diastasa, contenido de HMF (hidroximetilfurfural), contenido de azúcares, entre otros, para posteriores estudios de calidad en mieles del estado Mérida.
- Analizar otros productos provenientes de las abejas como el polen, jalea y propóleos, que también son de gran importancia en la producción apícola.
- Realizar evaluaciones sensoriales constantes de las mieles expandidas en el estado Mérida e incrementar el número de localidades para la recolección de las muestras, dentro y fuera del estado Mérida a fin de comparar y mejorar la calidad de este producto.
- Capacitar a los apicultores de producción artesanal en cuanto a las normativas y equipamiento para una adecuada producción, manejo, envasado y almacenamiento y así asegurar un control de calidad de este producto en el estado Mérida.
- Se recomienda a los apicultores ubicar exclusivamente sus panales en zonas adecuadas, para poder cosechar miel de abeja libre de contaminantes.

## VI. Referencias bibliográficas.

1. Yépez Álvarez B. R. Determinación de la presencia o no de *Bacillus cereus* sensu lato en miel de abejas de apiarios del cantón Mejía de la provincia de Pichincha. Trabajo especial de grado [Online], Universidad Central del Ecuador, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia, Ecuador Quito, Marzo, 2019. (Pág. 5,6,8). <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18006/1/T-UCE-0014-MVE-041.pdf> (Accedido el 31/05/2022, 6:09pm).
2. Borrás, M. J. Herramientas Analíticas en la Clasificación de Mieles en Base a Criterios de Calidad e Inocuidad. Tesis doctoral [Online], Universidad politécnica de Valencia, febrero, 2016. Pág. (1). [https://web.archive.org/web/20170922035327id\\_/https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/63265/-Juan%20-%20Herramientas%20anal%C3%ADticas%20en%20la%20clasificaci%C3%B3n%20de%20mieles%20en%20base%20a%20criterios%20de%20calidad%20e%20ino....pdf?sequence=1](https://web.archive.org/web/20170922035327id_/https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/63265/-Juan%20-%20Herramientas%20anal%C3%ADticas%20en%20la%20clasificaci%C3%B3n%20de%20mieles%20en%20base%20a%20criterios%20de%20calidad%20e%20ino....pdf?sequence=1) (Accedido el 11/6/22, 4:22pm).
3. Biloni, R. Características organolépticas y fisicoquímicas de miel pura en diferentes envases. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Bromatología [Online], Universidad De Concepción Del Uruguay, Facultad De Ciencias Agrarias, Centro Regional Rosario, Septiembre, 2017. Pág (16, 17,18,19, 20, 30 y 31). <http://repositorio.ucu.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/522/294/Tesis-Romina-Biloni.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 24/05/2022, 4:44pm).
4. Snowdon, J., & Cliveer, D. Microorganisms in honey. Elsevier. International Journal of Food Microbiology [Online], Agosto 1996, Volumen 31, números 1 a 3, páginas 1 a 26. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160596009701> (Accedido el 28/05/2022, 5:47pm).
5. Vayas Minango, B. L. Evaluación de métodos de sensibilidad en la efectividad antimicrobiana de la miel de abeja sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus*. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Medicina Veterinaria Y Zootecnia [Online], Universidad Técnica De Ambato, Facultad De Ciencias Agropecuarias. Cevallos, Ecuador 2017. (Pág.16) <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26343/1/Tesis%2098%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20512.pdf> (Accedido el 29/09/2022, 1:37pm).
6. Suescún, L., & Vit, P. Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. Fuerza Farmacéutica [Online], Año 12, Vol. I. Enero 2008. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/16252> (Accedido 28/09/2022, 10:10pm).
7. Merino Torres. J., & Pillaca Vilca. L. A. Fluvalinato y Metales Pesados (Cobre y plomo) en Miel de los Sectores de Pachachaca, Atumpata y Quitasol-Abancay 2018. Trabajo especial de grado [Online], Universidad Nacional Micaela Bastidas De Apurímac. Facultad De Ingeniería. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial. Abancay, Perú, 2019. Pág (19,26,27 y 32). <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/797> (Accedido el 17/05/22, 5:26pm).
8. Hossen, M. S.; Ali, M. Y.; Jahurul, M. H. A.; Abdel-Daim, M. M.; Gan, S. H., & Khalil, M. I. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. Pharmacological Reports [Online], 4 de Julio, 2017 69(6),11941205.doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.07.002> (Accedido el 18/05/2022, 4:54pm).
9. Díaz, S.; Paz, S.; Rubio, C.; Gutiérrez, A. J.; González-Weller, D.; Revert, C., & Hardisson, A. Contenido de macroelementos, elementos traza y metales tóxicos en mieles comerciales, Journal [Online], 2018;3(10):753-767 DOI: 10.19230/jonnpr.2607.(Pág. 755 y 756). <https://www.jonnpr.com/PDF/2607.pdf> (Accedido el 03/05/2021, 2:31pm).

10. Castañeda Arias, R. L. Determinación de metales por absorción atómica a la llama. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Química [Online], Universidad Mayor De San Andrés, Facultad De Ciencias Puras y Naturales, La Paz, Bolivia, 2010. (Pág. 10,17,18 ,19, 20,23 y 24).  
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/17909/M-198.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 09/06/2022, 3:13pm).
11. Martínez Guijarro, M. R. Técnicas de Generación de Vapor acopladas a Espectrofotometría de Absorción Atómica. Artículo Docente, 2301 - Química analítica [Online], Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, 31 de marzo, 2020. (Pág. 3). <http://hdl.handle.net/10251/139863> (Accedido el 27/06/2022,8:32pm).
12. Dugarte, L. A. Determinación de Talio Mediante la Generación de Hidruros por Espectroscopía de Absorción Atómica. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Química [Online], Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Mérida- Venezuela, Noviembre 2007. (Pág. 2,3,13,24,15,16 y 17). [http://bdigital.ula.ve/storage/pdftesis/pregrado/tde\\_arquivos/30/TDE-2009-07-03T17:18:20Z-589/Publico/dugarteLuis.pdf](http://bdigital.ula.ve/storage/pdftesis/pregrado/tde_arquivos/30/TDE-2009-07-03T17:18:20Z-589/Publico/dugarteLuis.pdf) (Accedido el 02/03/2021, 2:44pm).
13. Nakahara, T. spectrochim. Acta Rev., 14 (1991) 95.
14. Lobos Ortega, I. & Currián Montes, M. Capítulo 6, Composición nutricional y calidad de la miel producida en el territorio Patagonia verde en Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, región de Los Lagos [en línea]. Osorno, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. (Pág. 107,108,110,111 y 112)  
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67894/Capitulo%206.pdf?sequence=7> (Accedido el 30/09/2022, 4:59pm).
15. García Martín, L. Evaluación de la calidad de muestras de mieles aragonesas Tesis de pregrado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos [Online], Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, 2019. (Pág. 5) <https://zaguan.unizar.es/record/86883> (Accedido el 7/10/2022, 1:54pm).
16. Castro Mercado, L. Evaluación de la composición, calidad y generación de valor de miel de abejas originaria de zonas forestales en La Altillanura del Departamento de Vichada. Tesis de pregrado [Online], Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Bogotá, Colombia, 2018. (Pág. 2 y 78)  
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/63987/1066733730.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 31/05/2022, 5:01pm).
17. Extracción de la miel. <https://mielsierraflor.es/blog/noticias/extraccion-de-la-miel>
18. Fernández, M. & Agüero, B. Producción de miel de abeja. Guía para el productor. [Online], segunda edición, julio 2022. (Pág. 20) [https://wwflac.awsassets.panda.org/downloads/manual\\_miel\\_2022.pdf](https://wwflac.awsassets.panda.org/downloads/manual_miel_2022.pdf)
19. . Manual de buenas prácticas en la producción primaria en apicultura.pdf [Online], San Salvador, El Salvador, septiembre 2004. (Pág. 13-16) <https://www.senasa.go.cr>
20. Ruiz de Cenzano Calabuig, T. M. Nuevos desafíos en el análisis de la composición mineral de los alimentos. Tesis Doctoral [Online], Universidad de Valencia, mayo 2017. (Pág. 4, 5, 6 y 7)  
<http://hdl.handle.net/10550/60880> (Accedido 15/07/2023, 5:22pm).
21. Machado De-Melo, A. A.; Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. Composition and properties of Apis mellifera honey: A review, Journal of Apicultural Research, 2017.  
[https://www.researchgate.net/publication/317835980\\_Composition\\_and\\_properties\\_of\\_Apis\\_mellifera\\_honey\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/317835980_Composition_and_properties_of_Apis_mellifera_honey_A_review) (Accedido 30/09/2022, 5:00 pm).



22. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2002. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Alimentación y nutrición N°29. Roma 2002. [Online]. <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s00.htm#Contents> (Accedido 30/09/2022, 5:00 pm).
23. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). 2020. Honey Nutritional value. [Online]. CA4657ES/1/0420. FAO, 2020. <http://www.fao.org/publications/card/es/c/CA4657ES/> (Accedido 30/09/2022, 5:00 pm).
24. Ondarse Álvarez, D. "Cobre". Concepto.de. Enciclopedia [Online], Editorial Etécé, Argentina. Última edición: 15 julio, 2021. <https://concepto.de/cobre/> (Accedido 01/07/2023, 1:14 pm).
25. Datos sobre el cobre. National Institutes of health. Office of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Copper-DatosEnEspanol.pdf> (Accedido el 01/06/2023, 5:09pm).
26. Hierro – Fe., Zinc-Zn. Propiedades químicas del Hierro - Efectos del Hierro sobre la salud - Efectos ambientales del Hierro. Lenntech [Online], <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm> (Accedido 25/05/2023, 11:35am).
27. Rodríguez, E. Propiedades del Hierro (Fe). National Geographic España [Online], Actualizado a 24 de agosto de 2022, 12:56 [https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/propiedades-hierro-fe\\_18218](https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/propiedades-hierro-fe_18218) (Accedido 25/05/2023, 12:49pm)
28. Gómez Macías, J. Zinc. Revista C2. Revista Ciencia y Cultura [Online], 25 abril, 2019 <https://www.revistac2.com/zinc/>
29. Zinc, Enciclopedia Humanidades [Online] <https://humanidades.com/zinc/>
30. Zn (zinc Y compuestos) [Online], <https://prtr-es.es/Zn-Zinc-y-compuestos,15611,11,2007.html>
31. Espectroscopia de absorción atómica con llama (FAA) [Online], <https://www.sigmaldrich.com/VE/es/applications/analytical-chemistry/atomic-spectroscopy> (Accedido 03/07/2023, 1:09 pm).
32. Chang R. Fisicoquímica para las ciencias químicas y biológicas. Tercera edición. México. D.F. 2008. Pág. 710 y 711.
33. Goitía, M. L. Análisis multielemental en mieles de la provincia de la Pampa. Tesis de pregrado Licenciatura en Química [Online], Universidad Nacional De La Pampa, Facultad De Ciencias Exactas y Naturales, Santa Rosa, La Pampa, 2007. (Pág. 9,10, 21, 22,25,27 y 38). [https://repo.unlpam.edu.ar/bitstream/handle/unlpam/2006/x\\_goiana536.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repo.unlpam.edu.ar/bitstream/handle/unlpam/2006/x_goiana536.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Accedido el 09/06/2022, 5:35pm).
34. Ramírez Lara, M. I. Determinantes de la composición en muestras de Bi-Pb-Sb-Sr-Ca-Cu-O por espectroscopía de absorción atómica. Tesis para obtener el título de Ingeniería Química Industrial [Online], Instituto Politécnico Nacional, ESQIE, Ciudad de México, octubre, 2019. (Pág. 10,14 y 16). <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/27672/Tesis%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 03/07/2023, 6:01 pm).
35. Sáenz Parra, S. M. Validación del método para la determinación de calcio y magnesio por espectroscopía de absorción atómica de llama en concentrados ácidos para hemodiálisis. Informe de pasantía para optar al título de Licenciatura en Química [Online], Universidad Distrital Francisco José De Caldas, Facultad De Ciencias y Educación, Bogotá D.C.2018, (Pág. 18, 19 y 20). <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/23452/S%C3%A1enzParraSandraMilena2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 19/10/2022, 2:35pm).

36. Sanmiguel Torres, J. X. & Guerrero Carrera, S. R. Validación del método para determinar Pb, Cd, Ni por espectrometría de absorción atómica de llama en agua y suelo. Tesis de pregrado, Ingeniería en Biotecnología Ambiental [Online], Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela De Ciencias Químicas, Orellana , Ecuador, 2017. (Pág. 21, 23,24, 27 y 28). <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/7019/1/236T0275.pdf> (Accedido el 21/10/2022, 11:35am).
37. Martinez Rojas, M. Optimización económica en el proceso del análisis químico de minerales de cobre, plomo y zinc por espectroscopía de absorción atómica en la empresa SGS del Perú SAC. Tesis de pregrado, Ingeniera Química [Online], Universidad Nacional San Cristobal De Huamanga, Facultad De Ingeniería Química Y Metalurgia, Escuela Profesional De Ingeniería Química, Ayacucho, Perú, 2019. (Pág. 25, 26, 29, 31, 34,35,36 y 47). [http://209.45.73.22/bitstream/UNSCH/3423/1/TESIS%20Q512\\_Mar.pdf](http://209.45.73.22/bitstream/UNSCH/3423/1/TESIS%20Q512_Mar.pdf) (Accedido el 20/10/2022, 10:25am).
38. Cevallos Raza, M. G. Desarrollo e implementación de un método para la determinación de plomo por absorción atómica en horno de grafito en agua natural y potable en El L3C-EPMAPS. Tesis de pregrado Licenciatura en Química [Online], Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, DMQ, Febrero, 2017. (Pág. 30, 31, 33, 34 y 38). <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/14909/1/T-UCE-0008-Q013-2018.pdf> (Accedido el 20/10/2022, 11:35am).
39. Lámparas de cátodo hueco y de descarga sin electrodos para absorción atómica. Espectroscopia de Absorción Atómica (AA), Blog [Online], febrero de 2011. <http://absorcion-atomica.blogspot.com/2011/02/lamparas-de-catodo-hueco-y-de-descarga.html>
40. Skoog D. A.; Holler F. J. & Nieman T. A. Componentes de los instrumentos para espectroscopia óptica. In Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición, Fernández, C. Ed.; España, Madrid, 2001. (Pág. 163, 165, 166, 167, 177, 178).
41. Oldfield JE. Selenium world atlas. Selenium-Tellurium Development Association (STDA), Selenium World Atlas (Belgium) [Online], 2002. <https://www.stda.org/>
42. Hernández Mendoza, H.; Rios Lugo, M. J. Rol biológico del selenio en el humano. Química Viva [Online], Agosto 2009, Vol. 8, Núm. 2, 64-79. Universidad de Buenos Aires Argentina. (Pág. 65) <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=86311783003> (Accedido el 30/04/2021, 3:24pm).
43. ToxFAQs™ - Selenio (Selenium). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2003. Reseña Toxicológica del Selenio (edición actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública [Online], CAS # 7782-49-2. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts92.pdf](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts92.pdf) (Accedido el 9/07/2023, 12:43 pm).
44. Serra Henández A. M. Desarrollo de nuevos métodos en flujo para la especiación de mercurio y selenio. Tesis doctoral [Online], Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Julio 2015. (Pág. 76) [https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/149118/Serra\\_Hernandez\\_Antonio\\_Miguel.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/149118/Serra_Hernandez_Antonio_Miguel.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (Accedido el 28/02/2023, 10:39am).
45. Palazón Bru, I. Asociación entre la concentración sérica de selenio y el perfil lipídico en una población infantil y adulta. Tesis doctoral [Online], Universidad Complutense De Madrid, Facultad De Medicina, Madrid, 2016. (Pág. 15,16,17 y 18). <https://eprints.ucm.es/id/eprint/44485/1/T39231.pdf> (Accedido el 23/06/2022, 10:12am).
46. Dedina, J.; Dimiter L. T. Capítulo 2. Generación de hidruros; Capítulo 3. Atomización de hidruros y Capítulo 13. Selenio. In Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, 1era edición;

Winefordner, J. D; Análisis químico: Serie de monografías sobre química analítica y aplicaciones, editor de la serie. Wiley; Inglaterra, 8 Junio 1995; Volumen 130. (Pág. 17, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 31, 39, 70, 308 y 333).

47. Argueta Maravilla, V. Y. Determinación de Plomo y Arsenico en nectares en lata. Trabajo Especial de Grado para optar al Título de Licenciada en Química Y Farmacia [Online], Universidad de El Salvador, Agosto, 2018. (Pág. 48, 49 y 50) <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20596/1/16103775.pdf> (Accedido el 12/07/2023, 4:48pm).
48. Pistón Pedreira, M. M. Aplicación de técnicas de análisis en flujo a la automatización del análisis químico de la leche y sus derivados. Tesis doctoral [Online], Facultad De Química, Universidad de La República, Montevideo Uruguay, 2009. (Pág. 126, 127, 128, 129, 158, 159, 160, 161, 162, 163 y 164) <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/32154/1/TD%20Pist%C3%B3n%20Pedreira%2C%20Mariela%20M%C3%B3nica.pdf> (Accedido el 15/07/2023, 5:54 pm).
49. D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; & Sturgeon, R. E. Mechanism of generation of volatile hydrides of trace elements by aqueous tetrahydroborate (III). Mass spectrometric studies on reaction products and intermediates. Analytical chemistry, [Online], 79(7), 2007. 3008-3015. <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/ac061962c> (Accedido el 09/05/2023, 2:49 pm).
50. Salas, J.; Benzo, Z.; Aray, Y.; Coll, D.; Marcano, E.; Gómez, C.; Vidal, A.; & Quintal, M. Estudio teórico de los mecanismos propuestos para la generación de hidruros volátiles. Ciencia [Online], Vol. 19, N° 2 (2011) 151 – 158. [https://www.researchgate.net/profile/Eunice-Marcano/publication/234065990\\_Estudio\\_teorico\\_de\\_los\\_mecanismos\\_propuestos\\_para\\_la\\_generacion\\_de\\_hidruros\\_volatiles/links/559bd91708ae898ed650a63d/Estudio-teorico-de-los-mecanismos-propuestos-para-la-generacion-de-hidruros-volatiles.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Eunice-Marcano/publication/234065990_Estudio_teorico_de_los_mecanismos_propuestos_para_la_generacion_de_hidruros_volatiles/links/559bd91708ae898ed650a63d/Estudio-teorico-de-los-mecanismos-propuestos-para-la-generacion-de-hidruros-volatiles.pdf)
51. Villanueva Alonso, J. Uso de la generación de vapores en la determinación de metales traza por técnicas atómicas. Tesis de Doctorado [Online], Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Santiago de Compostela. España (2012). (Pág. 12 y 28). <http://hdl.handle.net/10347/5100> (Accedido el 04/05/2023, 11:19 am).
52. Cava Montesinos, P. Empleo de las técnicas atómicas para el análisis multielemental y la especiación en alimentos. Tesis Doctoral [Online], Universidad de Valencia, Departamento de Química Analítica, Valencia 2004. (Pág. 49 y 50) <http://hdl.handle.net/10550/14971> (Accedido el 07/10/2022, 12:49 pm).
53. Marval León, J. R. Valoración del contenido de selenio total y biodisponible en especies pesqueras de consumo habitual en España. Tesis Doctoral [Online], Universidad de Córdoba, Departamento de Bromatología y Tecnología de los alimentos, Córdoba, mayo, 2015. (Pág 22, 23, 28 y 29). <https://core.ac.uk/download/pdf/60902196.pdf> (Accedido el 30/09/2022, 4:42pm)
54. Pintado Morocho, S. E. Validación del método generador de hidruros por espectrometría de absorción atómica para la determinación de selenio en aguas naturales, de consumo y residuales. Trabajo de titulación para optar por el grado académico de Ingeniera en Biotecnología Ambiental [Online], Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, 2020. (Pág. 19, 20) <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/14490> (Accedido el 8/12/2022, 9:01pm).
55. Determinación de Metales por absorción atómica - Generador de Hidruros [Online], <https://www.ugr.es/~fgil/proyecto/hidruros/fotosfundamentohidruro1.html>
56. Zuriarrain Ocio, J. Aplicación de la quimiometría para el aprovechamiento analítico de reactivos generales. Revisión de la incertidumbre instrumental y del límite de detección multivariable. Tesis doctoral de la universidad del país vasco/euskal herriko unibertsitatea. Donostia-San Sebastián, 2010 (Pág. 7).

<https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/5574/ZuriarrainIntrod.pdf?sequence=6&isAllowed=y>  
(Accedido el 19/07/2023, 4:48pm).

57. Jurado Jurado, J. M. Caracterización analítica de aguardientes anisados. Tesis doctoral [Online], Universidad de Sevilla, Facultad de Química, Sevilla, 2004. (Pág. 98)  
[https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/16005/1\\_T-1039.pdf](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/16005/1_T-1039.pdf) (Accedido el 05/01/2023, 12:31pm).
58. Badii, M. H., et al. Diseños experimentales e investigación científica. Innovaciones de negocios [Online], 4.8. 283-330, México, 2007.  
<https://revistainnovaciones.uanl.mx/index.php/revin/article/download/190/176> (Accedido el 20/07/2023, 12:54pm)
59. ¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken? Soporte de Minitab® 20 [Online], <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/> (Accedido el 20/07/2023, 8:26pm).
60. Ramón Fernández, A. A. D. Aplicación de técnicas de modelado para la optimización de la energía generada en pilas de combustible microbianas. Trabajo especial de grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales [Online], Universidad Politécnica de Cartagena, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial, Cartagena, octubre, 2019.(Pág.27,29,31,32 y 33)  
<https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/8285/tfg-ram-apl.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
61. Stripeikis, J. D. Optimización de la producción de átomos de selenio en espectroscopías atómicas, aplicaciones a su especiación y cuantificación en matices ambientales. Tesis presentada para optar al título de doctor en ciencias químicas [Online], Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2002. (Pág. 117, 118, 119, 120, 121 y 122)  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3500\\_Stripeikis.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3500_Stripeikis.pdf) (Accedido el 1/10/2022, 4:17pm).
62. Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 CGA-ENAC-LEC Rev. 11 Julio 2022  
<https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30>
63. Equipo Técnico de la ONA. Oficina Nacional de Acreditación. Política Para la Validación de Métodos de Laboratorios de Ensayos y Calibración. DOC-ONA-12-011 Versión N°:01 Revisión N°:00.  
[https://www.mific.gob.ni/Portals/0/Documentos/ComercioInterior/SNC/ONA/Documentaci%F3n/Documentos/DOC\\_ONA\\_12\\_011\\_Ver%5B1%5D\\_Rev%5B0%5D.pdf](https://www.mific.gob.ni/Portals/0/Documentos/ComercioInterior/SNC/ONA/Documentaci%F3n/Documentos/DOC_ONA_12_011_Ver%5B1%5D_Rev%5B0%5D.pdf)
64. P.P. Morillas, et al. Guía Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Segunda Edición Inglesa Primera Edición Española [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf)
65. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. – Monografía. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. 2001  
[https://www.academia.edu/10365264/Validacion\\_de\\_Metodos\\_Analiticos\\_Asociacion\\_Espanola\\_de\\_Farmaceuticos\\_de\\_la\\_Industria](https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria)
66. Fattori S. B. “LA MIEL” Propiedades, Composición y Análisis Físico- Químico. Expediente N° 359100. Licenciada en Ciencias Químicas Universidad de Buenos Aires República Argentina, 22 de octubre del 2004. (Pág. 42, 43, 44, 51, 52, 58, 193 y 194) [https://www.apiservices.biz/documents/articulos-es/la\\_miel\\_propiedades\\_composicion\\_y\\_analisis\\_fisico-quimico.pdf](https://www.apiservices.biz/documents/articulos-es/la_miel_propiedades_composicion_y_analisis_fisico-quimico.pdf) (Accedido el 19/09/2023, 2:12 pm)
67. Condor Salazar, F. A. Determinación De Metales Pesados En Miel De Abeja Para Su Evaluación Como Indicador Ambiental en Zonas Contaminadas, en La Provincia de Pichincha-Ecuador. tesis de

- pregrado carrera de Ingeniería En Biotecnología [Online], Universidad De Las Fuerzas Armadas, ESPE. Matriz Sangolquí, 2015. (Pág. 7,8,9 y 10).  
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10886/1/T-ESPE-049241.pdf> (Accedido el 1/06/2022, 5:54pm).
68. Medición de Brix [Online], <https://www.mt.com/es/es/home/perm-lp/product-organizations/ana/brix-meters.html#:~:text=%C2%BFcu%C3%A1ntos%20grados%20Brix%20debe%20haber,se%20estropea%20durante%20el%20almacenamiento>
69. Quality Services International GmbH. Opciones para la determinación de diastasa con QSI Una comparación de los métodos según Schade, Phadebas y Nitrofenol, [Online], [https://es.qsi-q3.com/wp-content/uploads/sites/54/2017/02/QSI\\_Infomail-2018.11-Opciones-para-la-determinaci%C3%B3n-de-diastasa.pdf](https://es.qsi-q3.com/wp-content/uploads/sites/54/2017/02/QSI_Infomail-2018.11-Opciones-para-la-determinaci%C3%B3n-de-diastasa.pdf) (Accedido el 7/8/2023).
70. Piana, M.L.; Persano Oddo, L.; Bentabol, A.; Bruneau, E.; Bogdanov, S. & C. Guyot Declerck, Sensory analysis applied to honey: state of the art. [Online], Apidologie Volume 35, Number Suppl. 1, 2004, European unifloral honeys (Pág. S26 - S37).  
<https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2004/06/MHS05.pdf> (Accedido 6/03/2023, 11:36am).
71. Cabrera, M. M. Identidad de las mieles de la región nordeste del Distrito Oriental del Parque Chaqueño. Tesis Doctoral de la UNNE en el área de recursos naturales [Online], Facultad de Humanidades-UNaF, Formosa Argentina, 2021. (Pág. 101,102,104,105 y 106).  
[https://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/29641/RIUNNE\\_FCA\\_TD\\_Cabrera\\_M.pdf?sequence=1](https://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/29641/RIUNNE_FCA_TD_Cabrera_M.pdf?sequence=1) (Accedido 27/07/2022, 7:13 pm).
72. La cata de vinos: La fase gustativa. Blog: Copa y mantel [Online], lunes, 27 de diciembre, 2010.  
<http://copaymantel.blogspot.com/2010/12/la-cata-de-vinos-la-fase-gustativa.html> (Accedido 25/07/2023, 12:43 pm).
73. Vit, P. Valorización de la miel de abejas sin aguijón (Meliponini). Revista de la Facultad de Farmacia. Volumen 50 (2) Julio - Diciembre 2008: 20-28.  
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/29306/articulo4.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 27/07/2022, 6:32pm).
74. Gutiérrez L.; Prada M.; Rodríguez P.; Contreras K.; Bonive F. & Carrero P., Determinación Espectrofotométrica de plomo, cadmio, níquel, cobre, zinc en mieles en el Municipio Antonio Pinto Salinas, del Estado Mérida Venezuela". Universidad Experimental Sur del Lago. Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR). Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Apartado Postal 440, Mérida 5101-A. Venezuela.
75. Mohtar, L., Hernández, N., Maidana, J., Leal, I., & Yegres, F. Evaluación de la calidad de las mieles expendidas en Coro, estado Falcón, Venezuela. *Multiciencias*, 11(3), 2011. 225-234.  
<https://www.redalyc.org/pdf/904/90421736002.pdf>
76. Gutiérrez Peña, L. V.; Carrero P. E.; Delgado, Y. J.; Picón, D.; Paz, L. A.; Vielma, J. R.; Quintero, A. Y.; Gutiérrez, E. O.; & Gutiérrez, I. A. Desarrollo de un método analítico para la determinación de selenio en huevos fortificados de gallinas (Isa Brown) por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"* [Online], 45 (2);2014. 19-28.  
[https://www.researchgate.net/publication/280947037\\_Desarrollo\\_de\\_un\\_metodo\\_analitico\\_para\\_la\\_determinacion\\_de\\_selenio\\_en\\_huevos\\_fortificados\\_de\\_gallinas\\_Isa\\_Brown\\_por\\_espectroscopia\\_de\\_absorcion\\_atomica\\_con\\_generacion\\_de\\_hidruros](https://www.researchgate.net/publication/280947037_Desarrollo_de_un_metodo_analitico_para_la_determinacion_de_selenio_en_huevos_fortificados_de_gallinas_Isa_Brown_por_espectroscopia_de_absorcion_atomica_con_generacion_de_hidruros) (Accedido el 18/5/2022, 3:52 pm).
77. Silva Trejos, P. "Validación de la metodología analítica para cuantificación de Selenio en alimentos de la canasta básica del costarricense." *Revista Costarricense de Salud Pública* [Online], 20.1,2011: 31-35. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rcsp/v20n1/art5v20n1.pdf> (Accedido el 8/12/2022, 6:50 pm)



78. Quintero Lira, A.; López Oliveira, A.; Martínez Juárez, V.; Del Razo Rodríguez, O.; Jiménez Alvarado, R.; & Campos Montiel, R. Determinación de Compuestos Bioactivos y Contenido de Selenio en diversas mieles del Estado de Hidalgo. *Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability*, [Online], 3(2), 2019. 1-18. <https://doi.org/10.19136/jeeos.a3n2.3405> (Accedido el 18/5/2022, 4:54pm).
79. Cabrera, M. M. Identidad de las mieles de la región nordeste del Distrito Oriental del Parque Chaqueño. Tesis Doctoral de la UNNE en el área de recursos naturales [Online], Facultad de Humanidades-UNaF, Formosa Argentina, 2021. (Pág. 101,102,104,105 y 106). [https://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/29641/RIUNNE\\_FCA\\_TD\\_Cabrera\\_M.pdf?sequence=1](https://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/29641/RIUNNE_FCA_TD_Cabrera_M.pdf?sequence=1) (Accedido 27/07/2022, 7:13 pm).
80. Guía rápida para la elaboración de muestreos estadísticos en los programas de vigilancia epidemiológica: microbiológicos y residuos tóxicos. (Pág. 19, 20 y 21) <https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/Gu%C3%ADa%20r%C3%A1pida%20de%20muestreo%20estad%C3%ADstico%20en%20Inocuidad%20Alimentaria%20-%20OIRSA.pdf>
81. Los árboles de Mérida. Universidad de Los Andes. [http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16096/arboles\\_merida.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16096/arboles_merida.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
82. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Perkin-elmer. june, 1982. 0303-0152. (Pág. 26,29,30 y 34)
83. Cáceres Sánchez, I. S. Determinación de los niveles de plomo en miel de abeja por voltamperometría y su aplicación como bioindicador de contaminación ambiental. Trabajo especial de grado para optar al título de Ingeniero Biotecnólogo [Online], Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas Y Biotecnológicas, Arequipa-2012. (Pág. 30, 31 y 32) <https://repositorio.ucsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12920/4311/42.0098.IB.pdf?sequence=1> (Accedido 3/5/2021, 3:39pm).
84. Zamudio, S. A. Evaluación de residuos de plaguicidas y metales tóxicos en miel de abejas producida en zonas de cultivos de fresa y cítricos. Tesis, [Online], Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 2017. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/59614/Adriana%20M.ZamudioS%c3%a1nchez.2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accedido el 17/05/2022, 5:26pm)
85. Fechner, D. C. Estudio de la presencia de potenciales marcadores químicos de trazabilidad en mieles producidas en la región Nordeste de Argentina. 2019. (Pág 73,77) [https://notablesdelaciencia.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/97899/CONICET\\_Digital\\_Nro.bbe9fa0a-f82a-4069-8b20-b79ca94cd978\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://notablesdelaciencia.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/97899/CONICET_Digital_Nro.bbe9fa0a-f82a-4069-8b20-b79ca94cd978_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y) (Accedido 11/6/2022, 5:24pm).
86. Obasi, N. A., Alope, C., Obasi, S. E., Famurewa, A. C., Ogbu, P. N., & Onyeji, G. N. Elemental composition and associated health risk of honey obtained from apiary farms in southeast Nigeria. *Journal of Food Protection*, 83(10), 1745-1756. 2020. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-072> (Accedido el 11/06/2022, 5:26pm)
87. Vaca Calahorrano R. J. Validación del método analítico para la determinación de arsénico, mercurio y selenio por espectroscopía de absorción atómica con un sistema de generación de hidruros, en lixiviados con fines de acreditación en el laboratorio de Química Ambiental del OSP. Tesis de grado para optar por el Título Profesional de Químico de Alimentos [Online], Universidad Central del Ecuador, Quito, abril, 2013. (Pág. 20, 21, 22)

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1867/1/T-UCE-0008-11.pdf> (Accedido el 27/06/2022, 11:19pm).

88. Artículo técnico: Análisis químico, medir es comparar. AGQ Labs Chile S.A. Lab. Orgánico. 2017. (Pág. 1 y 2). <https://agqlabs.cl/wp-content/uploads/Analisis-quimico-medir-es-comparar.pdf>
89. Sánchez Palacios, M. A. Métodos de calibrado. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Mérida Venezuela. (Pág. 6)  
[http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio\\_vr1.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicascalibracio_vr1.pdf) (Accedido: 23/08/2023 7:55 p.m.)
90. Miller, J. N & Miler J. C. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición. Madrid, España, 2002. (Pág. 43-68).
91. Sabido Couoh, C. R., Rosado Rubio, J. G., Castellanos Ruelas, A. F., Betanour Ancona, D. A., Chel Guerrero, L. A., & Acereto Escoffié, P. O. Adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso. Revista latinoamericana de química, 38(2), 113-122. 2010. (Pág. 114) <https://www.scielo.org.mx/pdf/rlq/v38n2/v38n2a5.pdf> (Acceido 11/11/2023 5:00pm)
92. Suescún, L. & Patricia, V. Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. Fuerza farmacéutica. Año 12. Vol. I. enero 2008.  
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16252/ff2008suescun.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
93. Coeficiente de correlación lineal de Pearson Universidad pública, Sevilla, España (Pág. 1- 20)  
<https://personal.us.es/vararey/adatos2/correlacion.pdf> (Accedido 10/03/2024)
94. Unidad de Innovación Docente. Universidad de Murcia. Edificio Luis Vives, 2ª planta. Campus de Espinardo - 30100 – Murcia. <https://www.um.es/web/innovacion/plataformas/ocw/listado-de-cursos/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas/introduccion-miel>
95. Color de la miel y la escala Pfund. Blog mieladictos.1 septiembre, 2015  
<https://mieladictos.com/2015/09/01/color-de-la-miel-y-la-escala-pfund/#>
96. Guía para la caracterización de mieles argentinas ISBN 978-987-47099-2-9. Año 2019. (Pág. 15 y 16)  
[https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/documentos/Guia\\_para\\_la\\_Caracterizacion\\_de\\_Mieles\\_Argentinas\\_F40919.pdf](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/documentos/Guia_para_la_Caracterizacion_de_Mieles_Argentinas_F40919.pdf)
97. Ulloa Fuentes, P. A. Metodologías para la determinación de parámetros fisicoquímicos y de calidad en miel. DDI: 2022-A-2981  
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/68794/NR42023.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
98. Blog ¡El mundo de la miel es maravilloso!, mayo 21, 2021. <https://tiendanicoya.cr/el-mundo-de-la-miel-es-maravilloso/>

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Anexos**



## Anexo 1. Encuesta para Apicultores

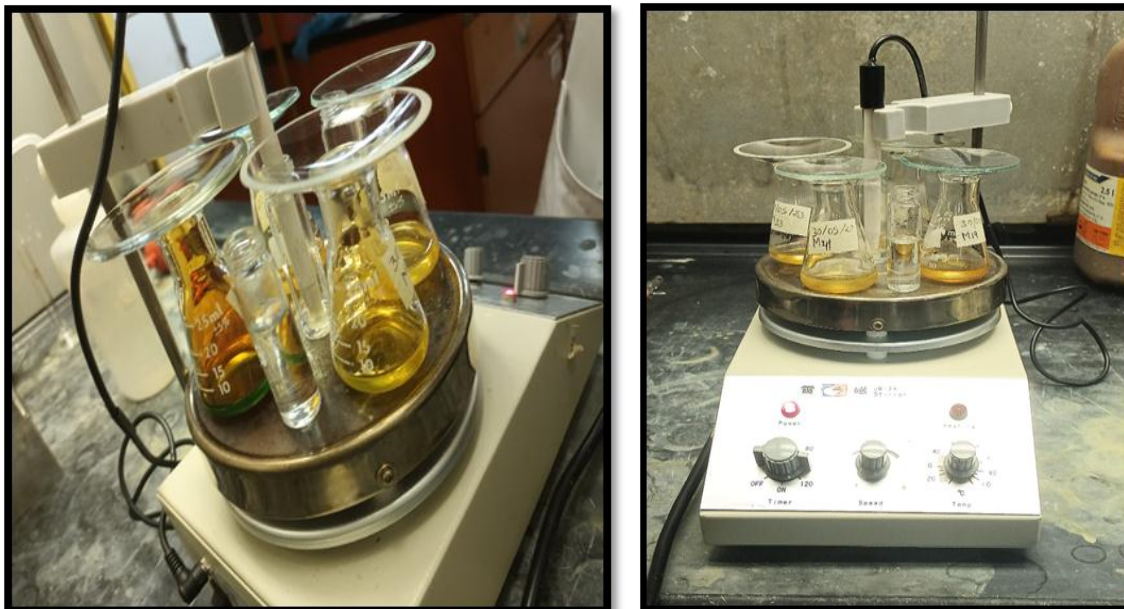
Nombres y Apellidos:

Teléfono:

Ubicación del Apiario (Dirección):

1. ¿Qué tipo de vegetación se encuentra cerca del apiario?
2. ¿Existe algún cultivo de hortalizas cerca del apiario? ¿Qué se encuentra sembrado?
3. ¿A qué distancia de los cultivos de hortalizas se encuentra el apiario?
4. ¿Qué cantidad de colmenas se encuentran en funcionamiento?
5. ¿Qué tipo de colmenas usa? (tipo fijistas o corchos, movilista Layens o Langstroth)
6. ¿Cuántos enjambres se encuentran habitando el apiario?
7. ¿Qué cantidad de abejas en promedio posee cada enjambre en su apiario?
8. ¿Cuántos procesos de Floración ocurren al año?
9. ¿Cuál es su producción promedio anual de miel en Kg?
10. ¿Número de cosechas de miel al año?
11. ¿Cuántos años de experiencia lleva usted en la apicultura?
12. ¿Está inscrito en alguna asociación apícola?
13. ¿Posee cursos de apicultura?
14. ¿Qué tipo de alimentación artificial le proporciona a los enjambres en temporadas de escasez o climas adversos? (Solución 1:1 azúcar-agua para mantener la colonia, 2:1 azúcar-agua para estimular la postura de la reina o algún tipo de miel o melaza).
15. Marque con una equis (X) cuál de los siguientes equipos y materiales apícolas utiliza:  
a) Extractor de miel ()      b) Extractor de cera ()      c) Trampa de polen ()  
d) Palanca de apicultura ()      e) Velo cara ()      f) Sombrero ()      h) Guantes ()  
i) Braga ()      j) Ahumador ()
16. ¿Qué periodo es necesario para que un enjambre se logre reproducir y dividir en dos?
17. ¿Cada cuánto tiempo reemplaza la reina? ¿La forma usted mismo o la compra?
18. ¿Cuál de los siguientes productos apícolas además produce: propóleos, polen, jalea real, cera?
19. ¿Vende núcleos?
20. ¿Qué tipo o raza de abejas utiliza?
21. ¿Ha tenido pérdida de colmenas o desaparición de abejas en los últimos 5 años? ¿Cuántas colmenas tenía? ¿cuántas colmenas tiene ahora?

**Anexo 2.** Digestión húmeda de las muestras de miel con plancha de calentamiento.



**Anexo 3.** Espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN SpectrAA 110 y sistema de generación de hidruros en flujo continuo.



**Anexo 4. Bloque 1. Digestión de la muestra.**

Muestra	MASA (g)	HNO <sub>3</sub> (mL)	Tiempo (horas)	T (°C)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Absorbancia Replica 1	Absorbancia Replica 2	Absorbancia Replica 3	Absorbancia Promedio
M1	1,5	2	2	30	3	0,0358	0,035	0,0361	(0,0356 ± 0,0005)
M2	1,5	3	3	30	3	0,0989	0,0981	0,088	(0,0950 ± 0,005)
M3	1	3	3	35	3	0,0778	0,0779	0,081	(0,0789 ± 0,002)
M4	1,5	3	3	30	3	0,1023	0,1078	0,1066	(0,1054 ± 0,002)
M5	1,5	2	3	35	3	0,0824	0,083	0,0821	(0,0825 ± 0,0004)
M6	1,5	3	2	25	3	0,0144	0,0156	0,0161	(0,0154 ± 0,0007)
M7	2	3	3	35	3	0,0941	0,0938	0,0954	(0,0944 ± 0,0007)
M8	1,5	4	3	30	2	0,086	0,0862	0,0854	(0,0859 ± 0,0003)
M9	2	3	4	30	3	0,0952	0,0926	0,0954	(0,0944 ± 0,001)
M10	1	3	2	30	3	0,0183	0,0188	0,0224	(0,0198 ± 0,002)
M11	1	3	3	25	3	0,0124	0,0192	0,0158	(0,0158 ± 0,003)
M12	1	3	3	30	2	0,0235	0,0265	0,0186	(0,0229 ± 0,003)
M13	1,5	2	4	30	3	0,088	0,0872	0,0864	(0,0872 ± 0,0007)
M14	1,5	3	2	35	3	0,0885	0,0882	0,0898	(0,0888 ± 0,0007)
M15	1	2	3	30	3	0,0113	0,0111	0,0107	(0,0110 ± 0,0002)
M16	1,5	3	3	35	2	0,0885	0,0882	0,0889	(0,0885 ± 0,0003)
M17	1	3	4	30	3	0,0482	0,0505	0,0478	(0,0488 ± 0,001)
M18	2	2	3	30	3	0,0221	0,0267	0,0266	(0,0251 ± 0,002)
M19	2	4	3	30	3	0,1455	0,151	0,1511	(0,1492 ± 0,003)
M20	1,5	3	4	30	2	0,0615	0,0589	0,0615	(0,0606 ± 0,001)
M21	1,5	3	3	35	4	0,086	0,0872	0,0881	(0,0871 ± 0,0009)
M22	1,5	3	4	35	3	0,0926	0,0943	0,0939	(0,0936 ± 0,0007)
M23	1	4	3	30	3	0,0708	0,0651	0,0724	(0,0694 ± 0,003)
M24	1,5	3	4	25	3	0,0225	0,0218	0,0238	(0,0227 ± 0,0008)
M25	1,5	3	3	25	2	0,0172	0,0167	0,0169	(0,0169 ± 0,0002)
M26	1,5	4	2	30	3	0,0239	0,0251	0,0276	(0,0255 ± 0,002)
M27	1,5	3	2	30	4	0,0236	0,0251	0,0268	(0,0260 ± 0,001)
M28	2	3	3	30	2	0,1052	0,0994	0,1132	(0,1059 ± 0,006)
M29	1,5	3	4	30	4	0,0541	0,053	0,0547	(0,0539 ± 0,0007)
M30	1,5	3	3	30	3	0,0524	0,0552	0,0539	(0,0538 ± 0,001)
M31	2	3	3	25	3	0,0148	0,0178	0,0171	(0,0166 ± 0,001)
M32	1,5	4	4	30	3	0,054	0,0457	0,0564	(0,0520 ± 0,005)
M33	1	3	3	30	4	0,0656	0,0605	0,0572	(0,0611 ± 0,004)
M34	1,5	4	3	35	3	0,0945	0,0946	0,0935	(0,0942 ± 0,0005)
M35	1,5	3	3	30	3	0,0939	0,0919	0,0932	(0,0930 ± 0,0008)
M36	2	3	2	30	3	0,0557	0,0586	0,0573	(0,0572 ± 0,001)
M37	1,5	3	3	30	3	0,0929	0,0969	0,0948	(0,0949 ± 0,002)
M38	1	3	3	30	4	0,0625	0,0624	0,0658	(0,0636 ± 0,002)

M39	1,5	2	3	30	2	0,0651	0,0683	0,0618	(0,0651 ± 0,003)
M40	1,5	3	3	30	3	0,0896	0,0872	0,0862	(0,0877 ± 0,001)
M41	1,5	4	3	30	4	0,0877	0,0891	0,0866	(0,0878 ± 0,001)
M42	1,5	4	3	25	3	0,0858	0,0876	0,0875	(0,0870 ± 0,0008)
M43	1,5	3	4	30	2	0,0621	0,0616	0,0639	(0,0625 ± 0,001)
M44	1,5	2	3	30	4	0,088	0,0869	0,0861	(0,0870 ± 0,0008)
M45	1,5	3	3	25	4	0,0125	0,0146	0,0177	(0,0149 ± 0,002)
M46	1,5	2	3	25	3	0,0158	0,0192	0,0173	(0,0174 ± 0,001)

### Anexo 5. Bloque 2. Generación del Hidruro.

Muestra	NaBH <sub>4</sub> %	NaOH %	HCl M	S. R. cm	L.M.T. cm	F. NaBH <sub>4</sub> ml/min	F. HCl ml/min	Absorbancia Replica 1	Absorbancia Replica 2	Absorbancia Replica 3	Absorbancia Promedio
M1	0,75	0,5	1	18	12	30	35	0,0215	0,0209	0,0263	(0,0229 ± 0,002)
M2	1	0,25	2	18	12	30	30	0,1427	0,14	0,141	(0,1412 ± 0,001)
M3	0,75	0,25	1	12	12	25	30	0,1146	0,1148	0,1018	(0,1104 ± 0,006)
M4	0,75	0,5	2	18	8	35	30	0,0658	0,0744	0,0754	(0,0719 ± 0,004)
M5	0,75	0,5	3	18	12	30	35	0,0806	0,095	0,0871	(0,0876 ± 0,006)
M6	0,75	0,5	1	8	12	30	25	0,1314	0,1233	0,1297	(0,1281 ± 0,004)
M7	0,5	0,75	2	18	12	30	30	0,1078	0,1036	0,1149	(0,1088 ± 0,005)
M8	0,75	0,25	3	12	12	35	30	0,1046	0,1025	0,1093	(0,1055 ± 0,003)
M9	1	0,5	2	12	12	35	25	0,0534	0,065	0,0507	(0,0564 ± 0,006)
M10	0,5	0,5	2	12	12	25	35	0,1249	0,1328	0,1255	(0,1277 ± 0,004)
M11	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1363	0,145	0,1522	(0,1445 ± 0,007)
M12	0,75	0,5	1	18	12	30	25	0,0901	0,0877	0,083	(0,0869 ± 0,003)
M13	0,75	0,5	2	8	18	35	30	0,0867	0,0838	0,0824	(0,0843 ± 0,002)
M14	0,5	0,5	1	12	18	30	30	0,1019	0,1002	0,1059	(0,1027 ± 0,002)
M15	1	0,5	1	12	18	30	30	0,1182	0,1209	0,1154	(0,1182 ± 0,002)
M16	0,75	0,5	2	8	8	25	30	0,1362	0,1376	0,1476	(0,1405 ± 0,005)
M17	0,75	0,25	1	12	12	35	30	0,1605	0,142	0,1518	(0,1514 ± 0,008)
M18	1	0,5	2	12	12	25	35	0,0528	0,0637	0,0561	(0,0575 ± 0,005)
M19	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1486	0,1473	0,1479	(0,1479 ± 0,0005)
M20	0,5	0,5	2	12	12	35	25	0,117	0,1183	0,1192	(0,1182 ± 0,0009)
M21	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,145	0,147	0,1401	(0,1440 ± 0,003)
M22	0,75	0,5	3	8	12	30	35	0,1225	0,0983	0,1025	(0,1078 ± 0,01)
M23	0,75	0,5	2	8	8	35	30	0,1148	0,1056	0,1106	(0,1103 ± 0,004)
M24	0,75	0,75	3	12	12	35	30	0,067	0,0711	0,0661	(0,0681 ± 0,002)
M25	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1396	0,1541	0,1438	(0,1458 ± 0,006)
M26	0,5	0,5	3	12	18	30	30	0,1372	0,1351	0,136	(0,1361 ± 0,0009)
M27	0,5	0,25	2	18	12	30	30	0,0835	0,0751	0,0727	(0,0771 ± 0,005)
M28	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1439	0,1408	0,1347	(0,1398 ± 0,004)

M29	0,75	0,75	3	12	12	25	30	0,0863	0,0671	0,0933	(0,0822 ± 0,01)
M30	0,75	0,75	2	12	8	30	25	0,113	0,1146	0,116	(0,1145 ± 0,001)
M31	1	0,25	2	8	12	30	30	0,0854	0,0896	0,0896	(0,0882 ± 0,002)
M32	0,5	0,5	2	12	12	35	35	0,1168	0,1154	0,1136	(0,1153 ± 0,001)
M33	0,75	0,75	2	12	18	30	35	0,1325	0,1351	0,136	(0,1345 ± 0,002)
M34	0,75	0,5	1	8	12	30	35	0,1253	0,1294	0,1273	(0,1273 ± 0,002)
M35	1	0,5	1	12	8	30	30	0,0669	0,07	0,0633	(0,0667 ± 0,003)
M36	0,5	0,5	1	12	8	30	30	0,1076	0,1066	0,1051	(0,1064 ± 0,001)
M37	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1499	0,1446	0,1418	(0,1454 ± 0,003)
M38	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1304	0,1435	0,1499	(0,1413 ± 0,008)
M39	0,75	0,75	2	12	8	30	35	0,109	0,0912	0,1096	(0,1033 ± 0,009)
M40	1	0,5	3	12	18	30	30	0,1254	0,1279	0,1351	(0,1295 ± 0,004)
M41	1	0,75	2	8	12	30	30	0,095	0,0926	0,0942	(0,0939 ± 0,001)
M42	0,5	0,5	2	12	12	25	25	0,1443	0,1432	0,1425	(0,1433 ± 0,0007)
M43	0,75	0,25	2	12	8	30	35	0,1402	0,1378	0,1399	(0,1393 ± 0,001)
M44	0,75	0,75	2	12	18	30	25	0,1354	0,1331	0,1375	(0,1353 ± 0,002)
M45	0,75	0,5	2	18	5	25	30	0,0867	0,0838	0,0824	(0,0843 ± 0,002)
M46	1	0,5	3	12	8	30	30	0,0965	0,0813	0,0842	(0,0873 ± 0,007)
M47	0,75	0,25	3	12	12	25	30	0,1031	0,1035	0,1195	(0,1087 ± 0,008)
M48	0,75	0,75	1	12	12	35	30	0,0996	0,0979	0,0987	(0,0987 ± 0,0007)
M49	0,75	0,5	2	18	18	35	30	0,0389	0,0438	0,042	(0,0416 ± 0,002)
M50	0,75	0,5	2	12	12	30	30	0,1373	0,1377	0,1426	(0,1392 ± 0,002)
M51	0,5	0,25	2	8	12	30	30	0,0969	0,0924	0,1093	(0,0995 ± 0,007)
M52	0,75	0,5	3	8	12	30	25	0,1125	0,123	0,1228	(0,1194 ± 0,005)
M53	0,75	0,25	2	12	8	30	25	0,1378	0,1404	0,1448	(0,1410 ± 0,003)
M54	0,5	0,75	2	8	12	30	30	0,1189	0,1265	0,1241	(0,1232 ± 0,003)
M55	1	0,75	2	18	12	30	30	0,0595	0,0623	0,0622	(0,0613 ± 0,001)
M56	0,75	0,5	3	18	12	30	25	0,0644	0,0651	0,061	(0,0635 ± 0,002)
M57	0,75	0,75	1	12	12	25	30	0,0846	0,0889	0,0821	(0,0852 ± 0,003)
M58	0,75	0,25	2	12	18	30	35	0,1595	0,1519	0,1536	(0,1550 ± 0,003)
M59	0,5	0,5	3	12	8	30	30	0,1034	0,1149	0,1033	(0,1072 ± 0,005)
M60	1	0,5	2	12	12	35	35	0,0722	0,0655	0,0624	(0,0667 ± 0,004)
M61	0,75	0,25	2	12	18	30	25	0,1385	0,1403	0,1392	(0,1393 ± 0,0007)
M62	0,75	0,5	2	8	18	25	30	0,1161	0,1042	0,1001	(0,1068 ± 0,007)
M63	0,75	0,5	2	18	18	25	30	0,0561	0,0519	0,0569	(0,0550 ± 0,002)
M64	1	0,5	2	12	12	25	25	0,0861	0,0792	0,0739	(0,0797 ± 0,005)

**Anexo 6.** Tabla de Wedmore.

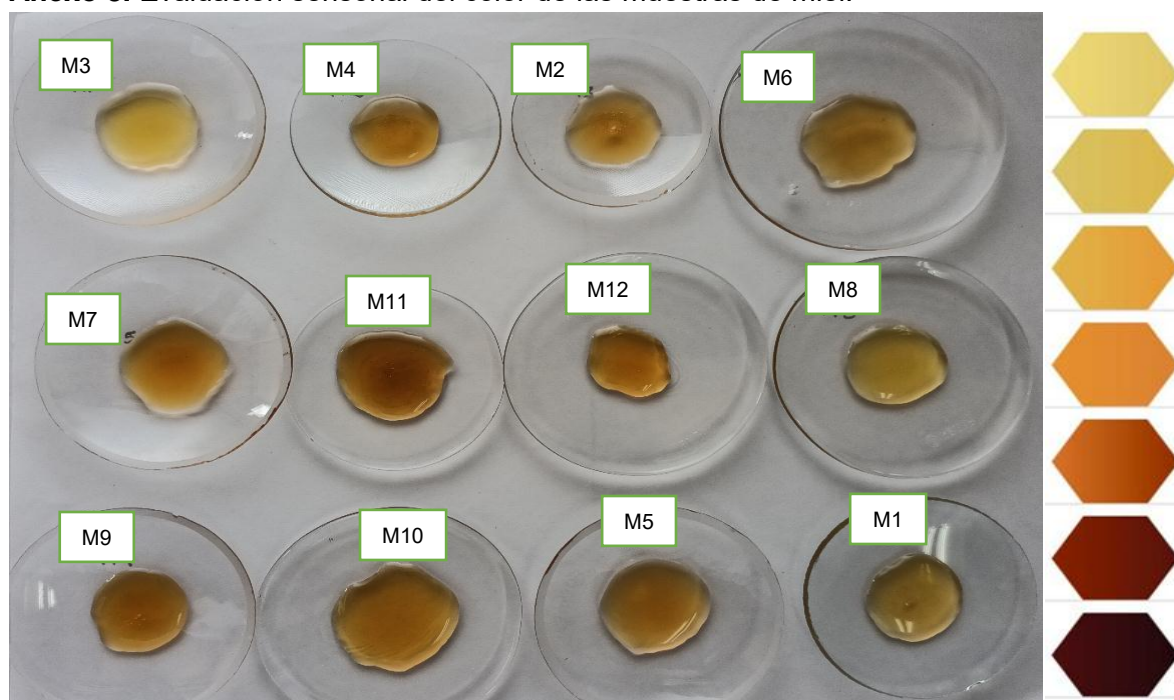
Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad	Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad	Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad
1.5044	13.0	1.4935	17.2	1.4830	21.4
1.5038	13.2	1.4930	17.4	1.4825	21.6
1.5033	13.4	1.4925	17.6	1.4820	21.8
1.5028	13.6	1.4920	17.8	1.4815	22.0
1.5023	13.8	1.4915	18.0	1.4810	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 7.** Clasificación de la coloración de la miel de acuerdo a escala Pfund (mm) del Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA).

## COLOR DE LA MIEL



**Anexo 8.** Evaluación sensorial del color de las muestras de miel.





**Anexo 9.** Etapa de capacitación.



**Anexo 10.** Etapa de evaluación.





**Anexo 11.** Rueda de aromas y sabores de la miel. Traducida al castellano de acuerdo al leguaje local para una mayor comprensión, de la rueda de aromas y sabores de la miel, figura 2.



**Anexo 12.** Planilla para la evaluación sensorial de las mieles (primera parte: indicar la intensidad en la escala de 0 a 10).

Muestra	Aromas en nariz							Aromas en Boca						
	Fresco	Floral-Fruta fresca	Cálido	Estropeado	Vegetal	Amaderado	Químico	Fresco	Floral-Fruta fresca	Cálido	Estropeado	Vegetal	Amaderado	Químico
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														

**Anexo 13.** Planilla para la evaluación sensorial de las mieles (segunda parte: indicar la intensidad en la escala de 0 a 10, donde no se indique marcar con X).

Muestra	Gustos y sensaciones						Consistencia (marcar x)				Cristalización (marcar con x)			Defectos		Otros
	Acre	Astringencia	Salado	Amargo	Acido	Dulce	Líquida	Untuosa	Firme	Muy firme	Inexistente	En curso	Completa	Visuales	olfativos	
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																

**Anexo 14.** Glosario de términos para el análisis sensorial de las mieles.

Intensidad atributo del	Significado	Uso común de intensidad
0	No está presente	Ausente - Intensidad baja
1	Solo un rastro y no puede ser encontrado ni saboreado de nuevo	
2	Presente en la muestra	
3 a 5	Claramente característico de la muestra	Intensidad Media
6 a 8	Dominante característica de la muestra	Intensidad Fuerte
9 a 10	Máximo. Domina algunas otras notas aromáticas de la muestra	

Descriptor	Descripción
Fresco	Fresco : Menta, eucalipto, anís
	Cítrico: Limón, naranja, toronja
Floral - Fruta Fresca	Floral: Violeta, flor de naranja, jacinto
	Frutal: Pera, manzana, frutas rojas, damasco, frutas tropicales (Coco y albaricoque)
Cálido	Quemado: Melaza, azúcar caramelizada
	Fruta cocida: Dátiles, pasas, azucarado, ciruela, higos, frutas confitadas
	Caramelizado: Caramelo, azúcar morena
	Sutil: Mantequilla, vainilla, cera de abeja, pasta de almendras
Estropeado	Acre: Queso picante, vinagre
	Animal: Queso, establo, orina de gato, sudor
	Mohoso: Húmedo, humus, trapeador, encerado
	Azufre: Repollo, alcachofa, huevo cocido
Vegetal	Fresco (verde): Frijol crudo, hojas arrugada, vegetación, humedad (petricor)
	Seco: Malta clara, paja, té, heno seco
Amaderado	Seco: Madera, polvo, nuez, avellana
	Resinoso: Cedro, resina de pina, propóleos
	Picante: Clavos, nuez moscada, canela, café
Químico	Petroquímico: Estireno, pintura, solvente
	Medicina: Jabón doméstico, vitamina B1