



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

*“MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE
PRODUCTOS APÍCOLAS”*

Lic. Marina Alejandra Dominguez

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 7 de Septiembre de 2010 y el 10 de Octubre de 2014, bajo la dirección de Dra. María Eugenia Centurión, Profesora Asociada de Química Analítica.

Lic. Marina Alejandra Dominguez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. María Eugenia Centurión, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación. Por su estímulo constante, su dedicación, consejos y confianza brindados que me permitieron crecer como profesional y desarrollar este trabajo de tesis. Por su cariño y palabras de apoyo.

A la Dra. María Susana Di Nezio y el Dr. Marcelo F. Pistonesi por acompañarme, entenderme y brindarme todo su apoyo a lo largo de estos cinco años. Por su gran ayuda a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A CONICET y Erasmus Mundus, por las becas otorgadas.

A mi esposo Cristian, por estar a mi lado en todo momento, por su paciencia y comprensión infinitas. Por la fuerza que me da día a día y por brindarme su amor de manera incondicional. Gracias mi vida.

A mis padres, por haberme dado la posibilidad de estudiar. Por enseñarme a ser perseverante y dedicada. Por creer siempre en mi y apoyarme en cada una de mis decisiones. Por todo el amor que me dan.

A Clau, por estar siempre que la necesité, por sus palabras de aliento y el amor que solo una hermana sabe brindar.

A mis suegros, cuñados y sobrinos por el cariño, el apoyo y la comprensión.

A Gaby, Gastón y Maty por todos los momentos compartidos a lo largo de este camino y por brindarme su amistad.

A Valeria, Pacho, Mariela, Marcos, Caro y Naty por el tiempo compartido y su ayuda.

A todos MUCHAS GRACIAS!!

RESUMEN

En la República Argentina la apicultura tiene un alto valor social y económico y de esta actividad dependen numerosos productores, quienes destinan el producto al consumo interno y para exportación. Para conservar y mejorar la posición de Argentina en el comercio mundial de la miel, resulta indispensable satisfacer un mercado cada día más exigente, propiciado fundamentalmente por el surgimiento de normas y requisitos de calidad. Algunas de las metodologías utilizadas en el control de calidad de este producto son laboriosas, consumen tiempo y emplean gran cantidad de reactivos y muestra. Otras, emplean instrumentación de alto costo, no siempre disponible en laboratorios analíticos de rutina. Es por ello que surge la necesidad de implementar técnicas analíticas rápidas, simples, de bajo costo y que sean amigables con el medio ambiente para llevar a cabo el control de calidad de la miel. Éste es el principal objetivo de esta Tesis Doctoral, dando lugar a los siguientes trabajos:

En una primera etapa se desarrolló un sistema automático Flow-Batch para la determinación de mercurio por espectroscopia de absorción atómica por vapor frío. El sistema propuesto es adecuado para la determinación de mercurio en las muestras de miel, reduciendo el tiempo de digestión de 2 h (método AOAC) a 16 min. Los resultados obtenidos por el método propuesto fueron validados utilizando el método de la AOAC, mostrando una buena concordancia entre ellos.

En una segunda etapa se obtuvieron imágenes digitales de muestras de miel, utilizando como información analítica los histogramas correspondientes a los modelos de color RGB (rojo, verde y azul), escala de grises y HSB (matiz, saturación y brillo), dando lugar al desarrollo de dos trabajos.

El primero de ellos, consistió en diseñar un sistema Flow-Batch para clasificar las muestras según su origen geográfico. Se emplearon histogramas de las imágenes y el Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (SPA), asociado con el Análisis Discriminante Lineal (LDA). Los datos obtenidos mostraron una separación de las muestras según su lugar de procedencia.

El segundo trabajo consistió en la determinación de color mediante el análisis de imágenes digitales combinada con calibración multivariada. A partir de los histogramas generados y de los valores obtenidos con el colorímetro Pfund Koehler (método de referencia), se construyeron modelos de calibración empleando Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). Los resultados obtenidos a partir de HSB y PLS, indican que el uso de imágenes digitales combinadas con calibración multivariada permite cuantificar el color en muestras de miel.

En una tercera etapa, se desarrolló un método analítico, que no requiere pretratamiento de muestra, para la determinación simultánea de fructosa, glucosa y prolina en muestras de miel de Argentina y Suecia, mediante la técnica de Electroforesis Capilar. El método propuesto posibilita la determinación de los analitos en un tiempo menor a 5 min. Por otro lado es simple y permite reducir la cantidad de reactivos, muestra y la generación de residuos.

ABSTRACT

In Argentina, beekeeping has a high social and economic value and their products are used for domestic consumption and for export. The honey market in Argentina must ensure product quality. Some of the methodologies used in the quality control of these products are laborious, time consuming, employ large amount of reagents and high-cost instrumentation. Then, new analytical methods must be proposed. This is the main objective of this Thesis resulting to the following research:

An automatic Flow-Batch system for cold vapor atomic absorption spectroscopy determination of mercury was developed. The proposed system is suitable for the determination of mercury in the honey samples, reducing digestion time from 2 h (AOAC method) to 16 min. The obtained results by the proposed method were validated using the AOAC method, showing good agreement.

In a second stage digital images of honey samples were obtained. Using the corresponding histograms of the color models RGB (red, green and blue), grayscale and HSB (hue, saturation and brightness) two works were developed.

In the first one a geographic origin classification of honey samples from Argentina was proposed. For this reason a Flow-Batch system was carried out. The histograms and the Successive Projections Algorithm (SPA), associated with the Linear Discriminant Analysis (LDA) were used. The obtained data showed a good classification of the samples according to their geographical origin.

The second work was the determination of color by digital image analysis combined with multivariate calibration. From the histograms generated and the Pfund values (reference method), calibration models using Partial Least Squares (PLS) were constructed. The obtained results from HSB and PLS indicate that the use of digital images combined with multivariate calibration allows quantifying the color of honey samples.

Finally, an analytical method which requires no sample pretreatment, for the simultaneous determination of fructose, glucose and proline in honey from Argentina and Sweden, using Capillary Electrophoresis was developed. The proposed method enables the determination of the analytes in approximately 5 minutes.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados

Firma del director

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: Introducción

1.1 Productos apícolas	1
1.1.1 Miel	1
1.1.2 Cera	1
1.1.3 Propóleos	1
1.1.4 Jalea Real	2
1.1.5 Veneno	2
1.1.6 Polen	2
1.2 Apicultura en Argentina	3
1.2.1 Producción	4
1.2.2 Exportación	6
1.3 La miel de abejas	8
1.3.1 Definición	8
1.3.2 Composición	10
1.3.3 Requisitos de calidad	11
1.3.3.1 Características sensoriales	11
1.3.3.2 Características físico-químicas	12
1.3.3.3 Higiene	16
1.3.4 Importancia del control de calidad de la miel	16
1.4 Bibliografía	18
OBJETIVO GENERAL	20

CAPÍTULO 2: Determinación de mercurio en mieles de Argentina empleando un sistema Flow-Batch

2.1 Objetivo	21
2.2 Introducción	22
2.2.1 Diseño experimental Box-Behnken	25
2.2.2 Metodología Flow-Batch	27
2.3 Materiales y métodos	29
2.3.1 Reactivos y soluciones	29
2.3.2 Instrumentación y software	30

2.3.3 Sistema Flow-Batch.....	30
2.3.4 Procedimiento desarrollado.....	33
2.4 Resultados y discusión.....	35
2.4.1 Optimización del proceso de digestión.....	35
2.4.2 Optimización del agente reductor.....	41
2.4.3 Optimización de las variables Flow-Batch.....	42
2.4.4 Parámetros analíticos.....	42
2.4.5 Aplicación a muestras reales.....	43
2.5 Conclusiones parciales.....	44
2.6 Bibliografía.....	46
<i>CAPÍTULO 3: Análisis de imágenes digitales en combinación con técnicas multivariadas</i>	
3.1 Objetivo.....	49
3.2 Introducción.....	50
3.2.1 Análisis de imágenes digitales.....	50
3.2.1.1 Modelo de colores primarios aditivos o RGB (rojo, verde, azul).....	51
3.2.1.2 Escala de gris.....	53
3.2.1.3 Modelo HSB.....	54
3.2.2 Técnicas multivariadas.....	55
3.2.2.1 Técnicas de reconocimiento de patrones – Clasificación.....	56
3.2.2.2 Calibración multivariada.....	62
3.2.2.3 Algoritmo Kennard-Stone.....	63
<i>Parte A: Clasificación de mieles de Argentina empleando un sistema Flow-Batch con cámara web</i>	
3.3 Introducción.....	65
3.4 Materiales y métodos.....	67
3.4.1 Preparación de las muestras.....	67
3.4.2 Instrumentación y software.....	68
3.4.3 Sistema Flow-Batch.....	69
3.4.4 Procedimiento.....	71
3.4.5 Histogramas y análisis de datos.....	71
3.5 Resultados y discusión.....	73

3.5.1	Análisis exploratorio	73
3.5.2	Clasificación	75
3.6	Conclusiones parciales.....	77
PARTE B: Empleo de imágenes digitales para determinar color en muestras de miel provenientes de Argentina		
3.7	Introducción	79
3.8	Materiales y métodos.....	80
3.8.1	Muestras	80
3.8.2	Instrumentación y softwares.....	80
3.8.3	Método de referencia.....	81
3.8.4	Obtención de imágenes digitales.....	82
3.8.5	Histogramas.....	84
3.8.5.1	Imágenes del vidrio coloreado	84
3.8.5.2	Imágenes de las muestras de miel.....	84
3.8.6	Análisis de datos	85
3.8.6.1	Modelos generados a partir de las imágenes del vidrio coloreado	85
3.8.6.2	Modelos generados a partir de las imágenes de las muestras de miel.....	86
3.9	Resultados y discusión.....	86
3.10	Conclusiones parciales	91
3.11	Bibliografía.....	92
CAPÍTULO 4: Determinación simultánea de hidratos de carbono y prolina en miel mediante Electroforesis Capilar		
4.1	Objetivo	96
4.2	Introducción	97
4.3	Electroforesis capilar	99
4.3.1	Fundamento de las separaciones electroforéticas	100
4.3.2	Aspectos instrumentales	104
4.3.2.1	Fuente de alto voltaje.....	105
4.3.2.2	Recipientes para contener la disolución tampón.....	105
4.3.2.3	Capilar.....	105
4.3.2.4	Sistemas de inyección.....	106
4.3.2.5	Sistemas de detección	107

4.4 Materiales y métodos	108
4.4.3 Preparación de las muestras	108
4.4.4 Reactivos y soluciones	109
4.4.5 Instrumentación y software	109
4.5 Resultados y discusión	110
4.5.6 Optimización de los parámetros electroforéticos	110
4.5.6.6 Electrolito soporte	110
4.5.6.7 Elección del capilar	112
4.5.6.8 Modo de inyección	113
4.5.6.9 Voltaje aplicado	114
4.5.7 Condiciones finales	114
4.5.8 Parámetros analíticos	116
4.5.9 Aplicación a muestras reales	117
4.6 Conclusiones	119
4.7 Bibliografía	121
CAPÍTULO 5: Conclusiones Generales	124
APÉNDICE I: Productividad de la Tesis	
Publicaciones en Revistas Científicas	126
Revistas de divulgación	127
Presentaciones en Reuniones Científicas	128
APÉNDICE II: Becas obtenidas	130



CAPÍTULO 1

Introducción



1.1 Productos apícolas

La apicultura (del latín *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo)) es la técnica o arte dedicada a la cría y cuidado de las abejas con el objetivo de aprovechar sus productos y beneficios.

Los principales productos de la colmena se detallan a continuación:

1.1.1 Miel

El *oro dulce* es producido por las abejas a partir del néctar que recogen de las plantas. Por ser rica en azúcares es un alimento energético por excelencia. Es el alimento básico de la colonia a través del cual las abejas adquieren la energía necesaria para desarrollar todas las actividades.

1.1.2 Cera

Es una sustancia grasa (sólida) que las abejas obreras jóvenes producen a través de las glándulas cereras. Es utilizada para construir las paredes de las celdas donde la reina depositará los huevos, como así también para almacenar la miel y el polen. Este producto de la colmena es utilizado por el hombre en la industria de cosméticos, como así también para hacer velas y aceites.

1.1.3 Propóleos

Producto resinoso, de consistencia viscosa, elaborado por las abejas a partir de exudados de plantas. Dentro de la colmena es utilizado para la construcción,



reparación y protección de la misma. Por sus propiedades bactericida y fungicida se emplea también para mantener la asepsia en el interior de la colmena.

1.1.4 Jalea Real

Sustancia producida por las abejas empleando como materia prima polen, miel y agua. Es el alimento de las crías en sus tres primeros días de vida y el de la reina durante toda su vida.

1.1.5 Veneno

También conocido como apitoxina, es producido por el propio cuerpo de la abeja obrera quien lo utiliza exclusivamente como arma de defensa. Desde hace varias décadas se estudia su uso para finalidades terapéuticas.

1.1.6 Polen

El polen que se encuentra en la flor, en estado bruto, antes de ser recogido por la abeja se denomina polen floral. Cuando la abeja llega a la flor, comienza a recolectarlo aglutinándolo con secreciones bucales a modo de bolitas, para luego ser transportado a la colmena en un compartimiento especial ubicado en el tercer par de patas denominado cestilla de polen o corbícula, dando lugar a lo que se denomina polen corbicular. Por su elevado contenido en aminoácidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, vitaminas, enzimas y otros micronutrientes es fundamental para alimentar a la cría de las abejas como así también en la producción de jalea real, sustancia que nutre a las larvas y reinas.



Durante la recolección del polen, las abejas transportan los granos de una flor a otra, esta acción permite que se ponga en contacto el elemento masculino y femenino de la flor, para dar vida a una nueva semilla y así garantizar la reproducción de las especies vegetales. Este proceso de transporte del polen se lo conoce como **polinización**. En la naturaleza se efectúa a través del viento, la lluvia, los pájaros, y los insectos. Las abejas melíferas son insectos polinizadores altamente eficaces ya que tienen el cuerpo cubierto de pelos que recogen fácilmente miles de gránulos de polen cuando se mueven en el interior de las flores. En una sola jornada una abeja puede visitar miles de flores de una misma especie, recogiendo el néctar y el polen y esparciendo interminablemente los gránulos de polen por todas las flores ^[1].

1.2 Apicultura en Argentina

Debido a la diversidad del clima y las grandes extensiones de pastura natural, Argentina cuenta con una gran variedad de recursos florales que hacen posible que la actividad apícola se desarrolle en casi todo el territorio nacional ^[2-3]. Por otro lado, esta actividad tiene un alto valor social y económico, de la que dependen aproximadamente 30 mil productores, quienes en conjunto cuentan con alrededor de 5 millones de colmenas. Si bien de la apicultura se pueden obtener diversos productos, la miel es prácticamente el único de ellos que es explotado económicamente. El mercado interno en Argentina, está poco desarrollado debido a que los hábitos de consumo local de miel no son significativos (aproximadamente 200 g/per cápita/año) en comparación con



países con gran tradición en consumo, donde el volumen supera 1 Kg/per cápita/año. Este modelo de consumo hace que cerca del 95% de la producción de miel sea destinado a los mercados internacionales como producto a granel. Desde hace más de 25 años Argentina se ha consolidado como uno de los principales productores y exportadores de miel, internacionalmente reconocida por sus características organolépticas y su buena calidad.

1.2.1 Producción

Con una producción aproximada de 66.500 toneladas en el año 2013, Argentina se posicionó en el tercer lugar entre los principales productores de miel a nivel mundial ^[4].

China es el principal productor abarcando cerca del 35% del total de la producción, seguida por Turquía, Argentina, Ucrania, Estados Unidos y Rusia.

A pesar que Argentina se posiciona entre los primeros productores, en los últimos años se observó una drástica disminución de la producción de miel. De un promedio de 86.000 toneladas anuales en el periodo 2000-2008, la producción se redujo a 60.000 toneladas en el año 2009. Posteriormente, hubo un leve aumento pero hasta el momento no se ha alcanzado el máximo rendimiento. Esta disminución en la producción de miel en Argentina se debe a diversos factores. Los cambios climáticos que provocan sequías o inundaciones afectan los cultivos y por lo tanto la obtención del néctar para fabricar la miel. La disminución de la población de la colmena, a causa del uso indiscriminado de herbicidas (que pueden ser tóxicos para las abejas) o por el avance de las



enfermedades como el ácaro varroa (succionador de sangre), es otro factor que también influye en la obtención de este producto ^[5-6]. La Figura 1.1 muestra la evolución de la producción de miel de los últimos años.

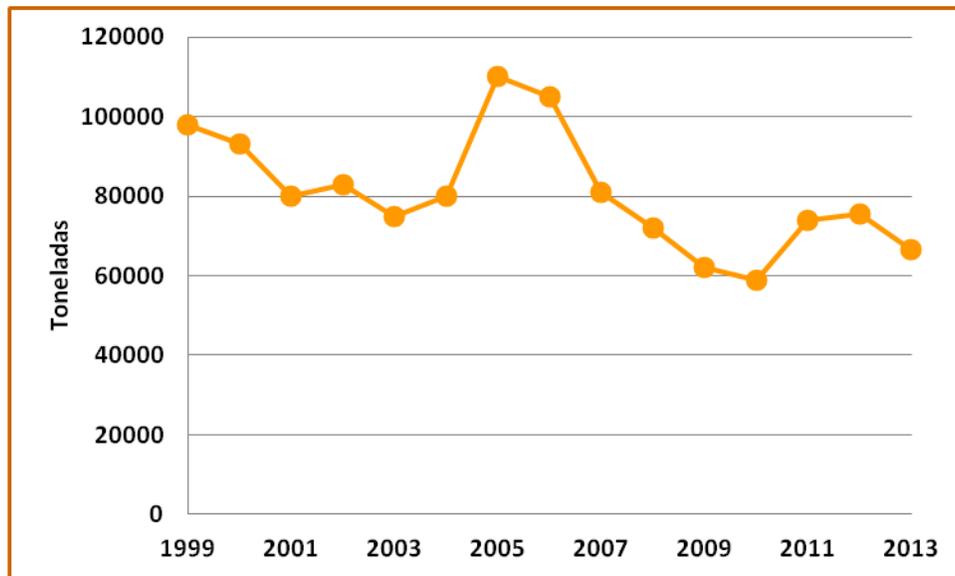


Figura 1.1. Producción de miel en Argentina.

Existe en Argentina una gran variedad de zonas productoras. En la Figura 1.2 se observa que si bien el principal polo productivo del país se concentra en la Provincia de Buenos Aires, abarcando aproximadamente un 50%, existe un gran auge de otras regiones localizadas en las Provincias de Córdoba, La Pampa Santa Fe y Entre Ríos.

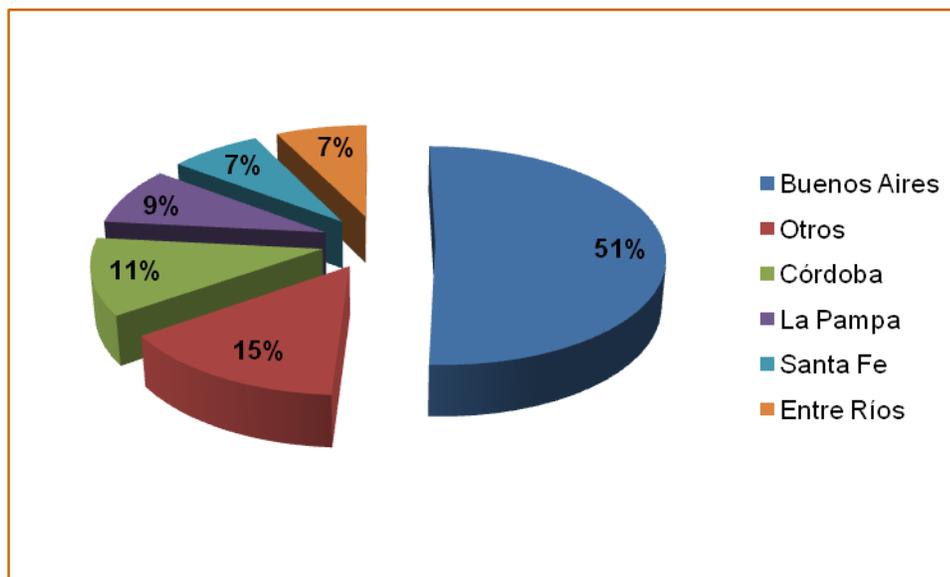


Figura 1.2. Distribución de la producción de miel en Argentina.

1.2.2 Exportación

Debido al bajo consumo a nivel local, el principal destino de la miel producida en Argentina es la exportación (95%). El 98% del producto comercializado es a granel y solo el 2% se exporta fraccionado.

En el año 2013 con alrededor de 65.000 toneladas exportadas, Argentina se posicionó segunda entre los principales exportadores a nivel mundial ^[7]. Esto representó un ingreso aproximado de 211 millones de dólares. Entre los principales destinos de exportación del sector apícola argentino se destacan: Estados Unidos (56%), Alemania (22%), Italia (4%), Japón (3%) y Francia (2%) (Figura 1.3).

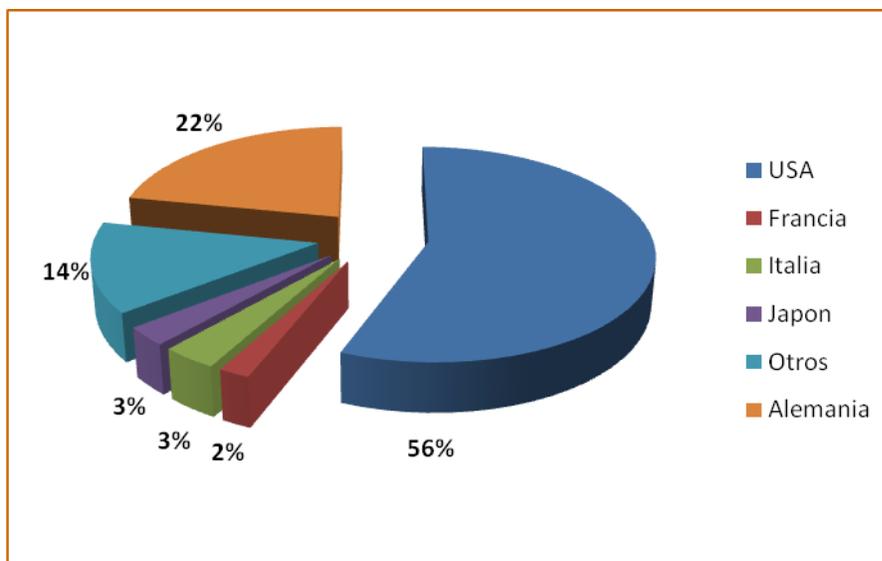


Figura 1.3. Principales destinos de la exportación de miel.

La miel argentina es valorada en el mundo por sus características organolépticas y físico-químicas demandándose para consumo directo de los mercados más exigentes. En la actualidad la preferencia de los consumidores está dirigida a alimentos sanos, naturales y amigables con el medio ambiente, entre los que la miel no es la excepción. En Argentina, las características que debe cumplir este producto de la colmena, están determinadas por las demandas de los mercados internacionales ya que el principal destino es la exportación.

El Plan Estratégico Argentina Apícola 2017 pretende que “Argentina en el año 2017 se transforme en líder mundial del mercado de productos apícolas altamente valorados sobre la base de un crecimiento y desarrollo organizado, competitivo y sostenible desde la perspectiva económica, social y ambiental”. Esto permitirá que nuestro país conserve y mejore su posición en el comercio mundial de la miel ^[8].



1.3 La miel de abejas

1.3.1 Definición

El Código Alimentario Argentino (C.A.A.) en su Art. 782 define Miel o Miel de Abeja como “el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenándolo en paneles, donde madura hasta completar su formación” [9].

Conforme el C.A.A. la miel puede ser clasificada según:

i) Su origen botánico

- ✓ Miel de flores: es la miel que procede principalmente de los néctares de las flores y se distinguen:
 - Monofloral: en la cual predomina el néctar de una especie, por ejemplo tomillo, eucalipto, lavanda, entre muchos otras.
 - Multifloral: no hay predominio de ningún néctar en especial. Este tipo de miel se obtiene a partir de varias especies vegetales diferentes y en distinta proporción.
- ✓ Miel de mielada: es la miel que procede principalmente de exudaciones de las partes vivas de las plantas o presentes en ellas.



ii) El procedimiento de obtención:

- ✓ Miel escurrida: se obtiene por escurrimiento de los panales desoperculados, sin larvas.
- ✓ Miel prensada: se obtiene por prensado de los panales sin larvas.
- ✓ Miel centrifugada: se obtiene por centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
- ✓ Miel filtrada: es la que ha sido sometida a un proceso de filtración sin alterar su valor nutritivo.

iii) Su presentación:

- ✓ Miel: es la miel en estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas.
- ✓ Miel en panales o miel en secciones: Es la miel almacenada por las abejas en celdas operculadas de panales nuevos, construidos por ellas mismas que no contengan larvas y comercializada en panal entero o secciones de tales panales.
- ✓ Miel con trozos de panal: es la miel que contiene uno o más trozos de panales con miel, exentos de larvas.
- ✓ Miel cristalizada o granulada: es la miel que ha experimentado un proceso natural de solidificación como consecuencia de la cristalización de la glucosa.
- ✓ Miel Cremosa: es la miel que tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura y que la haga fácil de untar.



iv) Su destino:

- ✓ Miel para consumo directo: es la que responde a los requisitos generales establecidos por el C.A.A.
- ✓ Miel para utilización en la industria: Es la que responde a los requisitos indicados en el punto 4.2 del C.A.A., excepto el índice de diastasa y el contenido de hidroximetilfurfural que podrán ser menor que 8 (en la escala de Gothe) y mayor que 40 mg/kg respectivamente. Sólo podrá ser empleada en la elaboración industrial de productos alimenticios.

1.3.2 Composición

Diversos factores tales como la flora melífera, el clima, la composición del suelo o la ubicación del apiario determinan los componentes que están presentes en este producto de la colmena ^[10-12].

La miel es una mezcla compleja compuesta en su mayoría por hidratos de carbono, principalmente glucosa y fructosa. Ambos monosacáridos constituyen el 70% de la miel, donde la fructosa está presente en un 38% y la glucosa en un 32% aproximadamente ^[13-14]. Otros azúcares presentes son disacáridos como la sacarosa y la maltosa. El segundo constituyente mayoritario es el agua que se encuentra presente en un 17%. Por otro lado contiene minerales tales como potasio, sodio, calcio, magnesio y fósforo ^[15-16]. La presencia de ácido glucónico que proviene de la actividad de la enzima glucosa oxidasa, es principal responsable de la acidez de la miel (pH 3,20-4,50). En menor cantidad también contribuyen otros ácidos como el acético, butírico, láctico, cítrico, succínico,



fórmico, maléico, málico y oxálico. Además, la miel contiene numerosos aminoácidos, siendo la prolina el aminoácido libre que se encuentra en mayor proporción, constituyendo entre el 50-85% con respecto a los demás aminoácidos^[17-18].

1.3.3 Requisitos de calidad

Los requisitos que debe cumplir la miel según las reglamentaciones vigentes son las que se mencionan a continuación:

1.3.3.1 Características sensoriales

i) Color. La miel presenta colores variables, desde casi incolora hasta pardo oscuro lo cual se debe a la presencia de pigmentos (carotenos y xantofila) y polifenoles^[19]. Está relacionado con el origen botánico y la composición del néctar. Es la propiedad más importante de la miel desde el punto de vista comercial ya que determina su precio. A nivel internacional cada miel tiene un valor diferente en cada mercado, dependiendo su coloración.

ii) Sabor y aroma. La miel presenta el sabor y el aroma característico de los de la planta de la cual las abejas han obtenido el néctar^[20]. El aroma es un indicador de la frescura de la miel ya que si tiene notas de alcohol, puede deberse a que se está iniciando un proceso de fermentación.



iii) Consistencia. La miel puede ser fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente. Esta característica depende del grado de humedad y de la temperatura de almacenamiento ^[21].

1.3.3.2 Características físico-químicas

i) Madurez

a) Azúcares reductores (calculados como azúcar invertido):

Miel de flores: mínimo 65%.

Miel de mielada y su mezcla con miel de flores: mínimo 60%.

b) Sacarosa aparente:

Miel de flores: máximo 8%

Miel de mielada y sus mezclas: máximo 10%

Los principales azúcares de miel son la fructosa y la glucosa. Otros azúcares presentes son disacáridos como la sacarosa y la maltosa. El tipo de alimentación que reciben las abejas como así también las adulteraciones con agregados de glucosa comercial provoca la variación del contenido de azúcar de la miel.

c) Humedad: el límite máximo permitido es 20%

Es una de las características más importantes ya que además de indicar el grado de madurez de la miel también determina su grado de conservación. Este parámetro está relacionado con las condiciones



climáticas y el manejo de la miel por parte de los productores. En ciertos casos, el porcentaje de humedad de la miel es más elevado que lo establecido por diversas razones. La más común se da cuando el apicultor realiza la extracción de la miel sin que el panal este completamente operculado (cuando las celdas están cubiertas por una capa de cera), es decir que la miel extraída no ha adquirido la humedad adecuada (falta de maduración de la miel). Otra forma en que varía el porcentaje de humedad es durante el almacenamiento ya que como toda solución sobresaturada, la miel es higroscópica y por lo tanto tiende a ceder o absorber humedad hasta alcanzar un estado de equilibrio.

Un elevado porcentaje de agua favorece el crecimiento de mohos y levaduras, por lo tanto la miel se fermenta fácilmente.

ii) Limpieza

a) Sólidos insolubles en agua: se admite un límite máximo de 0,1%.

La cuantificación de este parámetro permite detectar las impurezas presentes en la miel, materias extrañas como partes del cuerpo de las abejas, cera, propóleos, granos de arena, trocitos de madera, entre otros. Debido a que la miel es sometida a un proceso de filtración y sedimentación para eliminar las impurezas, un valor que supere el máximo permitido puede indicar que los procedimientos antes mencionados no se realizaron en forma adecuada.



b) Cenizas (minerales)

Miel de flores: máximo 0,6%

Miel de mielada y sus mezclas: máximo 1,0%

Este parámetro expresa el contenido de sales minerales de la miel y se relaciona con la higiene de la miel ya que puede haber restos de arena o tierra. Por otro lado, el contenido de minerales permite diferenciar las mieles de néctar, de las de mielada (que son más ricas en minerales) mediante la determinación de la conductividad eléctrica ^[22].

iii) Deterioro

a) Fermentación. La miel no deberá tener indicios de fermentación ni ser efervescente. Las mieles fermentadas poseen un mayor valor de acidez, por ello que se establece un máximo de 40 miliequivalentes por kilogramo de acidez libre.

La presencia de ácidos orgánicos en equilibrio con sus correspondientes lactonas caracteriza la acidez de la miel. La variación de este parámetro está relacionada con los procesos de fermentación. Esto se debe a que los azúcares y alcoholes propios de la miel se transforman en ácidos por las levaduras presentes.



b) Grado de frescura

- ✓ Actividad diastásica: como mínimo 8 en la escala de Gothe.

La enzima diastasa es añadida por las propias abejas en el proceso de obtención de la miel. Si bien es un parámetro que varía con el origen floral, el mínimo establecido por las normativas ha resultado útil como parámetro de calidad ya que indica el grado de frescura, envejecimiento o calentamiento de la miel. Debido a que este parámetro varía con la temperatura y el pH, bajos niveles de diastasa pueden indicar adulteración o manejo incorrecto del producto por parte del apicultor.

- ✓ Hidroximetilfurfural (HMF): el máximo permitido es 40 mg/kg.

Las condiciones de almacenamiento, tratamiento realizado a la miel y edad se ven reflejadas en el contenido de HMF. En las mieles frescas prácticamente este compuesto no se encuentra presente. La existencia de este aldehído se debe a la deshidratación de la fructosa por la existencia de ácidos, proceso que ocurre durante el almacenamiento de la miel. Esto depende fundamentalmente de las condiciones de pH y temperatura a las cuales la miel es almacenada.

Este parámetro puede aumentar cuando la miel se sobrecalienta (se expone a una temperatura mayor de 40°C).



c) Contenido de polen

La miel tendrá su contenido normal de polen el cual no debe ser eliminado en el proceso de filtración.

1.3.3.3 Higiene

Además de los parámetros antes mencionados, en todos los casos que se exporte miel a granel, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) puso en vigencia, a partir del año 1998, el Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene de Alimentos (CREHA) ^[23]. En este plan se detallan los análisis requeridos para detectar la presencia de sustancias como antibióticos o plaguicidas, que superen los límites máximos permitidos. El principal objetivo es garantizar la salud de los consumidores asegurando la calidad y la inocuidad de la miel.

Por su parte, el C.A.A. establece que *“la miel deberá estar exenta de sustancias inorgánicas u orgánicas extrañas a su composición tales como insectos, larvas, granos de arena y no exceder los máximos niveles tolerables para contaminaciones microbiológicas o residuos tóxicos”*.

1.3.4 Importancia del control de calidad de la miel

Establecer la calidad de la miel tiende a asegurar un producto genuino al consumidor y a los mercados que la importan. Según la norma ISO 9000 la calidad puede definirse como *“el conjunto de propiedades y características de un*



producto o servicio que le confieren su actitud para satisfacer necesidades al consumidor” ^[24].

Debido a que la miel producida en Argentina se destina, en un alto porcentaje al mercado externo, no solo debe cumplir con las exigencias nacionales sino también con los requisitos de los principales mercados compradores como EEUU, Unión Europea y Japón.

Dentro del territorio nacional el Código Alimentario Argentino en forma conjunta con el Reglamento Técnico del Mercosur de Identidad y Calidad de la Miel, establecen los requisitos que debe cumplir la miel para consumo humano, con el objeto de proteger la salud del consumidor y la buena fe de las transacciones comerciales ^[9].

Por otro lado, el Codex Alimentarius ^[25], a través de sus normas alimentarias adoptadas internacionalmente, contribuye a que los sistemas nacionales de control de los alimentos fijen criterios de protección de la salud de los consumidores y garanticen la equidad del comercio internacional.

En la actualidad, la mayoría de los controles de rutina establecidos para determinar los diferentes parámetros de calidad de la miel resultan laboriosos y demandan gran cantidad de tiempo. Por ello, el desarrollo de nuevos métodos analíticos, resulta conveniente para resolver los problemas o limitaciones que presentan las técnicas habituales y podrían incorporarse en los Laboratorios de Control de Calidad.



1.4 Bibliografía

- [1] Polinización en alfalfa. Producción de semillas. Ing. Agr. Juan Manuel Raigón. INTA.
- [2] M. Cabrera, A. Andrada, L. Gallez. Boletín de la Sociedad. Argentina de Botánica, 48 (2013) 477.
- [3] A. Forcone, M. Muñoz. Boletín de la Sociedad. Argentina de Botánica, 44 (2009) 393.
- [4] C. Blengino. Sector apícola 2013 – Informe de coyuntura N°3. Área de Estudios Sectoriales. Dirección de Agroalimentos.
- [5] K. M. Kasiotis, C. Anagnostopoulos, P. Anastasiadou, K. Machera. Science of the Total Environment 485–486 (2014) 633
- [6] B. Łozowicka. Ecotoxicology and Environmental Safety 97 (2013) 210
- [7] Informe Económico de Coyuntura, N°352, Junio 2014, Año 32.
- [8] PLAN ESTRATÉGICO ARGENTINA APÍCOLA 2017. Dirección Nacional de Alimentos - Área Apícola.
- [9] Código Alimentario Argentino, Capítulo X, Alimentos Azucarados. Actualizado al 9/2010.
- [10] M.J. Borrás, E. Domenech, M. Hellebrandova, I. Escriche. Food Research International 60 (2014) 86.
- [11] E.F. Boffoa, L.A. Tavares, A.C.T. Tobias, M.C. Ferreira, A.G. Ferreira. LWT - Food Science and Technology 49 (2012) 55.
- [12] L.C. Vázquez, M.C. Díaz-Maroto, C. de Torres, M.S. Pérez-Coello. Food Research International 43 (2010) 2335.



- [13] M. Musa Özcan, .C. Ölmez. Food Chemistry 163 (2014) 212.
- [14] H.M. Habib, F.T. Al Meqbali, H. Kamal, U.D. Souka, W.H. Ibrahim. Food Chemistry 153 (2014) 35.
- [15] L.P. Vanhanen, A. Emmertz, G.P. Savage. Food Chemistry 128 (2011) 236.
- [16] C. de Alda-Garcilope, A. Gallego-Picó, J.C. Bravo-Yagüe, R.M. Garcinuño-Martínez, P. Fernández-Hernando. Food Chemistry 135 (2012) 1785.
- [17] R. Rebane, K. Herodes. Analytica Chimica Acta 672 (2010) 79.
- [18] C. Truzzi, A. Annibaldi, S. Illuminati, C. Finale, G. Scarponi. Food Chemistry 150 (2014) 477.
- [19] J.M.A. Suarez, S. Tulipani, D. Díaz, Y. Estevez, S. Romandini, F. Giampieri, E. Damiani, P. Astolfi, S. Bompadre, M. Battino. Food and Chemical Toxicology 48 (2010) 2490.
- [20] V. Kaškonienė, P.R. Venskutonis, V. Ceksteryte. Food Chemistry 111 (2008) 988.
- [21] M. Oroian. Journal of Food Engineering 119 (2013) 167.
- [22] A.B. Manzanares, Z.H. García, B.R. Galdón, E.R. Rodríguez, C.D. Romer. Food Chemistry 126 (2011) 664.
- [23] Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Plan Nacional de Residuos e Higiene en Alimentos, PLAN CREHA 2012.
- [24] Norma Internacional ISO 9000. Sistemas de gestión de la calidad - Fundamentos y vocabulario
- [25] Codex Alimentarius. <http://www.codexalimentarius.org/>.



OBJETIVO GENERAL



Objetivo general

El Objetivo General de este trabajo de Tesis Doctoral consistió en desarrollar nuevos métodos analíticos que permitan evaluar la calidad de muestras de miel procedentes de la región del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires. Para ello se abordaron tres aspectos fundamentales en la evaluación de la calidad: higiénico-sanitaria, sensorial y nutritiva.

La concreción de estos aspectos fue enfocada en el desarrollo de los siguientes estudios:

- ***Determinación de mercurio empleando un sistema automático Flow-Batch.***
- ***Análisis de imágenes digitales de muestras de miel en combinación con técnicas multivariadas para la:***
 - ✓ ***Clasificación de acuerdo a su origen geográfico empleando un sistema Flow-Batch.***
 - ✓ ***Determinación de color.***
- ***Determinación simultánea de hidratos de carbono y prolina mediante la técnica de Electroforesis Capilar.***



CAPÍTULO 2

Determinación de mercurio en mieles de Argentina empleando un sistema Flow-Batch



2.1 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue diseñar un sistema automático Flow-Batch para la determinación de mercurio en muestras de miel de la Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Este sistema incluye dos cámaras de vidrio acopladas para llevar a cabo la digestión de la muestra y la posterior detección del metal empleando la técnica de espectrometría de absorción atómica por vapor frío.



2.2 Introducción

La miel es considerada un alimento natural, saludable y limpio. Sin embargo en la actualidad, la presencia de contaminantes en el ambiente donde se encuentran los apiarios, disminuye la calidad e inocuidad de este alimento.

El apicultor es el principal responsable de la obtención de un producto que cumpla con los requisitos establecidos y se encuentre libre de sustancias indeseadas. La ubicación de los apiarios cerca de zonas industriales o urbanas y del tráfico automotriz, la manipulación incorrecta durante el procesamiento de la miel y/o el uso de agroquímicos y pesticidas sobre la flora melífera o en zonas cercanas a la ubicación de la colmena, pueden provocar que sus productos presenten sustancias ajenas a su composición las cuales pueden ser perjudiciales para la salud de los consumidores. Dichas sustancias indeseadas pueden entrar en contacto con la miel de forma directa o indirecta. La contaminación **directa** de la colmena se produce por un mal manejo por parte del apicultor, en la aplicación de productos para el control de enfermedades. En estos casos suelen utilizarse algunos principios activos como amitraz, cumafos, tetraciclinas y cloranfenicol ^[1] para prevenir y combatir varroasis (enfermedad producida por el ácaro varroa) y Loque America y Europea (enfermedad bacteriana). La ingesta de miel contaminada, puede provocar al consumidor alergias, daño en el hígado, resistencia a las bacterias, entre otros problemas. Por otro lado la contaminación **indirecta** puede ser ocasionada debido a que cada colmena melífera cuenta con alrededor de 10.000 abejas obreras. Éstas realizan un promedio de 10 viajes por día cubriendo un área aproximada de 7



km² alrededor del apiario, recolectando néctar, agua y polen de las flores ^[2-3]. Debido a que el cuerpo de las abejas está cubierto de pelos, durante su vuelo pueden entrar en contacto y capturar diversas sustancias suspendidas en el aire como partículas de polvo, microorganismos o productos químicos, los cuales son transportados a la colmena. Estos contaminantes no solo se acumulan en el cuerpo de la abeja, sino que también pueden transferirse a los productos de la colmena: miel, cera, propóleos, etc. Por lo tanto, las abejas y sus productos pueden servir como bioindicadores de contaminación ambiental en su área de vuelo y esa contaminación puede relacionarse con el origen geográfico o botánico ^[4-5], ya que el análisis polínico de la miel permite conocer los lugares que ha visitado la abeja.

Dentro de los contaminantes, la miel puede contener metales potencialmente tóxicos que provienen de zonas industriales y urbanas, el tráfico automotriz, la incorrecta manipulación durante el procesamiento y de productos agroquímicos y plaguicidas ^[6-7]. Entre estos metales, el **mercurio** merece especial atención por su habilidad para acumularse en formas muy tóxicas en la cadena alimenticia, en ecosistemas acuáticos y en el cuerpo humano y transformarse en mercurio orgánico (metilmercurio) ^[8-9]. La determinación de los niveles de mercurio en los alimentos es muy significativa para poder evaluar los riesgos de la exposición por la ingesta de alimentos. Existen en bibliografía numerosos métodos para la determinación de mercurio total y la mayoría de ellos utiliza la técnica de espectroscopia de absorción atómica por vapor frío (CV-AAS) ^[10-11].

El método oficial establecido por la AOAC (Association of Official Analytical



Chemist) para la determinación de mercurio en alimentos emplea espectrometría de absorción atómica e involucra varios pasos. En primer lugar se lleva a cabo una digestión ácida de la muestra empleando ácidos sulfúrico y nítrico y una solución de molibdato de sodio. En un segundo paso, una alícuota del digesto se diluye con una solución que contiene ácido nítrico y ácido sulfúrico. Posteriormente se efectúa la determinación de mercurio empleando una solución reductora (sulfato de hidroxilamina y cloruro estannoso en medio ácido) y se registra la señal a 253,7 nm ^[12].

Por su composición química, la miel es considerada una matriz compleja. Los compuestos orgánicos presentes pueden interferir en la determinación de mercurio. Por esta razón, es necesario llevar a cabo un proceso de digestión para eliminar las posibles interferencias causadas por la matriz. Comúnmente, estos procesos involucran calentamientos prolongados con diferentes mezclas de ácidos ^[13] (clorhídrico, nítrico, perclórico y sulfúrico) y compuestos oxidantes o complejantes como peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, clorato de potasio, clorato de sodio y aniones de ácidos orgánicos como citratos o tartratos^[14]. Debido a esto es necesario optimizar las variables involucradas en estos procesos de digestión. Por ello, la aplicación de herramientas quimiométricas para la optimización, presenta la ventaja de reducir el número de experimentos y evaluar los efectos de cada variable como así también la interacción entre ellas. Actualmente, los procesos de digestión han evolucionado gradualmente para enfocar los esfuerzos en obtener mayor rapidez, simplificación, miniaturización y automatización de las operaciones involucradas^[15].



2.2.1 Diseño experimental Box-Behnken

El diseño de experimentos es una herramienta quimiométrica a través de la cual se estudia el comportamiento de diferentes combinaciones de factores o variables que al cambiar afectan un determinado proceso. De forma general, se aplica a sistemas en los cuales una o más variables experimentales denominadas respuestas (y) dependen de los valores de uno o más factores controlables, denominados variables independientes (x), y todas ellas deben ser ajustadas para obtener una óptima respuesta (máxima intensidad de señal, óptima separación de picos, mínimo error relativo, etc.)

El diseño de experimentos es una técnica orientada a problemas multivariantes que permite:

- ✓ Reducir la cantidad de experimentos y por lo tanto el tiempo de análisis, la cantidad de reactivos empleados y la generación de residuos.
- ✓ Obtener una estimación precisa de los efectos de cada factor sobre la respuesta de interés.
- ✓ Estimar la interacción entre cada factor.
- ✓ Obtener una ecuación polinómica que modele el comportamiento de la respuesta cuando se varían los factores que la afectan.

En esta Tesis para la optimización de las variables que afectan el proceso de digestión de la muestra, se empleó el diseño experimental Box-Behnken (DBB). Este diseño constituye una alternativa al diseño central compuesto. Es una clase de diseño experimental de segundo orden, basado en un diseño factorial



incompleto de tres niveles. La Figura 2.1 muestra un DBB para tres factores. El mismo puede interpretarse como tres planos, cada uno de los cuales consta de cuatro experimentos. En cada plano, dos variables conforman un diseño factorial completo de dos niveles mientras la variable restante esta nivelada a cero. El DBB presenta la ventaja de que el estudio de tres variables requiere solamente de 13 experimentos (incluyendo el punto central) y que cada variable es estudiada en tres niveles (denominados -1, 0 y +1 que corresponden al valor máximo, medio y mínimo de la variable en estudio), lo que puede resultar importante en determinadas situaciones experimentales. Este diseño no incluye experimentos en los cuales todos los factores están al menor y/o al mayor nivel, lo que es útil si se quiere evitar realizar experimentos en condiciones extremas (vértices del cubo en la Figura 2.1) los cuales pueden generar resultados no deseados o poco satisfactorios. Por el contrario, cuando se precisa conocer la respuesta en los niveles máximos o mínimos de las variables, no es adecuado emplear este diseño.

El DBB es uno de los más eficientes ^[16-17] y ha sido aplicado en la optimización de factores químicos en el análisis de alimentos ^[18], procesos de tecnologías de alimentos ^[19], estudios microbiológicos ^[20-21] y análisis farmacéutico ^[22-23], entre otros. Sin embargo en la literatura, no existe información sobre la optimización de las variables experimentales que afectan la digestión de la muestra de miel, empleando un diseño experimental Box-Behnken.

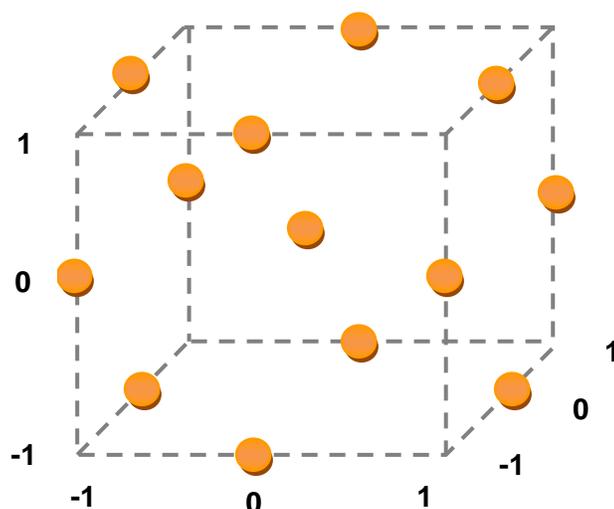


Figura 2.1 Diseño experimental Box-Behnken para tres variables. Cada variable puede ser estudiada en tres niveles (1, 0, -1).

2.2.2 Metodología Flow-Batch

Los sistemas Flow-Batch (FB) fueron desarrollados por Araújo y col. en el año 1999 ^[24] y desde entonces, debido a su gran versatilidad, rapidez, precisión, facilidad de operación y bajos costos se han utilizado en diferentes aplicaciones, entre las que se pueden mencionar: determinaciones fluorescentes con extracción en línea ^[25], titulaciones ^[26-27], determinación de manganeso en agua^[28], análisis exploratorios ^[29], nefelometría ^[30], turbidimetría ^[31], quimioluminiscencia ^[22], determinaciones enzimáticas ^[32], procesos de extracción^[33] y determinaciones espectrométricas ^[34].

Estos sistemas, pueden considerarse híbridos, ya que combinan las ventajas intrínsecas de los sistemas de flujo continuo con las ventajas inherentes a los métodos en batch.



Los componentes básicos de un sistema FB son:

- ✓ Sistema de propulsión: usualmente se utilizan bombas peristálticas las cuales son las encargadas de propulsar los fluidos por el sistema.
- ✓ Cámara de mezcla/reacción: es el lugar donde confluyen la muestra, el medio y los reactivos, de manera secuencial o simultánea. Aquí se producen los procesos químicos, físicos o físico-químicos.
- ✓ Válvulas solenoides de tres vías, las cuales dirigen los fluidos hacia la cámara de mezcla o hacia los reservorios a través de tubos de bomba.
- ✓ Accionador electrónico: permite accionar las válvulas solenoides para permitir el paso de las diferentes soluciones hacia la cámara de mezcla.
- ✓ Interfase de control: es la encargada de enviar las señales de control desde el puerto paralelo de la computadora hacia el accionador.
- ✓ Computadora y software: empleando diferentes lenguajes de programación, como por ejemplo LabView®. Con ello es posible controlar todos los componentes del sistema y todos los pasos del proceso pueden llevarse a cabo de forma automática.
- ✓ Detector: el cual monitorea la señal analítica de interés.

Los sistemas FB presentan importantes ventajas debido a que permiten una elevada frecuencia de muestreo, menores costos por análisis y menor consumo de reactivos y muestras. Al ser un sistema automático, se reduce también la participación humana y la cantidad de residuos tóxicos generados, cumpliendo con los principios de la Química Verde.



Como puede apreciarse esta metodología es una alternativa importante a los métodos convencionales ya que permite la automatización de diversos procesos analíticos.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 mΩ) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- ✓ Solución estándar de mercurio: se disolvieron 7,0 mg de nitrato de mercurio (I) (Merck) en 5 mL de ácido nítrico 65% (Merck) y se llevó a volumen de 50,0 mL con agua. Esta solución se estabilizó con el agregado de 0,5 mL de permanganato de potasio 5,0%.
- ✓ Solución de trabajo de mercurio 0,1 mg L⁻¹: se preparó mediante la correspondiente dilución de la solución estándar.
- ✓ Cloruro de estaño (II) 15%: se preparó disolviendo 17,8 g de cloruro de estaño (II) dihidratado (Mallinckrodt) en 50 mL de ácido clorhídrico (Merck) y se llevó a volumen con agua.
- ✓ Solución de peróxido de hidrogeno 30% (v/v) (Cicarelli).
- ✓ Ácido nítrico 65% (p/v) (Merck).
- ✓ Ácido clorhídrico 37% (p/v) (Merck).
- ✓ Diferentes muestras comerciales de miel provenientes de la Provincia de Buenos Aires, se obtuvieron en supermercados y se mantuvieron a 4°C.



2.3.2 Instrumentación y software

- ✓ Analizador de mercurio SMT modelo Seefelder Messtechnik Hg Monitor 3000 (CV-AAS).
- ✓ Bomba peristáltica de ocho canales Gilson Minipuls-3 M312.
- ✓ Agitador magnético Hanna modelo HI 190M.
- ✓ Válvulas solenoides de tres vías modelo 137 161T031, Nresearch.
- ✓ Tubos de bomba Tygon® de diferentes diámetros internos.
- ✓ Lámpara halógena de 24 V.
- ✓ Accionador electrónico de válvulas.
- ✓ Cámaras de mezclado y de digestión de vidrio borosilicato fabricadas en nuestro laboratorio.
- ✓ Labview 5.1 (National Instruments, Austin, TX).
- ✓ Statgraphics Plus para Windows 5.1. Statistical Graphics Corp.

2.3.3 Sistema Flow-Batch

El sistema Flow-Batch está compuesto por dos cámaras de vidrio de borosilicato diseñadas en el laboratorio y fabricadas en el taller de vitroplastia dependientes del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur. Una cámara (CD) se empleó para llevar a cabo el proceso de digestión de la muestra y la segunda se utilizó como cámara de mezcla (CM). Las soluciones de ambas cámaras se homogenizaron mediante agitación magnética. Para permitir el paso de las soluciones hacia las cámaras se utilizaron nueve válvulas solenoides de tres vías: V_{ac} (ácido nítrico), V_p (peróxido de hidrógeno), V_{a1} y V_{a2}



(agua), V_r (agente reductor de mercurio), V_1 (muestra digerida/ solución de trabajo de mercurio/aire), V_2 (solución de trabajo de mercurio/ aire). Para eliminar los líquidos de las cámaras hacia el recipiente de desecho, se emplearon las válvulas V_{d1} y V_{d2} .

La CD está compuesta por un recipiente de vidrio de borosilicato de 35 mL de volumen interno acoplado a un dispositivo que sostiene una lámpara halógena de 24 V, la cual permite obtener la temperatura óptima de digestión (Figura 2.2). Empleando esta lámpara se logra un calentamiento homogéneo ^[15]. El dispositivo que protege a la lámpara de los gases que se producen durante la digestión, fue construido con vidrio de borosilicato y presenta un orificio que permite la salida de los mismos.



Figura 2.2. Cámara de digestión.



En la Figura 2.3 se muestra la cámara de mezcla (CM), que está constituida por dos piezas de vidrio: la superior es un cuerpo de vidrio tapado por una tapa plástica que posee orificios para la entrada de las soluciones. Una salida lateral, permite que emerjan los vapores de mercurio hacia el detector. La pieza inferior de 50,0 mL de capacidad, tiene un orificio en la base para realizar la evacuación de los residuos.



Figura 2.3. Cámara de mezcla.

El sistema se colocó bajo una campana de extracción y se empleó una trampa con carbón activado como adsorbente para la eliminación de los vapores generados.



2.3.4 Procedimiento desarrollado

A continuación se describen los distintos pasos del procedimiento:

- ✓ *Llenado de canales:* Antes de comenzar el análisis, los canales deben ser llenados con las respectivas soluciones. Para ello se activan por 5 segundos las válvulas que permiten el paso de las soluciones hacia ambas cámaras. Luego se descartan las soluciones en el recipiente de desecho accionando V_{d1} y V_{d2} durante 15 segundos. Esta operación se realizó siempre que se cambia una solución en un canal determinado.

- ✓ *Lavado de las cámaras:* se llevó a cabo accionando las válvulas que transportan el agua hacia las cámaras (V_{a1} y V_{a2}). Posteriormente se accionan las válvulas V_{d1} y V_{d2} con el objeto de evacuar el líquido de lavado. Se realizaron dos lavados de ambas cámaras, entre las medidas efectuadas.

- ✓ *Digestión de la muestra:* se colocaron 8 g de miel en la CD y se accionaron las válvulas de ácido nítrico (V_{ac}) y peróxido de hidrógeno (V_p) durante el tiempo correspondiente al volumen requerido. Luego se colocó el dispositivo de vidrio que sostiene la lámpara y se la encendió mediante la aplicación de un voltaje empleando una fuente de poder. Esto permitió obtener la temperatura adecuada para llevar a cabo la digestión de la muestra. Este paso se llevó a cabo por un lapso de 16 minutos con agitación magnética. Durante este tiempo se pudo observar el



desprendimiento de gas anaranjado correspondiente a la eliminación de NO_2 . Finalmente se accionó la válvula V_{a1} para llevar a un volumen final de 20 mL.

- ✓ *Determinación de mercurio:* una vez que el proceso de digestión finalizó, se accionó la válvula V_1 permitiendo el ingreso de 510 μL de la solución de la muestra digerida a la cámara de mezcla. Luego se agregó agua accionando la válvula V_{a2} y finalmente se adicionó el agente reductor activando la válvula V_r . De esta forma se generaron los vapores de mercurio. La determinación se realizó a 253,7 nm. Durante todo el procedimiento se mantuvo una agitación constante y controlada para garantizar una buena homogeneización de las soluciones y mejorar la sensibilidad analítica.
- ✓ *Preparación de testigos:* fueron preparadas accionando las válvulas V_1 - V_2 y V_{a2} incrementando y disminuyendo el tiempo de apertura respectivamente. Para cada solución testigo la cantidad de agente reductor se mantuvo constante mediante el agregado del mismo al accionar la válvula V_r .

En la Figura 2.4 se muestra un diagrama del sistema FB propuesto.

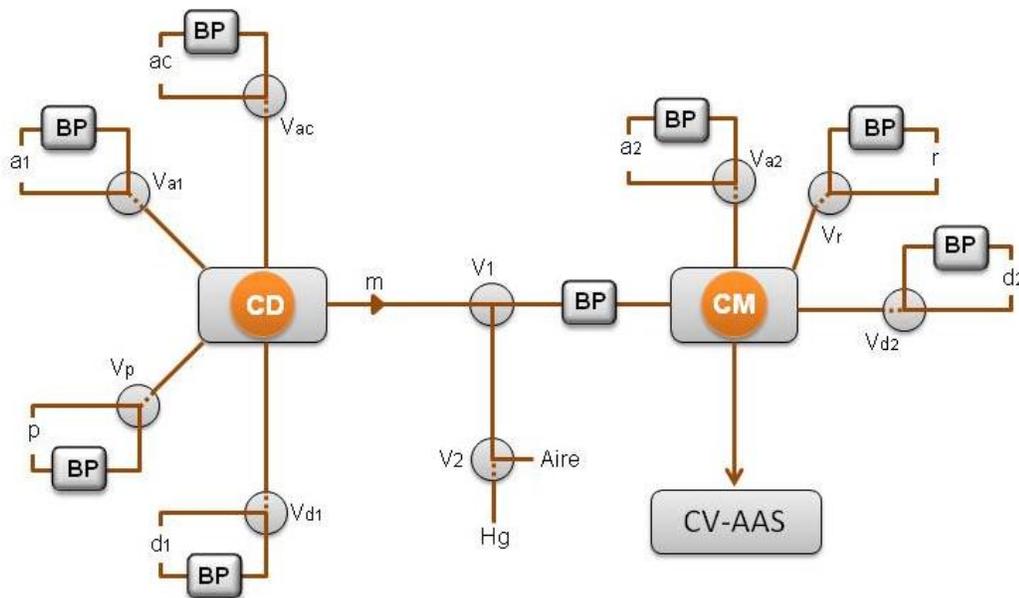


Figura 2.4. Sistema Flow-Batch.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Optimización del proceso de digestión

Para seleccionar los parámetros involucrados en la digestión de la muestra de miel, en una primera etapa se realizaron estudios preliminares empleando distintas relaciones de ácido nítrico, ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno, evaluando la influencia de la temperatura y el tiempo de digestión [35-36]. Estos estudios demostraron que la combinación de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno es la adecuada para obtener la digestión completa de la muestra en una hora, trabajando a 100 °C. Con la finalidad de optimizar estos parámetros, en una segunda etapa, se empleó un diseño experimental Box-Behnken. Los



factores estudiados fueron: tiempo de digestión (X_1), volumen de ácido nítrico (X_2) y volumen de peróxido de hidrógeno (X_3) en tres niveles: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). Los niveles correspondientes a cada factor se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Niveles correspondientes a los factores estudiados.

Variable	Min (-)	Medio (0)	Max (+)
X_1 : Tiempo de digestión (min)	10,0	15,0	20,0
X_2 : Ácido nítrico (mL)	6,0	8,0	10,0
X_3 : Peróxido de hidrógeno (mL)	4,0	6,0	8,0

De este modelo surgen 15 experimentos (incluyendo tres réplicas del punto central, es decir con todas las variables en el nivel medio) como se observa en la Tabla 2.2. En todos los casos se trabajó a 100° C.

Para poder llevar a cabo la optimización, se empleó la misma muestra de miel en todos los casos. A esta muestra se le adicionó una determinada cantidad de mercurio y se procedió a realizar las 15 digestiones. El contenido de mercurio en cada digesto se determinó mediante CV-AAS. La respuesta evaluada (R) fue el porcentaje de recuperación de mercurio correspondiente a la adición del metal en la muestra. El criterio de optimización fue el mejor porcentaje de recuperación.



Tabla 2.2. Niveles de los factores para un diseño Box-Behnken.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

El diseño experimental Box-Behnken permitió calcular los efectos que producen cambios en las variables y sus posibles interacciones. La Figura 2.5 muestra el gráfico de Pareto donde se observan los efectos estimados en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, que se define como el efecto estimado sobre el error estándar, lo que es equivalente a realizar un test t de student para cada efecto. La línea vertical juzga cuales de los efectos son estadísticamente significativos. Las barras que superan dicha línea corresponden a los efectos que son significativos con un nivel de confianza de 95%. Como se puede observar, el factor X₁ (tiempo



de digestión) y la interacción $X_1 \cdot X_2$ no son significativas en el nivel de confianza de 95%. Es por ello que estos efectos no se consideraron.

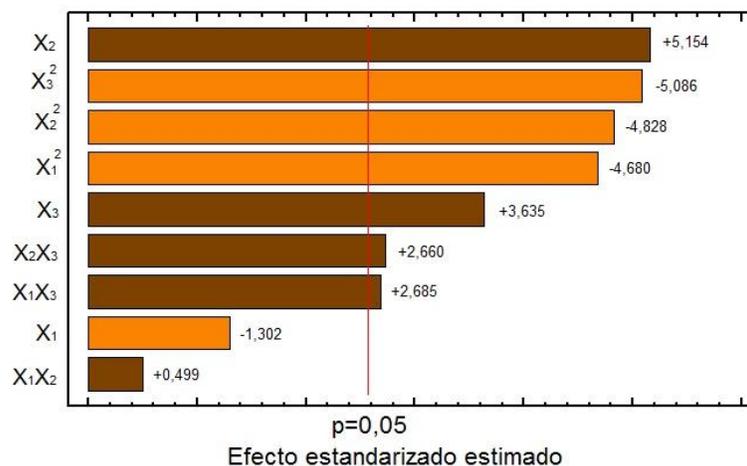


Figura 2.5. Gráfico de Pareto.

Las respuestas correspondientes a cada uno de los experimentos del diseño experimental se ajustaron al siguiente polinomio de segundo orden:

$$R = -6,35 X_1^2 - 6,55 X_2^2 - 6,9 X_3^2 - 4,75 X_2 + 3,35 X_3 + 3,5 X_1 X_3 + 3,55 X_2 X_3 + 92,7$$

$(\pm 1,35)$ $(\pm 1,35)$ $(\pm 1,35)$ $(\pm 0,9)$ $(\pm 0,9)$ $(\pm 1,3)$ $(\pm 1,3)$ $(\pm 1,5)$

Donde R es la variable dependiente y X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes como se ha mencionado anteriormente. Para evaluar la calidad de ajuste se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 2.3. Para el modelo cuadrático propuesto no se observa evidencia de falta de ajuste, ya que el cociente entre la media cuadrática de la falta de ajuste y la media cuadrática del error puro (MS_{lof}/MS_{pe}) fue 1,12 siendo éste un valor menor que el valor $F_{3,17}$ crítico (2,70 para un 95 % de confianza). Por otro lado, la relación entre la media cuadrática de la regresión



y la media cuadrática de los residuos (MS_R/MS_r) fue 18,3 valor mucho mayor que el valor $F_{6,23}$ crítico (2,53 para un 95 % de confianza) demostrando que la regresión es significativa. Esto indica que el modelo de ajuste propuesto es apropiado para el conjunto de datos analizado.

Tabla 2.3 Resultado del análisis de la varianza.

FUENTE DE VARIACIÓN	SS	GL	MS
Regresión	1577,0	6	262,8
Residuos	331,0	23	14,4
Falta de Ajuste	93,8	6	15,6
Error Puro	237,2	17	14,0
Total	2238,9	29	
Varianza Explicada (%)	82,65		
Máximo de Varianza Explicable (%)	87,56		

SS: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MS: media cuadrática.

La Figura 2.6 muestra las superficies de respuesta obtenidas con el modelo de ajuste. Como puede observarse, los valores óptimos para las tres variables analizadas se encuentran dentro de la región experimental.

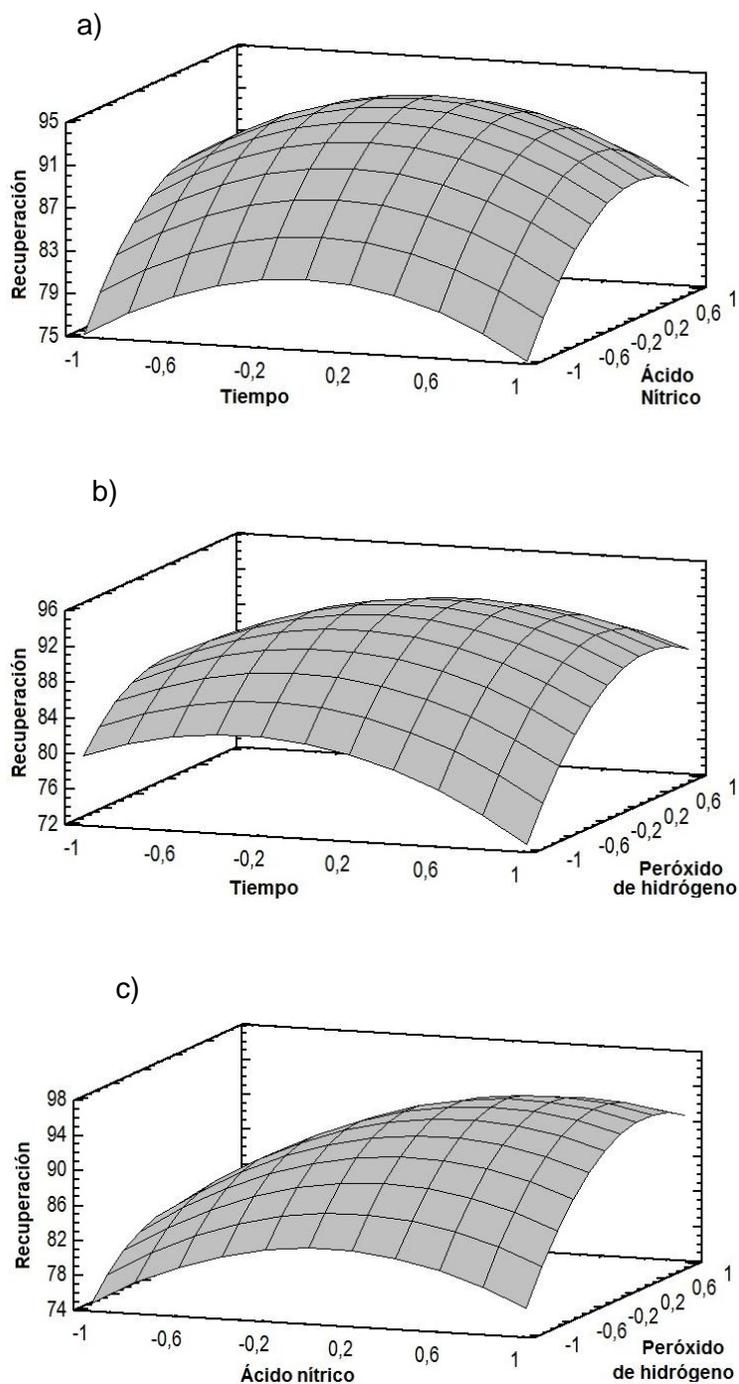


Figura 2.6. Superficies de respuestas obtenidas a partir del modelo de ajuste mostrando el efecto mutuo entre dos variables independientes (la variable restante se mantuvo en su respectivo nivel central). (a) Peróxido de hidrógeno = 0. (b) Ácido nítrico = 0. (c) Tiempo de digestión = 0.



En la Tabla 2.4 se muestran los valores óptimos de los tres factores considerados en el procedimiento de digestión de las muestras analizadas.

Tabla 2.4. Valores óptimos considerados en el proceso de digestión.

	Tiempo	HNO ₃ (65%)	H ₂ O ₂ (30%)
Intervalo evaluado	10 – 20 min	6,0 - 10,0 mL	4,0 - 8,0 mL
Valor óptimo	16 min	8,9 mL	6,8 mL

2.4.2 Optimización del agente reductor

El cloruro de estaño (II) en medio ácido es el agente reductor que generalmente se utiliza para la generación de vapores de mercurio [37-38]. Para seleccionar la concentración apropiada se empleó el método univariado. Se estudiaron concentraciones de agente reductor de 5, 10, 15 y 20% (p/v) empleando una solución estándar de mercurio de 5 µg Hg L⁻¹. Los resultados mostraron que las menores concentraciones (5 y 10%) producen un desplazamiento incompleto del mercurio presente. Por otra parte, no se observaron diferencias en las señales obtenidas para 15 y 20% de cloruro de estaño (II). Por lo tanto, el valor óptimo seleccionado para el agente reductor fue de 15%.



2.4.3 Optimización de las variables Flow-Batch

En la Tabla 2.5 se muestran los valores óptimos de los tiempos de apertura de las válvulas solenoides y los diferentes caudales. Estos fueron seleccionados por el método univariante teniendo en cuenta la sensibilidad y la reproducibilidad de las señales analíticas de mercurio.

Tabla 2.5. Valores óptimos de los parámetros FB.

Caudales (mL min ⁻¹)	q _{ac}	q _{a1}	q _p	q _{a2}	q _r	q _m	q _{Hg}	q _{d1}	q _{d2}
	18,0	18,0	18,0	4,38	18,0	4,38	4,38	18,0	18,0
Tiempo de apertura de las válvulas (s)	V _{ac}	V _{a1}	V _p	V _{a2}	V _R	V ₁	V ₁ - V ₂	V _{d1}	V _{d2}
Soluciones testigo	---	---	---	6,0-2,0	7,0	---	1,0-5,0	---	10
Muestra	30	33	23	5,0-4,0	7,0	7,0	2,0-3,0	10	10

ac: ácido nítrico, p: peróxido de hidrógeno, r: agente reductor, m: muestra digerida, Hg: solución estándar de mercurio, a₁ y a₂: agua, d₁ y d₂: desecho.

2.4.4 Parámetros analíticos

Con el sistema FB optimizado y fijadas las condiciones experimentales, se procedió a obtener los parámetros analíticos del método propuesto que se muestran en la Tabla 2.6.



Tabla 2.6. Parámetros analíticos.

Intervalo lineal	36,4 – 177,1 $\mu\text{g Hg Kg}^{-1}$ miel
Regresión lineal	$y = (6,31 \times 10^{-5} \pm 0,18 \times 10^{-5}) x - (3,4 \times 10^{-4} \pm 2,1 \times 10^{-4})$ $x = [\mu\text{g Hg Kg}^{-1} \text{ miel}]$
Límite de detección	17,1 $\mu\text{g Hg Kg}^{-1}$ miel
Frecuencia de muestreo	4h ⁻¹
Desviación estándar relativa porcentual	3,2 ^a

^an=11; 107,8 $\mu\text{g Hg Kg}^{-1}$ miel.

2.4.5 Aplicación a muestras reales

El método desarrollado fue aplicado a la determinación de mercurio en muestras de miel, empleando las condiciones experimentales seleccionadas. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de este analito. Por lo tanto para llevar a cabo la determinación se realizaron agregados conocidos de una solución estándar de mercurio a las muestras de miel.

Para validar el método Flow-Batch propuesto se empleó el método de la AOAC ^[12]. Para ello se llevó a cabo una digestión ácida de las muestras con agregado de mercurio y a continuación se determinó el contenido del mismo mediante el empleo de un espectrofotómetro de absorción atómica Coleman MAS 50D (253,7 nm).

Como puede verse en la Tabla 2.7, se observan las concentraciones obtenidas por el método propuesto que son altamente concordantes con las



obtenidas por el método de referencia (AOAC) para todas las muestras analizadas.

Finalmente, mediante la aplicación del test estadístico t Student se confirmó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos ($t_{\text{calculado}}=0,93$, $t_{\text{crítico}}=2,31$, $n=8$ y $\alpha=0,05$).

Tabla 2.7. Análisis de muestras reales.

Muestra	Hg(II) adicionado ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Concentración de Hg(II) ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) \pm s		Recuperación (%)	
		FB	AOAC	FB	AOAC
1	107,8	112,6 \pm 4,6	107,5 \pm 1,5	104,4	99,8
2	107,8	113,5 \pm 4,8	106,4 \pm 4,2	105,3	98,7
	71,5	69,3 \pm 1,8	71,1 \pm 0,2	96,9	99,4
3	107,8	111,6 \pm 3,3	102,5 \pm 0,7	103,5	95,1
	71,5	68,5 \pm 1,7	70,1 \pm 0,3	95,8	98,0
4	107,8	105,9 \pm 1,6	109,6 \pm 5,9	98,2	101,6
	71,5	69,3 \pm 0,4	72,1 \pm 0,3	96,9	100,8
5	107,8	105,6 \pm 4,8	103,0 \pm 4,9	97,9	95,5
	71,5	74,6 \pm 5,5	72,6 \pm 0,2	104,4	101,5

2.5 Conclusiones parciales

El sistema Flow-Batch propuesto empleado para la determinación de mercurio en muestras de miel de la Provincia de Buenos Aires, presenta como característica innovadora la posibilidad de efectuar el tratamiento de la miel en una cámara de vidrio utilizando una lámpara halógena, acoplada al sistema de detección para la cuantificación de mercurio. Esto permitió que el proceso de digestión se llevara a cabo en 16 minutos a diferencia de los métodos oficiales



que requieren alrededor de 2 horas. El diseño Box- Behnken empleado para optimizar las variables experimentales que afectan el proceso de digestión de las muestras reveló que el método de superficie de respuesta fue adecuado. Una de las principales características de este sistema es que tiene en cuenta los principios de la química verde, como la disminución en el consumo de reactivos, cantidad de muestra, la generación de residuos y el consumo de energía.

Se analizaron muestras de miel de la Provincia de Buenos Aires mediante el método propuesto y los resultados obtenidos fueron validados utilizando el método AOAC, mostrando buena concordancia entre ellos.

Este sistema automático facilita la determinación analítica de mercurio en muestras de miel y puede ser implementado en los laboratorios de control de calidad.



2.6 Bibliografía

- [1] R. Galarini, G. Saluti, D. Giusepponi, R. Rossi, S. Moretti. Food Control (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.048>.
- [2] G. Tayar Peres, S. Rath, F.G. Reyes Reyes. Food Control 21 (2010) 620
- [3] L. Chen, B. Li. Food Chemistry, 141 (2013) 23.
- [4] P. Przybylowski; A. Wilczynska. Honey as an environmental marker. Food Chemistry 74 (2001) 289.
- [5] A. Badiou-Bénéteau, A. Benneveau, F. Géret, H. Delatte, N. Becker, J.L. Brunet, B. Reynaud, L.P. Belzunces. Environment International 60 (2013) 31.
- [6] O. Lambert, M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, M. Larhantec, F. Delbac, H. Pouliquen. Environmental Pollution 170 (2012) 254.
- [7] C. Kulek de Andrade, V. Egéa dos Anjos, M.L. Felsner, Y. Reyes Torres, S. Pércio Quináia. Food Chemistry 146 (2014) 166.
- [8] L. Hinojosa Reyes, G.M. Mizanur Rahman, H.M. Skip Kingston. Analytica Chimica Acta 631 (2009) 121.
- [9] S. Gentès, R. Maury-Brachet, R. Guyoneaud, M. Monperrus, J.M. André, S. Davail, A. Legeay. Ecotoxicology and Environmental Safety 91 (2013) 180.
- [10] M. Tuzen, I. Karaman, D. Citak, M. Soylak. Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 1648.
- [11] A.Q. Shah, T.G. Kazi, J.A. Baig, H.I. Afridi, G.A. Kandhro, M.B. Arain, N.F. Kolachi, S.K. Wadhwa. Food and Chemical Toxicology 48 (2010) 65.
- [12] AOAC Official Method 971.21, 16th ed.; Horwitz, W., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, 1998.



- [13] R.B. Voegborlo, A.A. Adimado. *Food Chemistry* 123 (2010) 936.
- [14] C. Cámara, P Fernández, A.M. Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal. *Toma y Tratamiento de Muestras*; Ed. Sintesis S. A. Carmen Cámara: Madrid, España, 2004.
- [15] J.A. Belloni, M.S. Di Nezio, M.F. Pistonesi, M.E. Centurión. *Talanta* 89 (2012) 526.
- [16] G.E.P. Box, D.W. Behnken. *Technometrics* 2 (1960) 455.
- [17] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandao, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos. *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 179.
- [18] M. Khajeh. *Food Chemistry*. 129 (2011) 1832.
- [19] B.P. Panda, S. Javed, M. Ali. *Food Bioprocess Technology* 3 (2010) 373.
- [20] Y.R. Abdel-Fattah, H.A. El-Enshasy, N.A. Soliman, H. El-Gendi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (2009) 378.
- [21] M.A. Khan, R. Hamid, M. Ahmad, M.Z. Abdin, S. Javed. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20 (2010) 1597
- [22] M. Grünhut, V.L. Martins, M.E. Centurión, M.C.U. Araújo, B.S. Fernández Band. *Analytical Letters*. 44 (2011) 67.
- [23] A.F. Faria, M.V.N. de Souza, R.E. Bruns, M.A.L. de Oliveira. *Talanta* 82 (2010) 333.
- [24] R.S. Honorato, M.C.U. Araújo, R.A.C. Lima, E.A.G. Zagatto, R.A.S. Lapa, J.L.F. Costa Lima, *Analytica Chimica Acta* 396 (1999) 91.
- [25] M.B. Lima, M. Insausti, C.E. Domini, M.F. Pistonesi, M.C.U. Araújo, B.S. Fernández Band. *Talanta* 89 (2012) 21



- [26] E.P. Medeiros, E.C.L. Nascimento, A.C.D Medeiros, J.G. Veras Neto, E.C. Silva, M.C.U. Araújo. *Analitica Chimica Acta* 511 (2004) 113
- [27] C. Pasquini, E.V. Aquino, M.V. Rebouças, F.B. Gonzaga. *Analitica Chimica Acta* 600 (2007) 84
- [28] L.F. Almeida, M.G.R. Vale, M.B. Dessuy, M.M. Silva, R.S. Lima, V.B. Santos, P.H.D. Diniz, M.C.U. Araújo. *Talanta* 73 (2007) 906
- [29] R.A.C. Lima, S.R.B. Santos, R.S. Costa, G.P.S Marcone, R.S. Honorato, V.B. Nascimento, M.C.U. Araujo. *Analitica Chimica Acta* 518 (2004) 25.
- [30] C.C. Acebal, M. Insausti, M.F. Pistonesi, A.G. Lista, B.S. Fernández Band. *Talanta* 81 (2010) 116.
- [31] M.B. Lima, S.I.E. Andrade, D.P. Harding, M.F. Pistonesi, B.S. Fernández Band, M.C.U. Araújo. *Talanta* 88 (2012) 717.
- [32] M. Grünhut, M. E. Centurión, W.D. Fragoso, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo, B.S. Fernández Band. *Talanta* 75 (2008) 950.
- [33] M.J. Silva, E.V. Anjos, R.S. Honorato, M.F. Pimentel, A.P.S. Paim. *Analitica Chimica Acta* 629 (2008) 98.
- [34] R.S. Honorato, J.M.T. Carneiro, E.A.G. Zagatto. *Analitica Chimica Acta* 441 (2001) 309.
- [35] R.B. Voegborlo, A.A. Adimado. *Food Chemistry* 123 (2010) 936.
- [36] P. Pohl, I. Sergiel, B. Prusisz. *Food Chemistry* 125 (2011) 1504.
- [37] R.B. Voegborlo, H. Akagi. *Food Chemistry* 100 (2007) 853.
- [38] A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, J.A. Stratis. *Talanta* 64 (2004) 1053



CAPÍTULO 3

***Análisis de imágenes
digitales en combinación con
técnicas multivaridas***



3.1 Objetivo

El objetivo general de este capítulo fue la obtención de imágenes digitales de mieles de la región sur de la Provincia de Buenos Aires, con una cámara web empleando como información analítica los histogramas. Esto permitió el desarrollo de los siguientes trabajos:

Parte A: Implementación de un sistema Flow-Batch, para la clasificación de las mieles según su origen geográfico mediante el análisis de imágenes digitales y técnicas de clasificación multivariadas.

Parte B: Determinación de color en muestras de miel empleando imágenes digitales y calibración multivariada.



3.2 Introducción

3.2.1 Análisis de imágenes digitales

Desde los comienzos de la ciencia, en los tiempos prehistóricos, alrededor de 2000 años a.C., las observaciones visuales han tenido un importante rol. En aquel tiempo, la única forma de documentar los resultados obtenidos de la experimentación era a través de la descripción verbal o mediante gráficos realizados a mano. Con la invención de la técnica fotográfica, surgió una nueva forma de documentar los resultados de manera objetiva.

El análisis de las imágenes digitales existe desde la década del 60 y sus mayores avances fueron en las áreas de la medicina y la astronomía. En el área de química, el uso de métodos para análisis de imágenes se tornó popular después del perfeccionamiento de las técnicas de microscopía óptica, electrónica y de fuerza atómica, y espectroscopia de imágenes ^[1]. Durante los últimos años, las imágenes digitales se han utilizado en el área de la química analítica como una herramienta potencial para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo, siendo ésta una de las fronteras emergentes de investigación avanzada. Botelho y col. emplearon un escáner plano comercial para la obtención de imágenes digitales de bebidas para la cuantificación de colorantes ^[2]. Foca y col. desarrollaron un método para la determinación de atributos visuales y la cuantificación del contenido de diferentes pigmentos en salsa de pesto mediante el análisis de imágenes digitales obtenidas empleando una cámara digital ^[3]. Las



cámaras web también han sido ampliamente utilizadas para la captura de imágenes, permitiendo la miniaturización de los sistemas de medida ^[4].

El análisis de las imágenes involucra diferentes pasos. En primer lugar el proceso de captura, el cual puede llevarse a cabo empleando diversos dispositivos. En caso de ser necesario se procede al acondicionamiento de la imagen obtenida. Finalmente, mediante el empleo de algoritmos computacionales avanzados, se extrae la información relevante y las características de las imágenes que son de interés.

Las técnicas de análisis de las imágenes capturadas mediante cualquiera de los dispositivos mencionados anteriormente, permiten la extracción de información cuantitativa o cualitativa, es decir, que permiten generar datos a partir de las imágenes. Este análisis generalmente involucra el empleo de modelos de color con la finalidad de facilitar la especificación de los colores de una forma normalizada y aceptada genéricamente. Los espacios de color utilizados frecuentemente son: RGB (rojo, verde y azul), escala de grises y HSB (tono, saturación y brillo) ^[5].

A continuación se detallan los modelos de color antes mencionados:

3.2.1.1 Modelo de colores primarios aditivos o RGB (rojo, verde, azul)

Este espacio de color está formado por los tres colores primarios de la luz, el rojo, el verde y el azul. Es un modelo basado en la síntesis aditiva, donde todos los colores pueden ser representados mediante la mezcla por adición de los



colores primarios. Esto se observa en la Figura 3.1, donde por el ejemplo, el color amarillo se obtiene a partir de los colores verde y rojo.

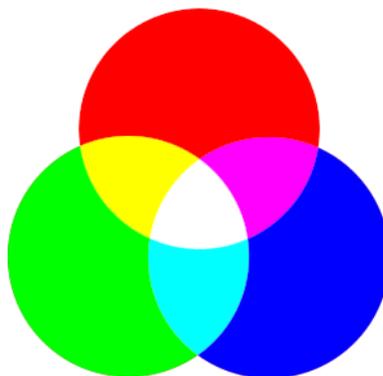


Figura 3.1 Colores primarios aditivos o RGB.

La representación geométrica de este sistema de color en un espacio tridimensional genera un sólido conocido como cubo de color (Figura 3.2). En este cubo, cada eje representa la contribución de un color primario y cada color es un punto de la superficie o del interior de éste.

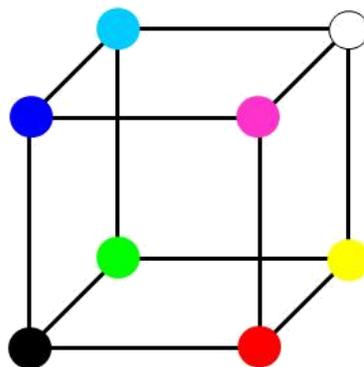


Figura 3.2. Representación geométrica del modelo RGB.



Para indicar con qué proporción se mezcla cada color, a cada color primario se le asigna un valor de intensidad que varía entre 0 a 255 (8 bits). De esta manera el valor 0 significa que dicho color no interviene en la mezcla y a medida que aumenta el valor, la intensidad de dicho color también aumenta. Por lo tanto, el rojo se obtiene con (255,0,0), el verde con (0,255,0) y el azul con (0,0,255). El color negro, es decir la ausencia de color se obtiene cuando las tres componentes son 0 (0,0,0) y por el contrario, el color blanco se obtiene cuando los tres colores se encuentran en su máximo nivel (255,255,255).

La combinación de dos colores en su máximo nivel, con el tercero en nivel 0, da lugar a tres colores intermedios, amarillo (255, 255,0), turquesa (0, 255,255) y magenta (255, 0,255).

3.2.1.2 Escala de gris

En este modelo de color cada píxel de la imagen posee un color en una gama de tonos grises. Utiliza hasta 256 tonos de gris. Cada píxel de una imagen en escala de grises tiene un valor de brillo comprendido entre 0 (negro) y 255 (blanco).

La escala de grises estaría situada en la diagonal que une al color blanco con el negro en el cubo de color, como se muestra en la Figura 3.3.

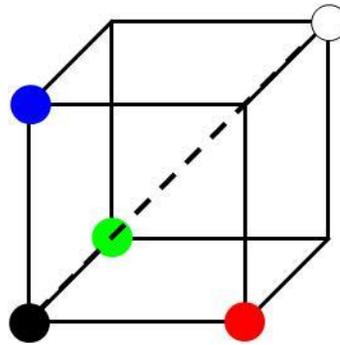


Figura 3.3. Representación de la ubicación de la escala de grises en el cubo de color.

3.2.1.3 Modelo HSB

El modelo HSB (Hue, Saturation, Brightness: tono, saturación, brillo) se basa en la percepción humana del color y describe tres características fundamentales:

Tono es el color reflejado o transmitido a través de un objeto. Se mide como una posición en la rueda de colores estándar y se expresa como un ángulo en grados, entre 0° y 360° . Normalmente, el tono se identifica por el nombre del color, como rojo, naranja o verde.

Saturación, a veces llamada cromatismo, se refiere a la pureza relativa de la cantidad de luz blanca mezclada con el tono, es decir, es la fuerza o pureza del color. La saturación representa la cantidad de blanco que existe en proporción al tono y se mide como porcentaje entre 0% (gris) y 100% (saturación completa). En la rueda de colores estándar, la saturación aumenta a medida que nos aproximamos al borde de la misma.

Brillo es la luminosidad u oscuridad relativa del color y se suele medir como un porcentaje comprendido entre 0% (negro) y 100% (blanco).



La Figura 3.4 representa el cono de color HSB. En ella el tono (H) se representa por una región circular, el eje horizontal denota la saturación (S), mientras que el eje vertical corresponde al brillo (B).

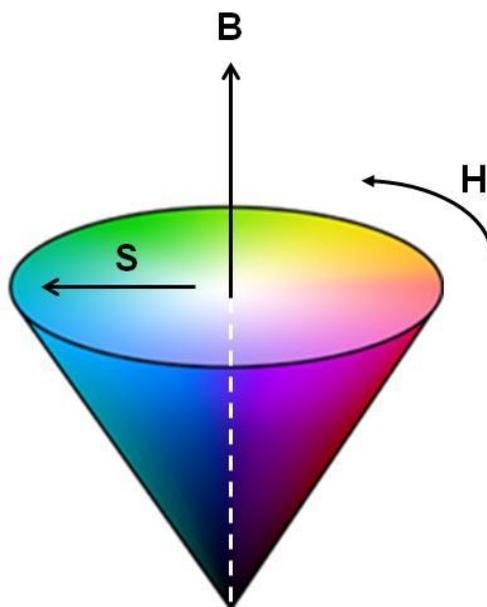


Figura 3.4. Cono de colores del espacio HSB.

3.2.2 Técnicas multivariadas

Las metodologías analíticas, como por ejemplo, la espectroscopia, cromatografía, electroforesis capilar, permiten obtener gran cantidad de datos analíticos a partir de una única medida. Para poder llevar a cabo la extracción de la información relevante a partir de dichos datos se requiere de la utilización de herramientas matemáticas y estadísticas. La disciplina que emplea el conjunto de estas técnicas se denomina quimiometría. Dentro de esta disciplina, las técnicas



multivariadas se emplean para realizar el análisis simultáneo de gran cantidad de variables.

Estas técnicas abarcan diversos objetivos como la aplicación de pretratamientos a los datos experimentales para mejorar la calidad de la señal, la construcción de modelos para el reconocimiento de las similitudes entre muestras y las determinaciones cuantitativas ^[6-8].

El empleo de las imágenes digitales junto con las técnicas quimiométricas, que se detallan a continuación, permitió el desarrollo de los dos trabajos de este capítulo:

Parte A: clasificación de mieles según su origen geográfico empleando técnicas de reconocimiento de patrones.

Parte B: determinación del color de miel mediante mínimos cuadrados parciales (PLS).

3.2.2.1 Técnicas de reconocimiento de patrones – Clasificación

En la primera parte de este capítulo (**Parte A**), se emplearon técnicas de reconocimiento de patrones con el objetivo de clasificar muestras de miel del sur de la Provincia de Buenos Aires según su origen geográfico.

En química analítica la finalidad de aplicar técnicas de reconocimiento de patrones o clasificación, es identificar las similitudes y diferencias entre muestras basándose en determinadas propiedades químicas que las caracterizan, por ejemplo, pH, densidad, composición química, etc.



Dentro de los métodos de reconocimiento de patrones existen dos modalidades, dependiendo del conocimiento a priori que se tenga del sistema:

-Métodos de clasificación sin supervisión

-Métodos de clasificación supervisados

En los métodos de clasificación **sin supervisión**, no se le impone a ninguna de las muestras la pertenencia a una determinada clase, aún si se tiene conocimiento de ello. El objetivo de estas técnicas es evaluar si existe un agrupamiento natural. Los métodos de clasificación sin supervisión más utilizados son: métodos jerárquicos de análisis de clúster (HCA) y el análisis de componentes principales (PCA) ^[9]. En esta Tesis las muestras se analizaron mediante el **Análisis de Componentes Principales (PCA)**.

En contraste, en los métodos de clasificación **supervisados** se cuenta con una serie de objetos cuya pertenencia a un determinado grupo o clase es conocida. El objetivo de estas técnicas es utilizar estos objetos para encontrar una regla que permita asignar un nuevo objeto desconocido al grupo correcto. Por lo tanto, se construyen modelos empleando las medidas analíticas para predecir a partir de ellas, a que clase pertenecen las muestras futuras. El tratamiento de los datos en la presente Tesis implicó el uso de una técnica adecuada de selección de variables, el **Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (SPA)**, asociado con el **Análisis Discriminante Lineal (LDA)** para mejorar los resultados de la clasificación. Además de **SPA-LDA**, se crearon modelos de clasificación empleando **Modelado Independiente Suave para la Analogía de Clase (SIMCA)** y **Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales**



con Análisis Discriminante (PLS-DA) para la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes modelos.

i) Análisis de Componentes Principales (PCA)

Es una técnica estadística empleada para reducir la dimensión del conjunto de variables experimentales y examinar el agrupamiento de las muestras de forma gráfica. Para condensar los datos, se generan nuevos ejes (Figura 3.5), denominados componentes principales, los cuales son una combinación lineal de las variables originales, además de ser independientes entre sí y capturar la máxima variabilidad existente entre objetos y variables ^[10].

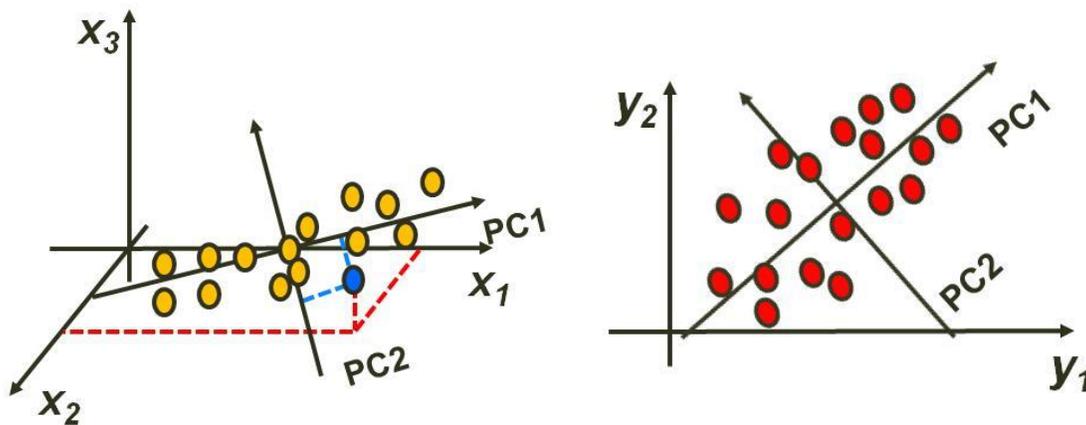


Figura 3.5. Generación de los nuevos ejes denominados componentes principales.

No todos los componentes principales contienen la misma información. El primer eje, denominado primer componente principal, o PC1 (Principal Component), se orienta en la dirección de máxima variación (dispersión) de los puntos. El segundo eje (PC2) debe ser perpendicular a PC1 y sigue la dirección de la máxima dispersión residual, obteniendo la información que no ha podido



recoger el PC1. Así, los primeros son los que describen la mayor variación en los datos, que se asocia a la información más relevante, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidas a ruido o error experimental, o a un sobreajuste del modelo y pueden ser descartados. De esta forma se consigue una importante reducción del número de variables ^[11].

ii) Modelado Independiente Suave para la Analogía de Clase (SIMCA)

El método requiere de un conjunto de datos de entrenamiento formado por las muestras con su respectivo conjunto de variables y su pertenencia a una determinada clase ^[12]. En SIMCA se genera un modelo para cada una de las clases usando un PCA de forma independiente, por lo tanto, cada clase tiene un modelo específico que la describe con el número óptimo de PCs.

Para asignar una muestra desconocida a una determinada clase se comparan, mediante un test estadístico F, la varianza residual de cada muestra con la varianza residual total de cada una de las clases. La muestra es clasificada en un determinado grupo cuando su varianza residual es menor que la varianza residual total del modelo ^[13]. Este método presenta dos tipos de errores. En el primero, llamado error tipo I, la muestra no es clasificada en su clase. En el error de tipo II la muestra es clasificada incorrectamente en otra clase.



iii) Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas asociado con el Análisis Discriminante Lineal (SPA-LDA)

El punto de partida del análisis discriminante lineal es encontrar una buena función discriminante, que sea una combinación lineal de las variables originales. Cuando aplicamos esta función a un nuevo dato, nos indica a que clase pertenece ^[14]. Se busca que al proyectar los datos sobre la función discriminante, se maximice la variabilidad entre las clases y que la variabilidad dentro de ellas sea mínima. El nuevo dato se clasifica dentro del grupo con la media más próxima en la proyección.

Una limitación de esta técnica de clasificación es que el número de muestras debe ser mayor que el número de variables incluidas en el modelo. Para llevar a cabo la selección de las variables se emplea el Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (SPA). Éste es un algoritmo iterativo que emplea operaciones vectoriales simples para obtener un subconjunto de variables en las cuales el contenido de información es mínimamente redundante, lo que evita problemas de sobreajuste. SPA comienza con un vector de inicio x_0 (una variable) y calcula cuál de los vectores restantes tiene la mayor proyección sobre el plano S_0 ortogonal a x_0 . Este vector, que denominaremos x_1 , puede considerarse que contiene la mayor cantidad de información no incluida en x_0 (Figura 3.6). En la siguiente iteración, SPA restringe el análisis al plano S_0 , tomando a x_1 como un nuevo vector de referencia y procediendo de la manera anteriormente descrita. De esta forma, se incorpora una nueva variable en cada iteración hasta alcanzar un determinado número N de variables. El mejor vector de inicio y el criterio de



parada (número de variables a seleccionar) se pueden optimizar de manera tal de obtener un modelo con la máxima capacidad predictiva.

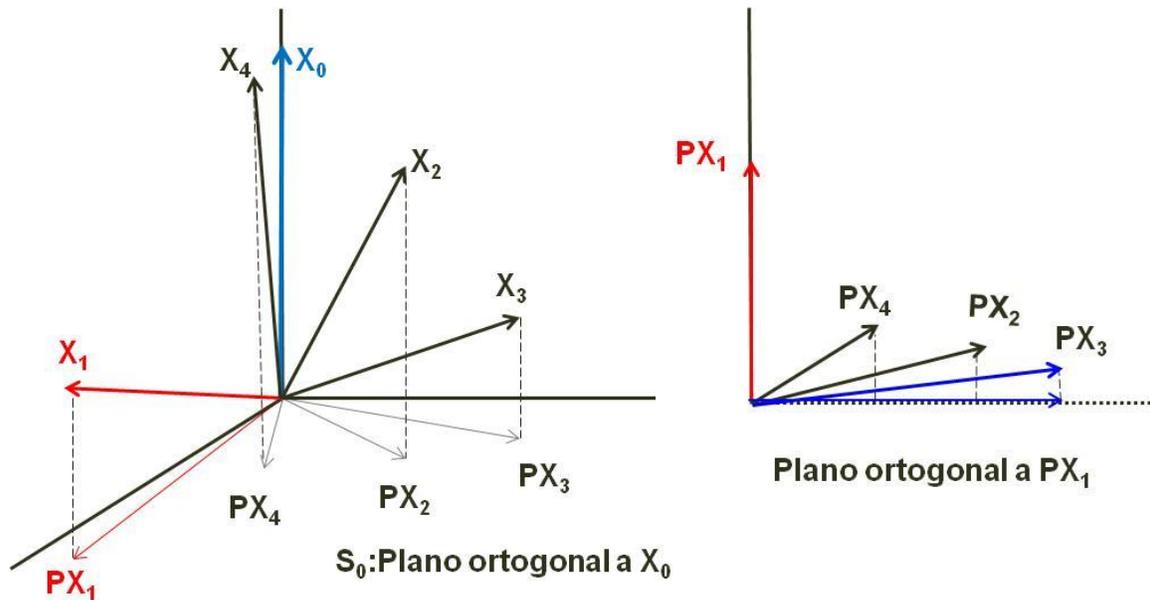


Figura 3.6. Representación del algoritmo de las proyecciones sucesivas.

iv) Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales con Análisis Discriminante (PLS-DA)

El algoritmo de clasificación PLS-DA se basa en el modelo de regresión PLS (el cual se describe en la siguiente sección), para reducir la dimensión de la matriz y establecer los límites entre las clases. Luego, con el modelo confeccionado se realiza un análisis discriminante y se clasifican las nuevas



muestras ^[15]. En este método la matriz X está formada por las variables independientes (histogramas). La pertenencia de cada muestra del conjunto de entrenamiento a una determinada clase se especifica mediante una matriz Y (variables dependientes) de variables simuladas (falsas). Una variable simulada es una variable artificial que asume un valor numérico discreto para describir las clases. A partir de esta matriz simulada es que se crea un modelo PLS. Con el modelo encontrado se realiza una predicción para el conjunto de muestras a clasificar. Calculándose un umbral de clasificación para cada clase, pertenecerán a ella, las muestras cuyos valores de Y estén por encima de ese umbral.

3.2.2.2 Calibración multivariada

En la segunda parte (**Parte B**) de este trabajo se determinó el color, expresado en mmPfund, de muestras de miel mediante calibración multivariada. El objetivo de estas técnicas es predecir la propiedad de interés a partir de múltiples medidas instrumentales, como por ejemplo un espectro de absorción o en este caso un histograma de color de una imagen digital.

Existen varios métodos de calibración multivariada, sin embargo, el más empleado, y el que se utilizó en esta etapa del trabajo, es el Análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales, PLS. Existen dos variantes de PLS: la primera denominada PLS-1, que concentra su atención en un único analito a la vez y la segunda, PLS-2, que permite calibrar y predecir las concentraciones de varios analitos simultáneamente. Si bien PLS-1 debe repetirse para cada analito de interés, permite optimizar las condiciones de



trabajo para cada analito de manera independiente, lo que resulta una gran ventaja. Actualmente, se prefiere utilizar PLS-1 en la mayoría de las aplicaciones [16-17].

El modelo PLS involucra dos etapas:

Calibración: Establece la relación matemática entre la información instrumental (histogramas) y la medida de interés (mmPfund), a partir de un conjunto de muestras denominado set de calibración.

Predicción: Se emplean los resultados de la calibración para estimar el parámetro de interés en las muestras incógnitas.

3.2.2.3 Algoritmo Kennard-Stone

Este algoritmo selecciona un subconjunto de muestras de la matriz de datos x de manera tal de cubrir la región experimental de manera uniforme e incluir las muestras que se encuentran en el límite del conjunto de datos. El método comienza por la búsqueda de las dos muestras que están más alejadas usando distancias geométricas. La distancia utilizada normalmente es la distancia Euclideana. Para agregar otra muestra, el algoritmo selecciona de las restantes aquella que tiene la mayor distancia de separación y ésta es añadida al conjunto de las muestras de calibración (Figura 3.7). El proceso se repite hasta que el número requerido de muestras, k , se han añadido al conjunto de selección. En la práctica esto produce una red uniformemente distribuida de puntos seleccionados sobre el conjunto de datos e incluye muestras a lo largo del límite del conjunto de datos. El método funciona de manera eficiente, ya que calcula la



matriz de distancias entre la muestra sólo una vez. Esta selección se implementa siguiendo la descripción publicada por R.W. Kennard y L.A. Stone ^[18].

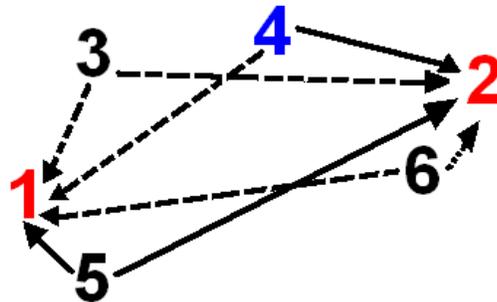


Figura 3.7. Ejemplo de selección de muestras por el algoritmo Kennard-Stone.



Parte A

Clasificación de mieles de Argentina empleando un sistema Flow-Batch con cámara web



3.3 Introducción

Durante la última década, Argentina se ha posicionado como uno de los primeros productores de miel en el mundo, siendo simultáneamente el principal exportador de miel a granel. La miel producida en Argentina es internacionalmente reconocida por sus atributos físico-químicos, microbiológicos y sensoriales (sabor y color) ^[19-20]. Debido a las grandes extensiones de pasturas naturales, la abundante flora autóctona y los diversos cultivos agrícolas, la actividad apícola puede ser desarrollada en casi todo el territorio nacional. Sin embargo, la Provincia de Buenos Aires concentra más del 50% de la producción. El sudoeste de la Provincia se encuentra localizado en la región Pampeana y presenta diferentes zonas: montañas, valles, planicies y bosques. Estos ambientes poseen diversas condiciones climáticas y, por lo tanto, las especies vegetales que se encuentran a disposición de la producción apícola varían de una región a otra.

Las características organolépticas de la miel están fuertemente asociadas con el origen botánico, el cual depende de la región geográfica en la que las abejas recolectan el polen. Actualmente los mercados de la miel tienden a clasificarla según su origen geográfico o botánico. Baroni y col. ^[21] evaluaron el origen floral de la miel determinando los componentes orgánicos volátiles mediante microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa, acoplado a la espectrometría de masas y aplicando técnicas quimiométricas. Por otra parte, se llevó a cabo la clasificación de miel según su origen botánico combinando propiedades químicas y físicas con técnicas quimiométricas ^[22]. La determinación



de 14 elementos a nivel de traza mediante Análisis por Activación Neutrónica (INAA) y técnicas quimiométricas, permitió la diferenciación de mieles multiflorales de la región Pampeana ^[23]. Escriche y col. propusieron un método para diferenciar dos tipos de mieles cítricas provenientes de diferentes orígenes botánicos determinando el contenido de flavonoides, fenoles, ácidos y compuestos volátiles ^[24]. También se logró la clasificación según origen geográfico y botánico mediante la determinación de siete metales presentes en las muestras de miel por espectrometría de absorción atómica ^[25]. Cometto y col. determinaron la composición de amino ácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y análisis estadísticos, demostrando que es posible clasificar mieles provenientes de las Provincias de Córdoba y Buenos Aires según su origen geográfico ^[26]. Mieles producidas en diferentes regiones de la Provincia de Córdoba, Argentina, fueron clasificadas según su origen geográfico empleando técnicas quimiométricas junto con las propiedades químicas y el perfil de minerales ^[27]. Otros métodos desarrollados para llevar a cabo la clasificación de muestras de miel, se basan en estudios palinológicos, características sensoriales, análisis de minerales, contenido de flavonoides, etc. Sin embargo, los estudios palinológicos tienen la desventaja de ser lentos, laboriosos y requieren un analista entrenado ^[28].

Con respecto a las características sensoriales para diferenciar miel, la más relevante es la **determinación de color**. El color varía desde los tonos blancos hasta el ámbar oscuro, de acuerdo al origen floral, geográfico y estacional en que son producidas y recolectadas. El método de referencia internacional para la determinación de color en miel se basa en el método Pfund, el cual consiste en



una comparación visual entre la muestra y un vidrio coloreado ^[29]. La determinación de este parámetro es subjetiva ya que diferentes analistas pueden reportar diferentes valores. Además no es posible distinguir entre pequeñas variaciones de color. Por otro lado, esta técnica es laboriosa, consume mucho tiempo y requiere grandes cantidades de muestra. Con el objetivo de superar estos inconvenientes, en los últimos años se han empleado las imágenes digitales como una potencial herramienta para el análisis cualitativo y cuantitativo ^[30].

La obtención de imágenes se puede llevar a cabo mediante sistemas automáticos que incluyen una cámara web con el fin de que las mismas sean reproducibles para lograr, por ejemplo, la determinación de aluminio y cromo en agua ^[31], determinación de taninos en té verde ^[32] o titulaciones ácido-base ^[33].

En este trabajo se diseñó el primer sistema Flow-Batch (FB) con una cámara web para la obtención de imágenes digitales para la clasificación de muestras de miel del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, según la procedencia geográfica.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Preparación de las muestras

Se emplearon 210 muestras provenientes de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, las cuales fueron adquiridas en supermercados y productores locales. Se seleccionaron muestras de tres regiones diferentes: 75 provenientes de Sierra



de la Ventana, 70 de partidos ubicados al norte y 65 muestras de partidos ubicados al sur de Sierra de la Ventana. En la Figura 3.7 se pueden observar las tres regiones seleccionadas para llevar a cabo el presente estudio. Las muestras recolectadas se mantuvieron refrigeradas hasta el momento del análisis. Para la adquisición de las imágenes digitales se preparó una solución 50%(p/v) de cada una de las muestras empleando agua ultra pura.

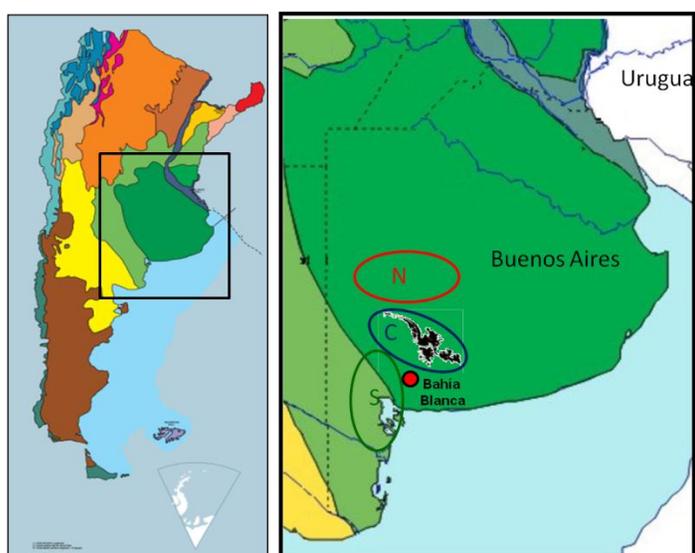


Figura 3.7. Localización geográfica de las muestras de miel estudiadas. N: norte, S: sur y C: Sierra de la Ventana.

3.4.2 Instrumentación y software

- ✓ Webcam Philips SPC900NC VGA con sensor CCD.
- ✓ Bomba peristáltica de cuatro canales Gilson Minipuls-3 M312.
- ✓ Válvulas solenoides de tres vías modelo 137 161T031, Nresearch.
- ✓ Tubos de bomba Tygon de diferentes diámetros internos.



- ✓ Accionador electrónico de válvulas.
- ✓ Cámaras de mezclado.
- ✓ Labview 5.1 (National Instruments, Austin, TX).
- ✓ ImageJ 1.44p.
- ✓ Unscrambler_ 9.7 (CAMO S/A).
- ✓ Matlab_ 2009b (Mathworks Inc.) software.

3.4.3 Sistema Flow-Batch

En la Figura 3.8 se muestra un diagrama del sistema FB propuesto. El sistema está formado por una cámara de detección (CD) fabricada en Teflón®, que posee un volumen interno de 5 mL, una ventana circular de cuarzo y los correspondientes orificios que permiten la entrada y salida de las soluciones.

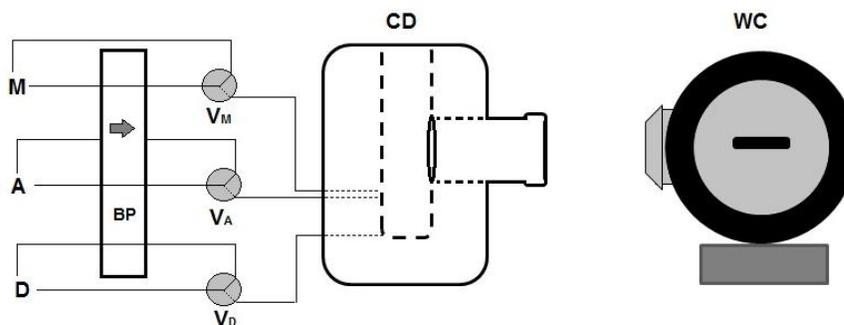


Figura 3.8. Esquema del sistema Flow-Batch propuesto para la obtención de las imágenes digitales.

Se emplearon tres válvulas solenoides de tres vías (modelo 137 161T031, Nresearch) de la siguiente manera: V_M permitió el paso de la solución de miel hacia la cámara de detección, V_A permitió el paso de agua con el objetivo de limpiar la CD antes del ingreso de una nueva solución de miel y V_D se empleó



para remover los líquidos contenidos dentro de la cámara una vez obtenida la imagen digital y luego de cada lavado. Para impulsar las soluciones a través de tubos de bomba (con diferentes diámetros internos) hacia la CD se empleó una bomba peristáltica. Para la adquisición de las imágenes digitales, se colocó una cámara web en un soporte frente a la ventana circular de cuarzo de la cámara de detección. Tanto la CD como la cámara web se colocaron en una caja negra cerrada para prevenir el paso de la luz. Con el fin de evitar la dispersión de la luz, las paredes interiores de la caja fueron cubiertas con papel blanco. Para generar una iluminación uniforme se empleó un LED blanco. Una computadora de escritorio conectada a un puerto paralelo permitió un manejo automático de las válvulas y de la cámara web. Se utilizó el programa LabVIEW 7.1 (National Instruments) para controlar todo el sistema FB propuesto. La Figura 3.9 presenta una fotografía del sistema FB empleado para la captura de las imágenes digitales.



Figura 3.9. Fotografía del sistema FB propuesto.



3.4.4 Procedimiento

A continuación se describen los distintos pasos del procedimiento:

- ✓ *Llenado de canales:* antes de comenzar el análisis, los canales deben ser llenados con las respectivas soluciones. Para ello se activan por 5 segundos las respectivas válvulas que permiten el paso de las soluciones hacia la cámara de detección. Luego se descartan las soluciones en el recipiente de desecho accionando V_D durante 10 segundos.
- ✓ *Lavado de la cámara:* este paso, se llevó a cabo accionando la válvula que transporta el agua (V_A). Posteriormente se acciona la válvula V_D con el objeto de evacuar el líquido de lavado. Este procedimiento se realizó entre medida y medida.
- ✓ *Adquisición de imagen digital:* la CD se llenó con la solución de miel accionando la válvula V_M durante 58 segundos. Antes de capturar la foto fue necesario dejar estabilizar la solución durante 30 segundos con el objetivo de evitar la formación de gradientes de concentración. Finalmente, se obtuvieron cinco imágenes de cada muestra de miel.

3.4.5 Histogramas y análisis de datos

Las imágenes digitales fueron procesadas empleando el programa ImageJ 1.44p, a partir del cual se crearon histogramas para cada intensidad de color



rojo, verde, azul (RGB), escala de gris y matiz, saturación, brillo (HSB). Para llevar a cabo el análisis se probaron dos regiones de la imagen obtenida. En primer lugar basándonos en la bibliografía ^[34] se seleccionó una región cuadrada en el centro de la imagen de 30x30 píxeles. En segundo lugar se seleccionó una región circular mayor, también en el centro de la imagen de 60x60 píxeles. Ambas regiones se muestran en la Figura 3.10.

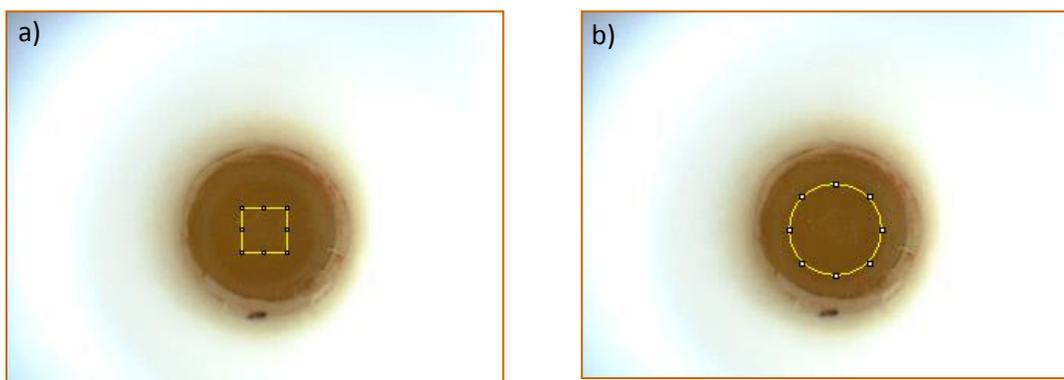


Figura 3.10. Imagen digital obtenida empleando el sistema FB propuesto.
a) 30x30 píxeles. b) 60x60 píxeles.

Los 256 tonos que componen cada color se emplearon como información analítica. Para evaluar la influencia de cada color en la clasificación de las muestras de miel se crearon tres modelos diferentes (a) RGB, (b) escala de gris y (c) HSB. Los modelos estaban compuestos por (a) 3 x 256, (b) 256 y (c) 3 x 256 variables respectivamente.

La información extraída de los histogramas se empleó para la construcción de los modelos quimiométricos de clasificación empleando PCA, SIMCA, SPA-LDA y PLS-DA. Para la selección de las muestras se empleó el Algoritmo de Kennard Stone, separándolas en set de calibración (50%), validación (25%) y predicción (25%).



3.5 Resultados y discusión

Se observó que al seleccionar la región cuadrada de 30x30 píxeles no se obtenía la información suficiente para llevar a cabo la clasificación de las muestras de miel, esto se debe a que dicha región no contiene la variabilidad necesaria para poder diferenciar una muestra de otra. Es por ello que se decidió trabajar con la región circular, la cual abarca mayor superficie de la imagen y así se obtuvieron los datos necesarios para poder llevar a cabo este análisis.

3.5.1 Análisis exploratorio

Inicialmente se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos mediante el análisis por componentes principales (PCA). Se evaluaron los tres modelos de color propuestos. PCA se empleó para reducir la dimensionalidad de los datos y para examinar el agrupamiento de las 210 muestras de miel según su origen geográfico.

En la Figura 3.11 se muestran los diagramas de dispersión en dos dimensiones de las primeras componentes principales para cada modelo de color. Estos gráficos brindan información sobre los agrupamientos de las muestras. La representación gráfica de las primeras dos componentes principales (PC1 y PC2) es especialmente útil, ya que ambas contemplan la mayor variación. En este estudio, las primeras componentes representaron 32, 52 y 44% de la varianza total para los modelos RGB (PC1 = 17%, PC2 = 15%), escala de grises (PC1 = 29%, PC2 = 23%) y HSB (PC1 = 27%, PC2 = 17%) respectivamente.

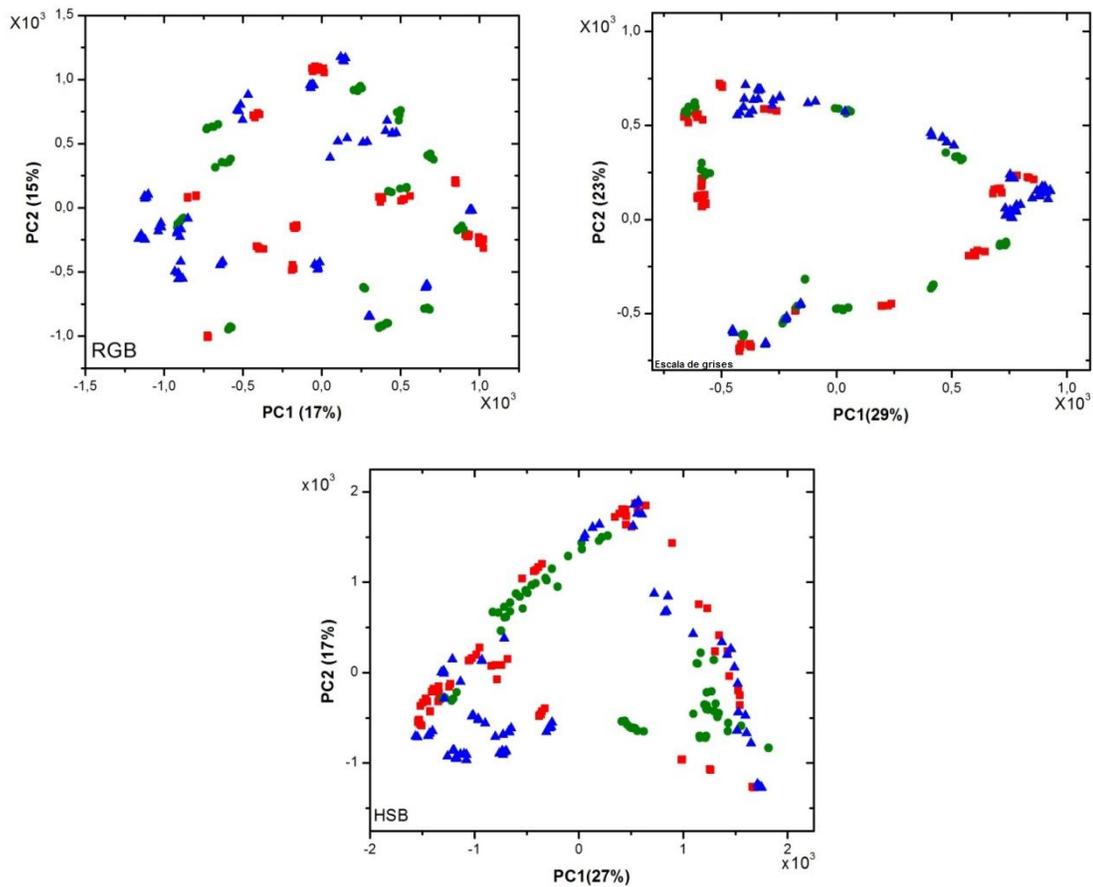


Figura 3.11. PCA para cada modelo de color (a) RGB, (b) escala de grises y (c) HSB. Norte (■), Sur (●) y Sierra de la Ventana (▲).

Como puede verse en la Figura 3.11, hay una gran superposición entre los tres grupos estudiados. Esto era de esperarse, porque a pesar de tener diferentes orígenes geográficos, la flora de las tres regiones estudiadas es similar.

Cabe señalar que el porcentaje de varianza explicada por la PC1 y PC2 para los tres modelos fue bajo. Estos resultados obtenidos fueron insatisfactorios. Por



lo tanto, se utilizaron técnicas de reconocimiento de patrones supervisados para mejorar los resultados.

3.5.2 Clasificación

En la Tabla 3.1 se pueden observar los resultados de la clasificación empleando SIMCA, SPA-LDA y PLS-DA sobre los tres modelos de color estudiados, RGB, escala de grises y HSB.

Tabla 3.1: Resumen de los resultados de la clasificación de las muestras de miel para SIMCA, PLS-DA y SPA-LDA en un nivel de confianza del 95%.

Modelo de color	SIMCA			Nº óptimo de factores	PLS-DA			Variables/ función costo	SPA-LDA		
	Errores (%)				Errores (%)				Errores (%)		
	N	S	C	N	S	C	N	S	C		
RGB	17,6	6,2	0	12	8,8	12,5	13,2	38/0,7151	2,9	0	5,3
Escala de grises	35,3	34,4	31,6	15	44,1	40,6	34,2	19/0,8814	14,7	25	15,8
HSB	26,5	0	2,6	4	8,8	3,1	5,3	14/0,7432	17,6	0	18,4

N: norte, S: sur, C: Sierra de la Ventana

Como puede observarse en la Tabla 3.1, a partir de los valores de Error (%), usando SIMCA todas las muestras provenientes de Sierra de la Ventana y de la región sur fueron correctamente clasificadas empleando los modelos de color RGB y HSB respectivamente. A partir de los valores de Error (%) se puede obtener la clasificación correcta para cada modelo de color (100% -Error (%)). Para SIMCA, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las tres regiones,



se alcanzó una clasificación media de 92,1% para el modelo de color RGB, 66,2% cuando se empleó escala de grises y 90,3% para el modelo HSB.

Cuando se usó PLS-DA, en todos los casos se obtuvieron errores en la clasificación, es decir que para ningún modelo de color las muestras fueron clasificadas en su correspondiente región en un ciento por ciento. Sin embargo, el mejor resultado se logró empleando el modelo de color HSB donde se alcanzó una clasificación media de 94,3%, obteniendo mejores resultados comparados con SIMCA para este modelo de color en particular. Por otro lado, al evaluar los restantes modelos de color, los resultados no son satisfactorios, ya que en promedio se logró una correcta clasificación de 88,5 y 60,4% para RGB y escala de grises, respectivamente.

Para SPA-LDA todas las muestras provenientes del sur fueron correctamente clasificadas cuando se usaron los modelos de color RGB y HSB. Los resultados obtenidos empleando esta herramienta quimiométrica fueron muy satisfactorios para los tres modelos de color, ya que las muestras fueron clasificadas correctamente en sus respectivas regiones, alcanzando un promedio de 97,3, 81,5 y 88,0%, usando RGB, escala de grises y HSB, respectivamente. Podemos ver, que los mejores resultados se obtuvieron empleando SPA-LDA y RGB. Solo tres muestras fueron clasificadas incorrectamente. Una de ellas proveniente de la región Norte fue clasificada como perteneciente a la región de Sierra de la Ventana y otras dos muestras provenientes del sector Serrano fueron clasificadas incorrectamente como provenientes de la región Sur. Este comportamiento podría deberse al hecho de que estas tres muestras se encuentran localizadas en los límites de sus respectivas regiones.



La Figura 3.12 muestra el gráfico de las dos primeras funciones discriminantes (FD) para la clasificación usando SPA-LDA y RGB. Como se puede observar, existe una buena discriminación entre las muestras provenientes del Norte, del Sur y de Sierra de la Ventana, lo que demuestra la versatilidad de la selección de variables. A pesar de que la clasificación no fue correcta en un 100%, en el gráfico no se distinguen las tres muestras que fueron erróneamente clasificadas.

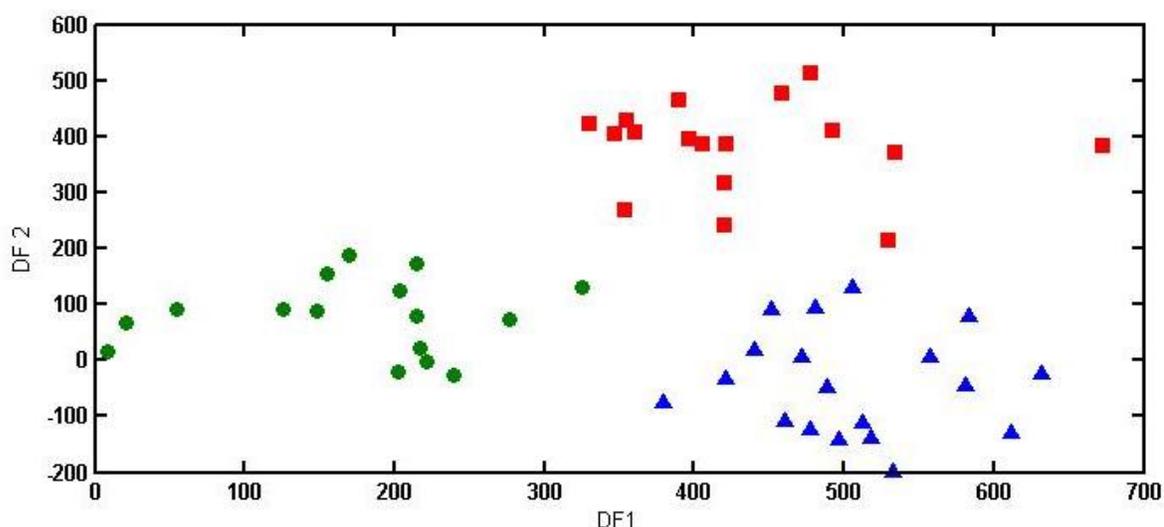


Figura 3.12. Funciones discriminante empleando SPA-LDA y RGB para el Norte (■), Sur (●) y Sierra de la Ventana (▲).

3.6 Conclusiones parciales

Se logró la clasificación de muestras de miel según su origen geográfico, mediante el análisis de imágenes digitales. La obtención de dichas imágenes se realizó empleando el sistema Flow-Batch diseñado, el cual incluyó una cámara web. Para llevar a cabo la clasificación, se emplearon tres herramientas quimiométricas con los diferentes modelos de color. Los resultados obtenidos muestran que SPA-LDA y el modelo de color RGB son herramientas de análisis



para discriminar las muestras de miel según su origen geográfico, llegando a una clasificación media de 97,3%.

El método propuesto tiene las siguientes ventajas: simple, bajo consumo de reactivos, tiempo y costo. Además, se requiere un mínimo de intervención humana y la muestra puede ser directamente analizada sin ningún tratamiento previo especial. El sistema Flow-Batch permite mantener inalterable la disposición de los componentes con el fin de obtener imágenes reproducibles.

Por lo tanto, este sistema es una buena alternativa para ser utilizado en laboratorios de control de calidad para la clasificación de las muestras de miel de acuerdo a su origen geográfico.



PARTE B

***Empleo de imágenes digitales
para determinar color en muestras
de miel provenientes de Argentina***



3.7 Introducción

El mercado interno de la miel en Argentina se encuentra poco desarrollado debido al bajo consumo de este producto. De hecho, el 95% de la producción nacional se destina a los mercados de exportación, los cuales exigen que los productos sean de buena calidad.

El color es la característica más importante desde el punto de vista comercial y alienta la exportación de miel. Este atributo varía según el origen geográfico de la miel y depende de los pigmentos (carotenos y xantofilas) y del contenido de polifenoles (flavonoides) ^[35-38].

La correcta medición del color permite a los exportadores elegir el mercado comercial más ventajoso para sus productos y es el único examen sensorial con una codificación precisa dentro de la normativa vigente. Para su comercialización, las mieles se clasifican internacionalmente utilizando la escala de color Pfund ^[29]. Sin embargo, en este método, colores semejantes no son fácilmente apreciados por el operador. Por otro lado, la determinación es lenta, requiere grandes cantidades de muestra y depende de la persona que realiza el análisis.

En la actualidad, existen pocos artículos publicados con el fin de obtener métodos alternativos para determinar el color de la miel. Gallez y col. propusieron una regresión polinómica cuadrática no lineal entre los valores de mmPfund y los métodos CIELAB por medio de análisis multivariado ^[39]. Otros autores han propuesto un método para la reconstrucción de espectros de reflectancia de miel mediante el análisis de vectores característicos para obtener el color de las



mismas ^[40]. La clasificación de la miel según el origen botánico se llevó a cabo mediante la determinación del color y otros parámetros característicos de la miel empleando una lengua electrónica ^[41]. Sin embargo, estos métodos requieren instrumentos de elevado costo que no están disponibles en los laboratorios de rutina. Además, los ensayos deben ser llevados a cabo por analistas especializados y utilizan procedimientos matemáticos complejos. Es por ello que es necesario desarrollar métodos alternativos para la determinación del color en muestras de miel para lograr medidas objetivas.

El objetivo de este estudio fue determinar el color de muestras de miel empleando imágenes digitales y calibración multivariada.

3.8 Materiales y métodos

3.8.1 Muestras

Ochenta muestras de miel provenientes de la región sudoeste de la Provincia de Buenos Aires se adquirieron en mercados locales. Las muestras se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta el momento de realizar el análisis.

3.8.2 Instrumentación y softwares

- ✓ Webcam Philips SPC900NC VGA con sensor CCD
- ✓ ImageJ 1.44p
- ✓ Unscrambler_ 9.7 (CAMO S/A)
- ✓ Matlab 6.5 (Mathworks Inc.) software.
- ✓ Colorímetro Pfund Koehler (New York, USA)



3.8.3 Método de referencia

La determinación de color se llevó a cabo de acuerdo con las disposiciones legales de la República Argentina, empleando un colorímetro Pfund Koehler. Mediante este dispositivo, se compara visualmente el color de la miel, colocada en forma líquida en una cubeta cuneiforme, con el color de un vidrio de color ámbar, colocados en un panel deslizante como se puede ver en la Figura 3.13 a.

La medición de color se realiza deslizando el panel hasta que el color de la muestra de miel coincide con el color del vidrio. La intensidad de color se expresa como la distancia (mm) que ha recorrido el panel hasta lograr la igualdad de color entre la miel y el estándar. La escala abarca desde colores ámbar claro hasta pardo oscuro (Figura 3.13 b). Deben tomarse diez lecturas de cada muestra, colocando el panel alternadamente a cada lado de la escala.



Figura 3.13. a) Colorímetro Pfund Koehler (New York, USA),
b) Graduación del color de la miel.



3.8.4 Obtención de imágenes digitales

Aproximadamente 10 g de miel se calentaron en un baño termostático a 40 °C para disolver los cristales de azúcar y luego se dejó reposar para eliminar las burbujas de aire. Se colocó la muestra de miel en una caja de petri de 6 cm de diámetro y utilizando una cámara web SPC900NC VGA se obtuvieron las imágenes digitales. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

La Figura 3.14 muestra el dispositivo empleado para la captura de las imágenes digitales. La cámara web se colocó en una posición fija sobre una lámpara fluorescente circular (22 W, 6400 K temperatura de color) de modo tal que quede ubicada en el centro de la misma. La muestra de miel se ubica debajo de la cámara. De esta manera, la iluminación y la distancia entre la muestra y la cámara se mantuvieron inalterables. El soporte utilizado en este estudio se colocó en una caja sellada para impedir el paso de la luz. Con el fin de evitar la dispersión de luz las paredes interiores de la caja fueron cubiertas con papel blanco.

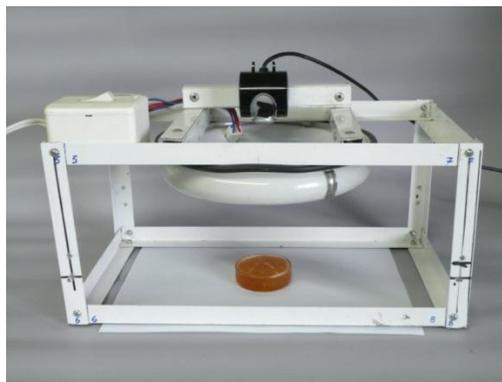


Figura 3.14. Dispositivo empleado para la obtención de imágenes digitales empleando una cámara web Philips SPC 900NC.



En la Figura 3.15, a modo de ejemplo, se pueden observar imágenes digitales obtenidas a partir de cuatro muestras de miel, con diferentes valores de mmPfund.

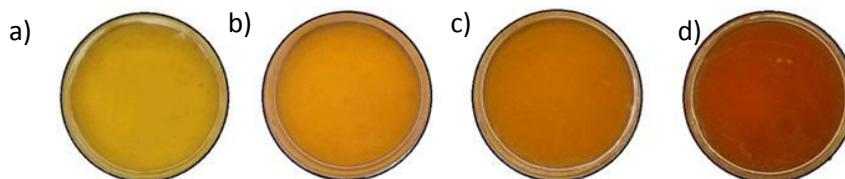


Figura 3.15. Las imágenes digitales obtenidas a partir de cuatro muestras de miel con diferentes valores de color: a) 14,7mmPfund, b) 35,0 mmPfund, c) 57,1 mmPfund y d) 95,0 mmPfund.

Por otra parte, empleando el mismo sistema de captura, se tomaron imágenes del vidrio color ámbar del colorímetro Pfund, deslizando el panel móvil cada 10 mm de la escala, de forma tal de utilizarlo como “material de referencia”. Al igual que las muestras de miel, este procedimiento se realizó por triplicado. La Figura 3.16 muestra tres ejemplos de las imágenes obtenidas

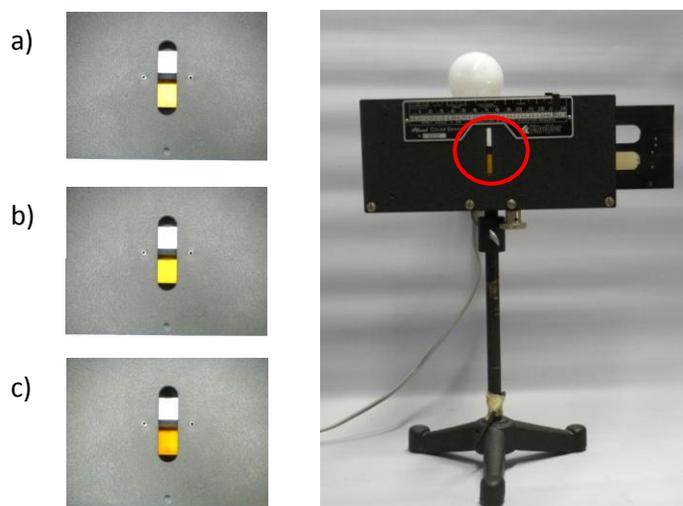


Figura 3.16. Imágenes digitales obtenidas de la cuña de vidrio colocada en el cabezal móvil del colorímetro con diferentes valores de color: a) 10,0 mmPfund, b) 40,0 mmPfund y c) 140,0 mmPfund.



3.8.5 Histogramas

Empleando el software de descarga gratuita ImageJ 1.44p, se analizaron las imágenes de las muestras de miel y del vidrio coloreado, obteniéndose los histogramas para cada modelo de color RGB, escala de grises y HSB. De la misma forma que en la Parte A del capítulo en curso, como fuente de información analítica, se emplearon los 256 tonos que componen cada color.

3.8.5.1 Imágenes del vidrio coloreado

En el caso de las imágenes del vidrio coloreado, se seleccionó una región cuadrada de 50x50 píxeles en el centro de cada imagen y se obtuvieron los histogramas, para luego promediar las tres réplicas.

3.8.5.2 Imágenes de las muestras de miel

Basándonos en la experiencia del trabajo de clasificación que se detalló en la Parte A de este capítulo, se seleccionó una región circular de 205x205 píxeles en el centro de cada imagen para llevar a cabo el análisis. Usando la región seleccionada, se obtuvieron los histogramas para cada modelo de color. Luego, se realizó un promedio a partir de las tres fotos de cada muestra.

En la Figura 3.17, a modo de ejemplo, se observa la interfaz del programa empleado, la región seleccionada de las imágenes de miel para llevar a cabo el análisis y los histogramas correspondientes a dicha región.

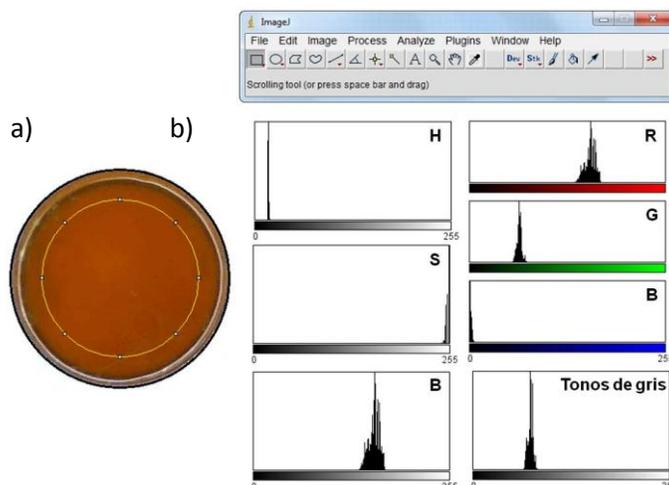


Figura 3.17. a) Región circular seleccionada en el centro de la imagen. b) El software ImageJ y los histogramas correspondientes de rojo (R), verde (G), azul (B), escala de grises, Matiz (H), saturación (S) y Brillo (B).

3.8.6 Análisis de datos

En el procedimiento PLS, hay dos pasos: en el primero se emplea el conjunto de calibración para establecer la relación entre la variable dependiente y la variable independiente (histogramas), para luego construir los modelos. En el segundo paso los resultados del modelo de calibración se utilizan para estimar el color de las muestras del conjunto de predicción a partir de los histogramas obtenidos. Los modelos de calibración se construyeron empleando el software Unscrambler 9,7.

3.8.6.1 Modelos generados a partir de las imágenes del vidrio coloreado

En primer lugar, mediante PLS (mínimos cuadrados parciales), se construyeron modelos de calibración para RGB, escala de grises y HSB empleando los datos obtenidos de las imágenes del vidrio coloreado y su



correspondiente valor de mmPfund. Sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios ya que el valor de color promedio de las muestras de miel fue superior al del vidrio coloreado, y por ello la predicción no pudo llevarse a cabo de esta forma. Esto puede deberse a la transparencia del vidrio en comparación con la muestra de miel que es más opaca y, por lo tanto, no deja pasar la luz proveniente de la lámpara.

3.8.6.2 Modelos generados a partir de las imágenes de las muestras de miel

En segundo lugar, se construyeron modelos de calibración para RGB, escala de grises y HSB empleando como variable dependiente, el valor de color de la miel en mmPfund y como variable independiente, los histogramas correspondientes a las imágenes de miel.

Para ello el conjunto total de 80 muestras de miel se distribuyeron en conjuntos de calibración (60) y predicción (20) mediante el algoritmo Kennard-Stone usando el software Matlab® 6.5 (The Mathworks).

Para validar los modelos se utilizó la validación cruzada o cross validation (CV) ^[42]

3.9 Resultados y discusión

La evaluación de los resultados del modelo de calibración se estimó mediante la raíz del error cuadrático medio de la calibración (RMSEC). Este valor (expresado en mmPfund) es una medida de la diferencia media entre los valores



predichos y medidos de la respuesta en la etapa de calibración. El RMSECV (Error cuadrático medio de validación cruzada) es una medida de la diferencia media entre los valores predichos y medidos de la respuesta en la fase de validación. Este parámetro explica la capacidad del modelo para predecir una nueva muestra. La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos para los modelos creados a partir del conjunto de calibración, utilizando los tres modelos de color, RGB, escala de gris y HSB.

Tabla 3.2. Resultados de los modelos de calibración.

Model	VL ^a	RMSEC	RMSECV	r	Pendiente	Bias	Correlación
RGB	6	2,60	4,73	0,97	0,97	$7,15 \times 10^{-7}$	0,98
Escala de gris	4	3,14	4,33	0,97	0,97	$5,88 \times 10^{-7}$	0,98
HSB	4	2,06	3,63	0,98	0,98	$-1,28 \times 10^{-6}$	0,99

^aVariables latentes

Como se puede observar de los valores de RMSEC y RMSECV, los mejores resultados se obtuvieron empleando el modelo de color HSB.

Con el fin de identificar y eliminar variables ruidosas, se realizó el análisis de la Importancia de las Variables en la Proyección (VIP) en base a los coeficientes de regresión ^[43-45]. Además se realizó un Análisis de Valores Atípicos (*otliers*) que se evidencian a través de un gráfico de influencia. Este gráfico muestra las varianzas residuales de la variable dependiente (y) de cada muestra en función de su influencia en el modelo (leverage). Se consideran *otliers* aquellas muestras que poseen alta varianza residual y gran influencia. ^[46]. A partir de estos análisis se



identificó una muestra anómala, la cual fue removida del modelo final y 446 variables ruidosas las cuales fueron eliminadas.

El número óptimo de variables latentes se determina a partir del mínimo del gráfico del error de validación frente al número de componentes (Figura 3.18).

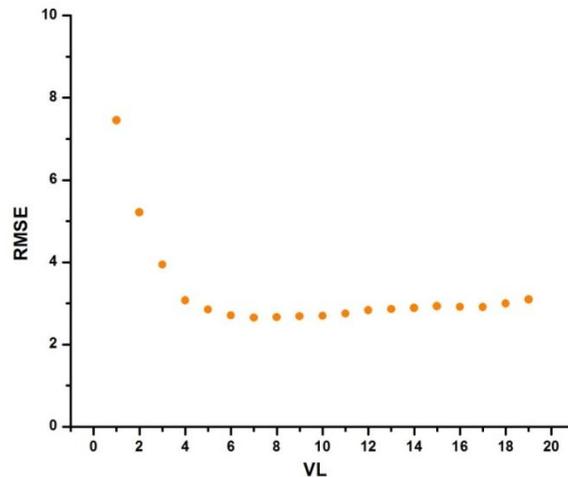


Figura 3.18. Gráfico del error de validación frente al número de variables latentes.

En la Tabla 3.3 se muestran los parámetros de calibración y validación del modelo final. La calidad del modelo de calibración se evaluó mediante el error cuadrático medio de validación cruzada (3,07), coeficiente de correlación r^2 (0,96) y BIAS (0,0173) que muestran valores aceptables. También se observa una buena correlación (0,99 y 0,98) entre los valores experimentales y de referencia, tanto para la calibración como para la validación.



Tabla 3.3 Resultados finales para el modelo de color HSB.

Modelo HSB	VL	Muestras	Variables	RMSE	r	Pendiente	BIAS	Correlación
Calibración	4	59	322	1,92 ^a	0,98	0,98	-5,17x10 ⁻⁷	0,99
Validación	4	59	322	3,07 ^b	0,96	0,93	0,0173	0,98

^aRMSEC
^bRMSECV

La Figura 3.19 muestra una gráfica de residuos de las variables dependiente en función de los valores de color de las muestras del conjunto de calibración.

Si el modelo predice adecuadamente las variaciones en Y, cualquier variación residual debe ser provocada sólo por el ruido, lo que significa que los residuos deberían estar distribuidos al azar. Como puede verse, los residuos efectivamente se distribuyen al azar, lo cual significa que el modelo generado predice adecuadamente las variaciones en Y.

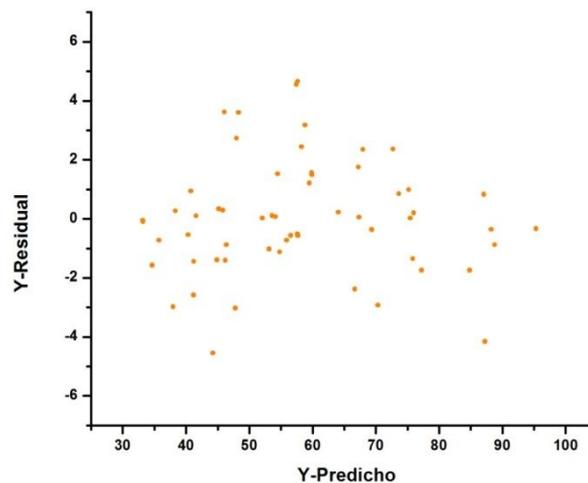


Figura 3.19. Gráfica de residuos en función de los valores de color de las muestras del conjunto de calibración.



La Figura 3.20 muestra la correlación entre los valores de color calculados por las imágenes digitales (método propuesto) y los valores determinados por el método Pfund (método de referencia) en el modelo de color HSB. Teniendo en cuenta que los puntos están distribuidos al azar alrededor de la línea bisectriz a lo largo de toda la gama de valores predichos, se puede concluir que no hay evidencia de errores sistemáticos. Los valores obtenidos del error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y el coeficiente de correlación (r^2) fueron 2,46 mmPfund y 0,97 respectivamente.

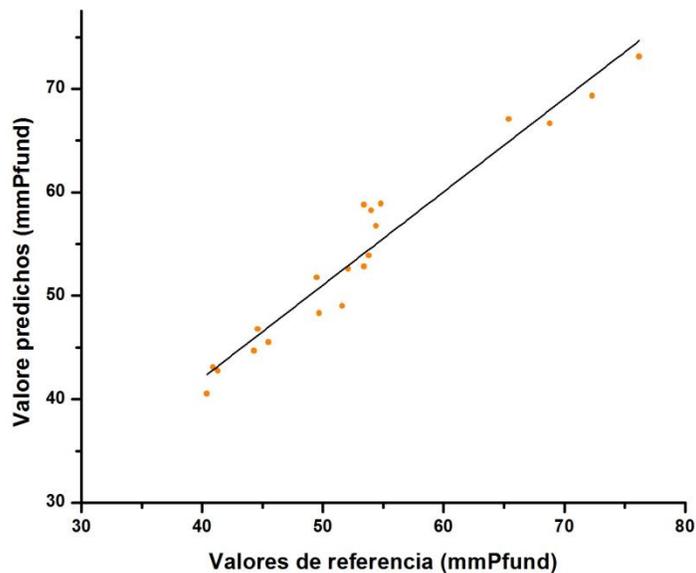


Figura 3.20. Grafico de la correlación entre los valores predichos mediante el análisis de imágenes digitales y los valores de referencia obtenidos mediante el colorímetro Pfund.

En la etapa de calibración, el modelo HSB, el cual resultó ser el más adecuado para predecir el valor de mmPfund, relaciona el histograma de color con el valor



de color de la muestra de miel, obtenido mediante una comparación visual por parte del operador (método Pfund). Los resultados obtenidos se pueden explicar teniendo en cuenta que este modelo se basa en la forma en la que el ojo humano percibe los colores.

3.10 Conclusiones parciales

En este trabajo se propuso un método analítico para la determinación del color de muestras de miel del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Este método emplea como información analítica los histogramas obtenidos a partir del análisis de imágenes digitales y una herramienta estadística básica como PLS. Tres modelos de color, RGB, escala de grises y HSB, fueron utilizados para analizar las imágenes digitales. Los resultados obtenidos empleando el modelo de color HSB, indican que el uso de imágenes digitales combinadas con calibración multivariada es una estrategia excelente para cuantificar el color en muestras de miel. El método propuesto es simple, rápido, no requiere un tratamiento de muestra ni uso de reactivos y no genera residuos. Otra ventaja es que permite una evaluación objetiva del color con la consecuente reducción de los errores debidos a la participación humana.

El método propuesto es una buena alternativa para evaluar el color de la miel y contribuir al control de calidad de muestras de miel.



3.11 Bibliografía

- [1] P.M. Cooke. "Chemical Microscopy". *Analytical Chemistry* 64 (1992) R243.
- [2] B.G. Botelho, L.P. de Assis, M.M. Sena. *Food Chemistry* 159 (2014) 175.
- [3] G. Foca, F. Masino, A. Antonelli, A. Ulrici. *Analytica Chimica Acta* 706 (2011) 238.
- [4] K.D. Tavares Melo Milanez, M.J.C. Pontes. *Microchemical Journal* 113 (2014) 10.
- [5] C. Solomon, T. Breckon. *Fundamentals of digital image processing*. Wiley-Blackwell, 2011.
- [6] M. Ghasemi-Varnamkhasti, S.S. Mohtasebi, M.L. Rodriguez-Mendez, A.A. Gomes, M.C.U. Araújo, R.K.H. Galvão. *Talanta* 89 (2012) 286.
- [7] C.E. Tanajura da Silvaa, V.L. Filardia, I. Muniz Pepea, M.A. Chaves, C.M.S. Santos. *Food Control* 47 (2015) 86.
- [8] L.M. de Souza, H. Mitsutake, L. Caixeta Gontijo, W. Borges Neto. *Fuel* 130 (2014) 257.
- [9] G. Verasa A. de Araujo Gomes, A.C. da Silva, A.L. Bizerra de Brito, P.B. Alves de Almeida, E.P. de Medeiros. *Talanta* 83 (2010) 565.
- [10] G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque. *Quimiometría*, Editorial Síntesis S.A. 1999.
- [11] Miller and Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4^{ta} edición, Pearson Education, S.A., Madrid 2002.
- [12] I.T. Jolliffe. *Principal Component Analysis, Second Edition*. Springer 2002.



- [13] S. Wold, M. Sjostrom. SIMCA: A Method for Analyzing Chemical Data in Terms of Similarity and Analogy. In Chemometrics: Theory and Application; Kowalski, B. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1977.
- [14] Chemometrics in Food Chemistry, Data Handling in Science and Technology Vol 28, Elsevier 2013.
- [15] S. F.C. Soares, A.A. Gomes, A. R. Galvao Filho, M.C.U. Araujo, R. Kawakami Harrop Galvao. Trends in Analytical Chemistry 42 (2013) 84.
- [16] M. Bassbasi, M. De Luca, G. Ioele, A. Oussama, G. Ragno. Journal of Food Composition and Analysis 33 (2014) 210.
- [17] R.G. Brereton, Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, Wiley, Chichester, 2003.
- [18] R.W. Kennard. L.A. Stone. Technometrics, 11 (1969) 137.
- [19] M.S. Finola, M.C. Lasagno, J.M. Marioli. Food Chemistry 100 (2007) 1649.
- [20] M.I. Isla, A. Craig, R. Ordoñez, C. Zampini, J. Sayago, E. Bedascarrasbure, A. Alvarez, V. Salomón, L. Maldonado. LWT - Food Science and Technology 44 (2011) 1922.
- [21] M.V. Baroni, M.L. Nores, M.P. Díaz, G.A. Chiabrande, J.P. Fassano, C. Costa, D.A. Wunderlin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (2006) 7235.
- [22] E. Corbella, D. Cozzolino. LWT - Food Science and Technology 39 (2006) 534.
- [23] R.G. Pellerano, M.A. Uñates, M.A. Cantarelli, J.M. Camiña, E.J. Marchevsky. Food Chemistry 134 (2012) 578.



- [24] I. Escriche, M. Kadar, M. Juan-Borrás, E. Domenech. *Food Research International* 44 (2011) 1504.
- [25] C. de Alda-Garcilope, A. Gallego-Picó, J.C. Bravo-Yagüe, R.M. Garcinuño-Martínez, P.Fernández-Hernando. *Food Chemistry* 135 (2012) 1785.
- [26] P.M. Cometto, P.F. Faye, R.D. Di Paola Naranjo, M.A. Rubio, M.A.J. Aldao. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 5079.
- [27] M.V. Baroni, C. Arrua, M.L. Nores, P. Fayé, M.P. Díaz, G.A. Chiabrandó, D.A. Wunderlin. *Food Chemistry* 114 (2009) 727.
- [28] A.C. Soria, M. González, C. de Lorenzo, I. Martínez-Castro, J. Sanz. *Food Chemistry* 85 (2004) 121–130.
- [29] IRAM 15941, Determinación de color Pfund 1997.
- [30] R.E. Larraín, D.M. Schaefer, J.D. Reed. *Food Research International* 41 (2008) 380.
- [31] S.I.E. Andrade, M.B. Lima, I.S. Barreto, W.S. Lyra, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo, E.C. Silva. *Microchemical Journal* 109 (2013) 106.
- [32] M.B. Lima, S.I.E. Andrade, I.S. Barreto, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo. *Microchemical Journal* 106 (2013) 238.
- [33] E. da Nobrega Gaiao, V.L. Martins, W.S. Lyra, L.F. Almeida, E.C. Silva, M.C.U. Araújo. *Analitica Chimica Acta*. 570 (2006) 283.
- [34] P.H.G.D. Diniz, H.V. Dantas, K.D.T. Melo, M.F. Barbosa, D.P. Harding, E.C.L. Nascimento, M.F. Pistonesi, B.S.F. Band, M.C.U. Araújo. *Analytical Methods* 4 (2012) 2648.
- [35] I.K. Karabagias, A. Badeka, S. Kontakos, S. Karabournioti, M.G. Kontominas. *Food Research International* 55 (2014) 363.



- [36] M.F. Silvano, M.S. Varela, M.A. Palacio, S. Ruffinengo, D.K. Yamul. *Food Chemistry* 152 (2014) 500.
- [37] C.I. G. Tuberoso, I. Jerkovic, G. Sarais, F. Congiu, Z. Marijanovic, P. Marek Kus. *Food Chemistry* 145 (2014) 284.
- [38] M.O. Iurlina, A.I. Saiz, R. Fritz, G.D. Manrique. *Food Chemistry* 115 (2009) 1141.
- [39] L.M. Gallez, A. Marconi, E. Tourn, L. Gonzalez-Miret and F.J. Heredia, Color of Honeys from the Southwestern Pampas Region Relationship between the Pfund Color Scale and CIELAB Coordinates, in J.L. Caivano, M.P. Buera (Eds.), *Color in Food: Technological and Psychophysical Aspects* CRC Press, 2012, pp. 133–142.
- [40] M.L. González-Miret, F. Ayala, A. Terrab, J.F. Echávarri, A.I. Negueruela, F.J. Heredia. *Food Research International* 40 (2007) 1080.
- [41] I. Escriche, M. Kadara, E. Domenech, L. Gil-Sánchez. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 449.
- [42] D.M. Haaland, E.V. Thomas. *Analytical Chemistry* 60 (1988) 1193.
- [43] T. Mehmood, K.H. Liland, L. Snipen, S. Sæbø. *chemometrics and intelligent laboratory systems*, 118 (2012). 62.
- [44] A. Wang, L. Xie. *Journal of Food Engineering* 143 (2014) 17.
- [45] F. Liu, Y. He, L. Wang. *Analytica Chimica Acta* 615 (2008) 10.
- [46] L. Xie, X. Ye, D. Liu, Y. Ying. *Food Chemistry* 114 (2009) 1135.



CAPÍTULO 4

***Determinación simultánea
de hidratos de carbono y
prolina en miel mediante
Electroforesis Capilar***



4.1 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método analítico para la determinación simultánea de fructosa, glucosa y prolina en muestras de miel de Argentina y Suecia, mediante la técnica de Electroforesis Capilar.

La fase inicial de este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Físico-química Aplicada, Departamento de Química, Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería, Real Instituto de Tecnología (KTH), Estocolmo, Suecia, en el marco del Programa Erasmus Mundus Action-2 Strand-1, beca EuroTango2. La segunda etapa, se realizó en el Laboratorio de Química Analítica, Departamento de Química, INQUISUR, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.



4.2 Introducción

La composición y calidad de la miel depende principalmente del néctar, el cual está relacionado con las especies vegetales que la abeja tiene a su disposición y de factores externos, como por ejemplo, el tipo de suelo, el clima, el procesamiento y el manejo de la miel una vez que es cosechada por el apicultor [1-2]. La correcta manipulación del producto por parte del apicultor, es uno de los factores más importantes que ejerce su influencia en la calidad de la miel. Para lograr obtener un producto limpio, traslúcido, sin aromas ni sabores extraños, de gran valor nutritivo y con buenas propiedades de conservación, es importante mantener la higiene de los establecimientos y elementos utilizados, extraer la miel apropiadamente, cosecharla en el momento adecuado y almacenarla de forma correcta. Un producto sobrecalentado en cambio, recogido en sitios inadecuados, con impurezas de cualquier índole, cosechado antes de que haya concluido su proceso natural de fermentación y deshidratación, puede dar como resultado una miel de calidad inferior. Si bien el tiempo de cosecha varía en las diferentes zonas del país, debido a que está sujeto a las condiciones climáticas que influirán en los ciclos florales, en todos los casos, los parámetros que se deben tener en cuenta para poder llevar a cabo la cosecha son: panales sin cría, huevos o larvas y que tengan como mínimo el 90% de miel operculada (sellada) [3]. En ese sentido resultan importantes las investigaciones sobre las características químicas y físicas del producto, tendientes a garantizar la calidad de la miel producida en las distintas regiones productoras del país [4-5].



En el Capítulo X del Código Alimentario Argentino (C.A.A.) y en la norma 12-1981 del Codex Alimentarius quedan establecidas las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas, de calidad y genuinidad que debe cumplir la miel ^[6-7]. Dentro de las características físico-químicas relacionadas con la madurez de la miel, se encuentra la determinación de **azúcares reductores, fructosa y glucosa**. Según lo establecido por el C.A.A. se requiere que las mieles de flores contengan como mínimo un 65% en peso de ambos monosacáridos. Por su parte el Codex Alimentarius exige un mínimo de 60%. Además de contribuir con el valor nutricional y energético de la miel, estos azúcares influyen en algunas características físicas importantes del producto. Por ejemplo la glucosa, por su menor solubilidad, es el monosacárido responsable de la cristalización, fenómeno que disminuye la aceptación por parte de los consumidores ^[8-9]. La acidez de la miel también está fuertemente relacionada con el contenido de glucosa, la cual se transforma en ácido glucónico debido a la presencia de glucosa oxidasa (enzima presente en la abeja). La genuinidad del producto puede asociarse a la relación fructosa/glucosa ya que un valor inferior a uno, puede indicar adulteración o proliferación de levaduras ^[10]. Por otro lado, la determinación de fructosa y glucosa es utilizada para describir la calidad y genuinidad de la miel, considerando que la adición deliberada de jarabes de sacarosa o fructosa produce miel adulterada ^[11-12]. La determinación de los hidratos de carbono presentes en la miel se lleva a cabo empleando diferentes métodos, como cromatografía líquida de alta resolución con detección amperométrica de pulsos ^[13], cromatografía gaseosa ^[14], resonancia magnética nuclear ^[15] o espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier ^[16].



Otro criterio para evaluar la calidad de la miel es la determinación del contenido de **prolina**, aminoácido predominante en la miel, que indica el nivel total de aminoácidos presentes. Según el Codex Alimentarius, las mieles genuinas deben contener un mínimo de 180 mg prolina/kg miel, aunque este valor puede variar según el tipo de miel ^[17-19]. El contenido de prolina es uno de los parámetros de calidad adicionales, a los estándares de control de la miel de abejas, referido a su maduración y, en algunos casos, permite detectar adulteraciones ^[20]. Para la determinación de los aminoácidos se ha empleado cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica ^[21] y cromatografía líquida con detección UV y espectrometría de masas ^[22].

Por otra parte, los métodos oficiales para llevar a cabo la determinación de dichos compuesto requieren grandes cantidades de reactivos y largos tiempos de análisis. La cuantificación de azúcares reductores se realiza empleando el método de Fehling Causse Bonnans ^[23]. La determinación de prolina, se lleva a cabo espectrométricamente a 520 nm, luego de la generación del complejo que forma con la ninhidrina, por el agregado de 2-propanol ^[24].

4.3 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar constituye una técnica de separación basada en las diferentes velocidades (movilidad) de especies cargadas eléctricamente, sometidas a la acción de un campo eléctrico. El medio de separación se denomina medio electroforético y suele ser una disolución tampón que actúa simultáneamente como conductor de la corriente eléctrica.



Si bien la electroforesis capilar puede llevarse a cabo de diferentes modos, tales como electroforesis capilar en zona (ECZ), electroforesis capilar en gel (ECG), cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM), electrocromatografía capilar (ECC), isoelectroenfoque capilar (IEEC) e isotacoforesis capilar (ITFC), la ECZ es la modalidad más utilizada debido a su simplicidad operacional y versatilidad.

En la Figura 4.1 se muestra un esquema básico de un equipo de electroforesis capilar, el cual está constituido por un capilar, una fuente de alto voltaje, recipientes para contener la disolución tampón y un sistema de detección.

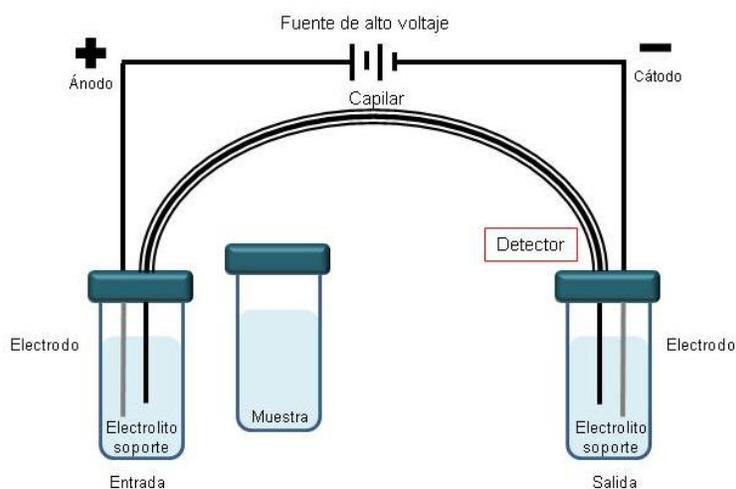


Figura 4.1. Esquema básico de un sistema de electroforesis capilar.

4.3.1 Fundamento de las separaciones electroforéticas

La migración de las especies en el interior del capilar de separación se rige por dos fenómenos, que tienen lugar simultáneamente: electromigración y electroósmosis.



Electromigración

Al aplicar un campo eléctrico las especies cargadas migrarán, a través del medio electroforético, a diferentes velocidades. A esa velocidad se la denomina **velocidad electroforética (v_e)**:

$$v_e = \mu_e \cdot E$$

donde,

E: campo eléctrico aplicado y

μ_e : movilidad electroforética

La separación de las especies cargadas se debe a las diferencias en las velocidades electroforéticas de cada especie, relacionadas con la carga y el tamaño de las mismas. La movilidad electroforética de cada especie viene dada por:

$$\mu = \frac{e}{6\pi\eta r}$$

donde

e: carga del soluto ionizado

η : viscosidad de la disolución tampón

r: radio del soluto

De esta ecuación se deduce que, para un campo eléctrico dado, especies pequeñas con una gran carga eléctrica se desplazarán más rápido a través del capilar que las moléculas con una menor carga. También queda en evidencia, que las especies neutras ($e = 0$), tendrán una movilidad electroforética nula.



Electroósmosis

Es un fenómeno básico en todos los procesos de separación electroforética y se puede definir como el movimiento relativo de un líquido (medio electroforético) con respecto a una superficie cargada (pared del capilar), bajo la acción de un campo eléctrico. Este movimiento es lo que se conoce como **flujo electroosmótico (FEO)**. El flujo electroosmótico es el responsable del movimiento de los solutos a través del capilar desde el ánodo hasta el cátodo. Los capilares de sílice fundida, que son los más ampliamente utilizados en EC, tienen grupos silanoles en su superficie (Si-OH) que se ionizan a $\text{pH} \geq 3$, por lo que la pared del capilar presentará carga negativa (Si-O⁻). De acuerdo con la teoría de la doble capa eléctrica, en la pared del capilar se formará una primera capa (capa fija) de contraiones (cationes) que son atraídos por la carga negativa del capilar. Como estos cationes no tienen la suficiente densidad para compensar todas las cargas negativas, se adhiere otra capa de cationes que, por estar más lejos de los grupos silanoles, está menos fuertemente unida a ellos y constituye la llamada capa móvil. Al aplicar un campo eléctrico, el exceso de cationes de la capa móvil se ve impulsado hacia el cátodo arrastrando el conjunto de la disolución, generando así el flujo electroosmótico (FEO). Una característica única del FEO es que su perfil de velocidades es cuasi plano, a diferencia de lo que ocurre en el flujo originado por sistemas conducidos por presión. En ellos, las fuerzas de fricción entre el sólido y el líquido generan un perfil de velocidad, que es mayor en el centro y menor en las proximidades de las paredes, dando lugar a perfiles de flujo laminares o parabólicos. En cambio, en sistemas conducidos por electricidad, el flujo de líquido presenta un perfil cuasi



plano, debido a que la fuerza conductora se distribuye uniformemente a lo largo del capilar. Esto puede observarse en la Figura 4.2.

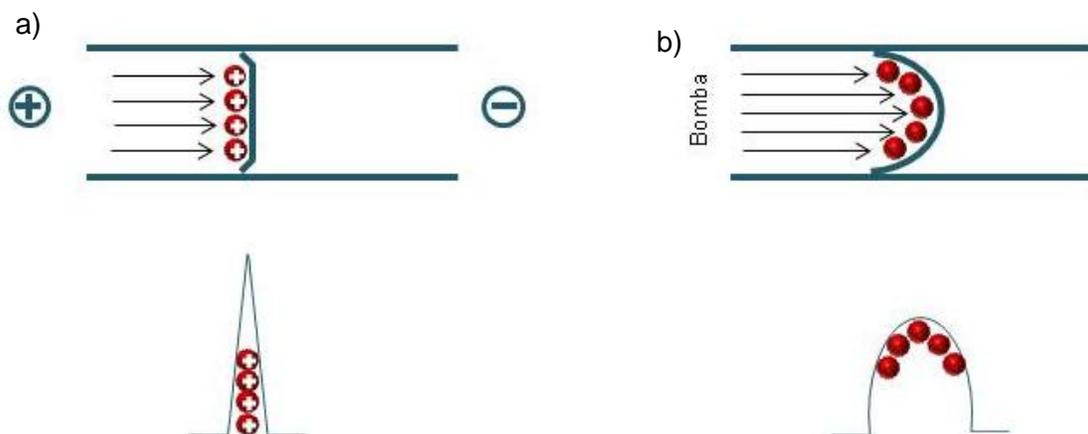


Figura 4.2 a) Flujo electroosmótico. b) Flujo laminar.

Es importante conocer las características del FEO para poder controlarlo, ya sea reduciéndolo, aumentándolo, eliminándolo o cambiándolo de sentido. La forma más simple de modificarlo, por ejemplo, es ajustando el pH y la fuerza iónica. También es posible cambiar el sentido del flujo para poder determinar ciertos analitos, en especial aniones. En la electroforesis capilar de zona convencional, el detector se encuentra al lado del cátodo, las moléculas cargadas del soluto tenderán a migrar hacia el electrodo que tiene la carga opuesta y se separarán debido a las diferentes velocidades. El movimiento de las especies cargadas positivamente, se ve acelerado por la atracción electrostática al electrodo negativo y, por lo tanto, su velocidad electroforética será mayor que la del FEO. En cambio, los solutos cargados negativamente se mueven más lentamente que el FEO, debido a que son repelidos por el electrodo negativo. De hecho, sin la existencia del FEO no sería posible realizar la detección de las



especies cargadas negativamente, ya que sólo migrarían hacia el recipiente inicial y no pasarían por el detector. Finalmente, los analitos neutros son llevados a la velocidad del FEO, pero no pueden ser separados unos de otros. Por lo tanto, el orden de elución de las especies de la muestra será, primero los cationes, luego las especies neutras y, finalmente, los aniones, como muestra la Figura 4.3.

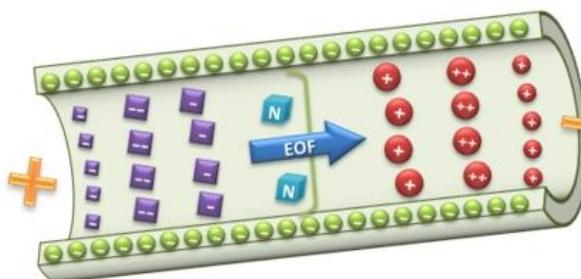


Figura 4.3. Representación esquemática de la migración de especies en presencia de flujo electroosmótico.

Para determinar únicamente especies aniónicas, es necesario invertir la polaridad del campo eléctrico y cambiar el sentido del flujo electroosmótico. De esta forma, el detector estará al lado del ánodo, eluyendo primero los aniones, luego las especies neutras y, finalmente, los cationes.

4.3.2 Aspectos instrumentales

En la Figura 4.1 se presentó un esquema básico de los instrumentos utilizados en EC. A continuación se van a describir, con más detalle, algunos aspectos instrumentales característicos de la técnica.



4.3.2.1 Fuente de alto voltaje

Es una fuente de alimentación conectada a dos electrodos de platino inmersos en un electrolito. Las separaciones electroforéticas suelen llevarse a cabo aplicando voltajes entre 5 y 30 kV. La fuente de poder debe estar acompañada de un dispositivo capaz de invertir su polaridad, para poder llevar a cabo la determinación de especies aniónicas, como se mencionó anteriormente.

4.3.2.2 Recipientes para contener la disolución tampón

Durante las separaciones los extremos del capilar y los electrodos de platino están colocados en dos recipientes que contienen una disolución del electrolito, el mismo con el que se ha llenado el capilar. El nivel de líquido debe ser el mismo para evitar cualquier flujo debido a un desequilibrio hidrostático.

4.3.2.3 Capilar

El material que constituye el capilar debe ser química y eléctricamente estable, transparente a la luz ultravioleta y flexible. Generalmente son de sílice fundida, recubiertos de poliamida, para hacerlos más resistentes, siendo más flexibles que el vidrio y muy irrompibles. La longitud aproximada suele encontrarse entre 30-100 cm. El diámetro interno suele ser de 10 a 100 μm y el externo de 190 a 375 μm . Las dimensiones del diámetro externo son muy importantes para la correcta disipación del calor generado. Para poder llevar a cabo la detección, una pequeña sección del recubrimiento de poliamida es eliminada (ventana de detección).



4.3.2.4 Sistemas de inyección

La inyección de la muestra es una etapa crucial en EC, ya que se trabaja con volúmenes muy pequeños (se suelen inyectar volúmenes de 1-50 nL) debido a las reducidas dimensiones del capilar. Si no existe un buen sistema de inyección, la separación no será satisfactoria. Los dos métodos de inyección más utilizados son la inyección hidrodinámica y la electrocinética.

i) Inyección hidrodinámica

- a) Por presión: consiste en colocar el extremo inicial del capilar dentro del recipiente de la muestra y aplicar presión a dicho recipiente.
- b) Por succión: consiste en aplicar vacío al recipiente de destino colocando el comienzo del capilar dentro del recipiente que contiene la muestra.
- c) Por gravedad: la inyección de la muestra se consigue colocando el extremo inicial del capilar dentro del recipiente de la muestra y elevando dicho recipiente una cierta altura para permitir que la muestra ingrese en el capilar.

ii) Inyección electrocinética

Consiste en colocar el capilar y el ánodo dentro del recipiente de la muestra y aplicar un voltaje pequeño (1-5 kV) durante un corto periodo de tiempo (1-10 segundos), haciendo migrar los componentes de la muestra dentro del capilar.



4.3.2.5 Sistemas de detección

En general, la detección se realiza directamente sobre el capilar, lo cual significa que el mismo actúa como celda de detección. Debido a las pequeñas dimensiones del capilar, la detección en EC es un gran desafío. La detección UV-Vis es la más comúnmente utilizada, debido a su posibilidad para determinar un gran número de compuestos y grupos funcionales, a pesar de su menor sensibilidad comparada con otros sistemas como los luminiscentes o electroquímicos.

La detección UV-Vis puede llevarse a cabo mediante detección directa, si la sustancia a analizar tiene algún grupo cromóforo en su molécula, y mediante detección indirecta, si no presenta ningún grupo cromóforo. El modo de detección indirecta es muy empleado en electroforesis capilar, ya que son muchos los compuestos analizados, como iones inorgánicos y orgánicos, que no poseen grupos cromóforos en su estructura molecular. La técnica consiste en añadir, a la disolución tampón, especies que absorben radiación UV-Vis fuertemente. De esta forma, cuando una sustancia no absorbente pasa por el detector, se obtiene una señal negativa, como se muestra en la Figura 4.4.

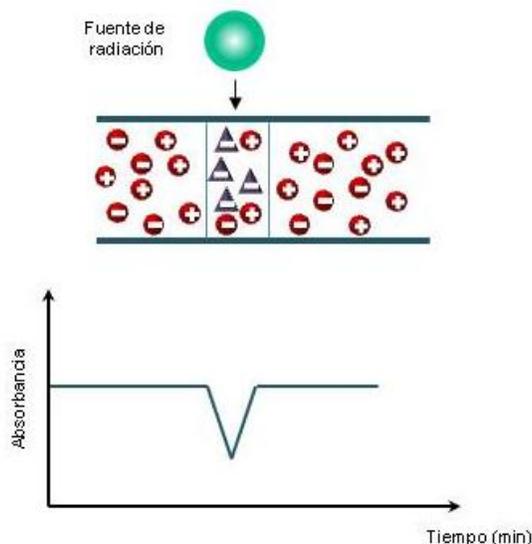


Figura 4.4. Representación esquemática de la detección indirecta.

Este conjunto básico de componentes puede ser ampliado y mejorado mediante un muestreador automático, distintos sistemas de inyección de la muestra, control de temperatura en muestras y capilar, sistemas de detección múltiples y software para el tratamiento de datos, entre otros.

4.4 Materiales y métodos

4.4.3 Preparación de las muestras

Se emplearon seis muestras comerciales de miel: tres provenientes de Argentina y tres de Suecia. Para llevar a cabo la determinación se pesaron 200 mg de miel y se llevó a un volumen final de 10,0 mL con agua.



4.4.4 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 mΩ) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- ✓ Solución estándar de fructosa: se disolvieron 2,25 g D-fructosa (Merck) y se llevó a volumen de 25,0 mL con agua.
- ✓ Solución estándar de glucosa: se disolvieron 2,25 g D-(+)-glucosa (Merck) y se llevó a volumen de 25,0 mL con agua.
- ✓ Solución estándar de prolina: se disolvieron 100 mg de Prolina (Fluka) y se llevó a volumen final de 10,0 mL.
- ✓ Benzoato de Sodio: se disolvieron 0,2882 g de benzoato de sodio (Anedra) y se llevó a volumen final de 100,0 mL con agua.
- ✓ Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB): se disolvieron 0,1822 g de CTAB (Mallinckrodt) y se llevó a volumen final de 100,0 mL con agua.
- ✓ Hidróxido de sodio: solución 1 M.(Anedra).
- ✓ Ácido clorhídrico: solución 1 M.(Cicarelli).

4.4.5 Instrumentación y software

- ✓ Equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter, equipado con un arreglo de diodos, operando a una longitud de onda de 224 nm, con detección indirecta.
- ✓ Capilar de 50 μm de diámetro interno (DI) y 68 cm de longitud, Beckman System.
- ✓ Control y procesamiento de datos: se llevó a cabo con el 32 Karat software.



4.5 Resultados y discusión

La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida (68 cm de longitud efectiva, 50 μm DI) con una fuente de alimentación negativa de 25 kV a 25 °C. Las inyecciones de los estándares y de la muestra se realizaron en el modo hidrodinámico, aplicando una presión de 0,5 psi durante 3 s. El electrolito soporte estuvo compuesto por 10 mmol L^{-1} de benzoato de sodio y 1,5 mmol L^{-1} CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) a pH 12,4. El capilar se acondicionó por el lavado diario con una solución de 0,1 mol L^{-1} de NaOH (5 min), agua ultrapura (3 min) y solución tampón (5 min).

La detección de los tres analitos de forma simultánea, se llevó a cabo espectrométricamente, de forma indirecta, trabajando a una longitud de onda de 224 nm.

4.5.6 Optimización de los parámetros electroforéticos

La optimización de los parámetros se llevó a cabo mediante la inyección de una solución patrón compuesta por 20 mg L^{-1} de prolina, 1,801 g L^{-1} de fructosa y glucosa. El criterio de evaluación para la elección de los parámetros finales se basó en la resolución (separación de los picos electroforéticos) de los tres analitos, la estabilidad de la línea de base y el menor tiempo de análisis.

4.5.6.6 Electrolito soporte

En cuanto al electrolito soporte se optimizó la composición, pH y concentración de la disolución.



Debido a que ninguno de los analitos en estudio posee grupos cromóforos en su molécula, se llevó a cabo la detección indirecta de los mismos. Para ello, el electrolito soporte estuvo conformado por un ion cromóforo.

Existen distintos criterios para seleccionar a los iones cromóforos:

- * Su movilidad debe ser similar a la de los solutos para que no aparezcan picos asimétricos.
- * Deben tener una absortividad molar alta para que se produzca una disminución considerable de la absorbancia al ser desplazados por el analito no absorbente.

En este trabajo como posibles cromóforos, se estudiaron el benzoato de sodio y el ácido 2,6-piridindicarboxílico (PDC) ^[25-26]. Ambos cumplen con los criterios de selección antes mencionados ya que sus movilidades electroforéticas son similares a la de los analitos y su absortividad molar es elevada. El empleo de PDC y benzoato de sodio permitió la separación de los tres analitos con una buena resolución. Sin embargo, en el primer caso se obtuvo una línea de base inestable. Esto perjudicaría la detección de pequeñas cantidades de los compuestos a determinar, ya que no sería posible diferenciar el pico electroforético de la línea de base. Empleando benzoato de sodio, se obtuvo una buena línea de base. Además, este cromóforo es más adecuado para el análisis de compuestos con baja movilidad, como son la prolina y los hidratos de carbono ^[27]. Se estudió su comportamiento en un intervalo de concentraciones entre 10 a 35 mM, no observándose variaciones en la resolución de los analitos. Por lo tanto, se trabajó con una concentración de 10 mM. En estas condiciones se logra



una buena relación señal/ruido, permaneciendo estables la línea de base y la corriente.

Por otro lado, se estudió el efecto del pH en la separación de los tres analitos. El intervalo estudiado fue 11,6 – 12,6, teniendo en cuenta los valores de pK de los analitos ^[28]. Entre pH 11,6 y 11,9 las señales de fructosa y glucosa no se separaban satisfactoriamente. A medida que se aumentó el pH hasta alcanzar un valor de 12,4, se logró una mejor resolución. Por encima de este valor, la línea base y la corriente eran inestables. En consecuencia se eligió el pH 12,4 para todos los análisis posteriores.

En medio básico, tanto los hidratos de carbono como la prolina se encuentran como aniones, y, por lo tanto, migrarán hacia el electrodo positivo, es decir en contra del FEO. Es por ello que, para poder llevar a cabo la separación, es necesario agregar un modificador del FEO para invertir el sentido. En este caso, se empleó un surfactante catiónico, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) con una concentración de 1,5 mM ^[29].

4.5.6.7 Elección del capilar

Se probaron tres capilares de sílice fundida con diferente diámetro interno de 20, 50 y 75 μm . Al emplear el capilar de mayor diámetro, no se consiguió separar los monosacáridos y, por lo tanto, fue descartado. Por otro lado, cuando se trabajó con el capilar de menor tamaño, se obtuvo una menor sensibilidad, es decir menor tamaño de los picos de los tres analitos. Esto se debe a que el paso óptico de la radiación es muy pequeño. Finalmente, los mejores resultados se



obtuvieron al emplear el capilar de 50 μm , ya que fue posible separar los analitos, obteniendo picos bien definidos.

4.5.6.8 Modo de inyección

En base a los trabajos de Rokhas^[30] y col. y Rizelio y col.^[31] se probaron tres inyecciones diferentes, de forma tal de ingresar cantidades similares de muestra al capilar:

1. Inyección electrocinética durante cinco segundos aplicando un voltaje negativo de 10 kV.
2. Inyección hidrodinámica durante tres segundos aplicando una presión de 0,5 psi.
3. Inyección hidrodinámica reversa durante tres segundos aplicando una presión de 0,5 psi

En el caso de la inyección electrocinética, no fue posible lograr la separación de los analitos. La prolina migró al mismo tiempo que algunos fragmentos provenientes de los hidratos de carbono. Al emplear la inyección hidrodinámica aplicando una presión normal, fue posible lograr la separación de los tres analitos en menos de cinco minutos. Con el objetivo de reducir este tiempo, se realizó la inyección en el extremo del capilar más próximo al detector, logrando disminuirlo a la mitad. Sin embargo, al introducir la muestra se observó que no era posible determinar los analitos mediante una única dilución, haciendo que éste modo de inyección no fuera adecuado. Por lo tanto, se seleccionó la inyección hidrodinámica, aplicando una presión de 0,5 psi durante tres segundos.



4.5.6.9 Voltaje aplicado

Para poder llevar a cabo la detección es necesario invertir la polaridad de los electrodos, es por ello que se trabajó con polaridad reversa, de forma tal que el movimiento del flujo electroosmótico fuera en el sentido del detector. Voltajes altos dan lugar a separaciones más rápidas con mayores resoluciones, pero, cuanto mayor es el voltaje aplicado a un capilar, mayor es el efecto Joule (calor generado cuando una corriente eléctrica circula a través de un conductor, como en el caso del capilar lleno de electrolito soporte en electroforesis capilar) y esto podría provocar el ensanchamiento de los picos, por lo que la resolución disminuiría. El intervalo de trabajo analizado fue de 10 a 27 kV. Al aplicar bajos voltajes, de 10 a 20 kV, el tiempo de análisis fue muy elevado y se obtuvieron picos anchos y poco definidos. A medida que se fue aumentando el voltaje hasta alcanzar un valor de 25 kV se logró disminuir el tiempo de análisis y mejorar la resolución de los analitos. Por encima de dicho voltaje no se observaron grandes diferencias y, en consecuencia, las determinaciones se llevaron a cabo aplicando un voltaje de 25 Kv.

4.5.7 Condiciones finales

En la Tabla 4.1 se muestran los parámetros optimizados, el intervalo estudiado y los valores seleccionados. Como puede observarse en la Figura 4.5 el análisis de los tres analitos requiere aproximadamente 5 minutos.



Tabla 4.1. Valores optimizados.

Parámetro	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Concentración de Benzoato de Sodio	10 – 35 mM	10 mM
pH	11,6 – 12,6	12,4
Diámetro interno del capilar	20 – 75 μm	50 μm
Voltaje	10 – 27 V	25 V

La Figura 4.5 muestra un electroferograma de los compuestos en estudio, obtenido bajo las condiciones óptimas.

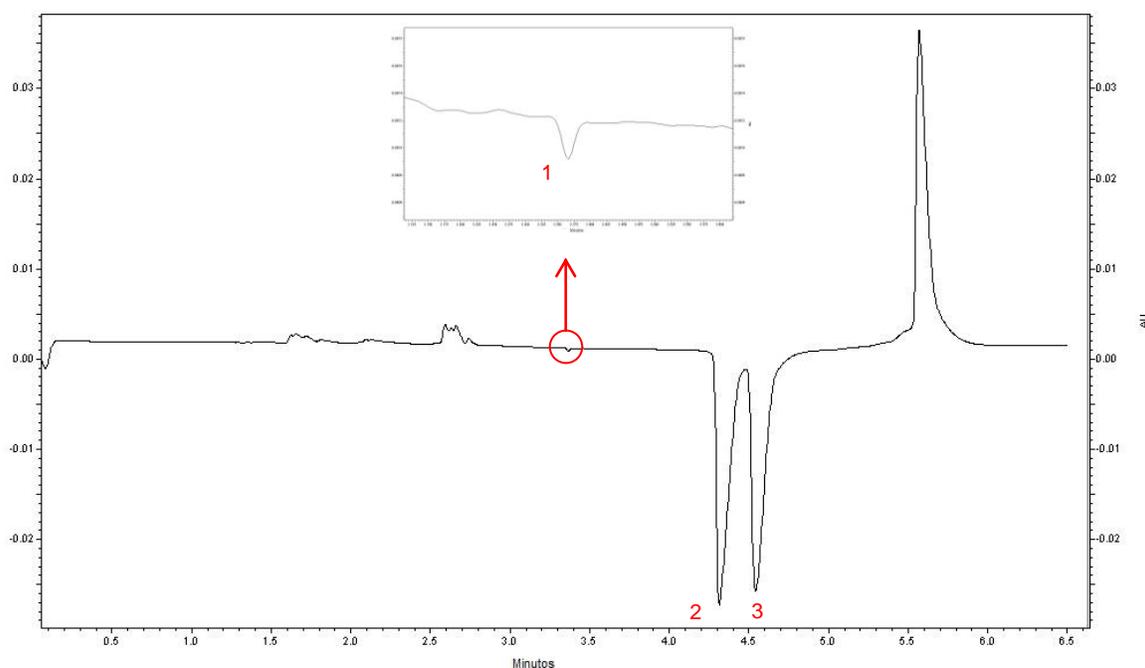


Figura 4.5. Electroferograma de una solución estándar de (1) Prolina (10 mg L^{-1}), (2) Fructosa ($9,005 \text{ g L}^{-1}$) y (3) Glucosa ($9,005 \text{ g L}^{-1}$). Condiciones electroforéticas: detección indirecta 224 nm , -25 kV , inyección por presión normal $0,5 \text{ psi/ 3 s.}$, capilar de 68 cm de longitud (58 cm al detector). Electrolito soporte: 10 mM Benzoato de sodio, $1,5 \text{ mM}$ CTAB, $\text{pH } 12,4$.



4.5.8 Parámetros analíticos

Con las variables optimizadas y fijadas las condiciones experimentales, se procedió a obtener los parámetros analíticos del método propuesto, que se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Parámetros analíticos.

Fructosa	
Intervalo lineal	1,80 – 10,81 g L ⁻¹
Regresión lineal	$y = (2,30 \pm 0,06) \times 10^4 x + (1,1 \pm 0,5) \times 10^4$ $x = [g L^{-1}]$
Límite de detección	0,58 g L ⁻¹
Límite de cuantificación	1,94 g L ⁻¹
Desviación estándar relativa porcentual	3,8 ^a
^a n=8; 1,801 g L ⁻¹	
Glucosa	
Intervalo lineal	1,80 – 10,81 g L ⁻¹
Regresión lineal	$y = (1,90 \pm 0,06) \times 10^4 x + (1,8 \pm 0,5) \times 10^4$ $x = [g L^{-1}]$
Límite de detección	0,67 g L ⁻¹
Límite de cuantificación	2,24 g L ⁻¹
Desviación estándar relativa porcentual	2,9 ^a
^a n=8; 1,801 g L ⁻¹	
Prolina	
Intervalo lineal	2,50 – 25,0 mg L ⁻¹
Regresión lineal	$y = (66,6 \pm 0,8) x - (60 \pm 13)$ $x = [mg L^{-1}]$
Límite de detección	0,72 mg L ⁻¹
Límite de cuantificación	2,41 mg L ⁻¹
Desviación estándar relativa porcentual	4,64 ^a
^a n=8; 20 mg L ⁻¹	



El análisis cuantitativo se llevó a cabo midiendo el área de los picos, la cual es directamente proporcional a la concentración de cada uno de los analitos.

4.5.9 Aplicación a muestras reales

El método propuesto, luego de ser optimizado y evaluado en base a los parámetros antes mencionados, fue aplicado a muestras de miel de Argentina y Suecia para la determinación simultánea de fructosa, glucosa y prolina. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Las concentraciones de los analitos en las muestras analizadas se muestran en la Tabla 4.3 y en la Figura 4.6 se puede observar un electroferograma de una muestra de miel.

Tabla 4.3. Análisis de muestras reales.

Miel	Fructosa $\pm s$ (g/100g miel)	Glucosa $\pm s$ (g/100g miel)	Fructosa + Glucosa (g/100g miel)	Prolina $\pm s$ (mg/Kg miel)
A ^a	41,2 \pm 0,7	34,5 \pm 0,8	75,7	267 \pm 10
B ^a	38,6 \pm 0,7	30,1 \pm 0,8	68,7	211 \pm 9
C ^a	41,4 \pm 0,7	34,2 \pm 0,8	75,6	224 \pm 10
D ^b	43,6 \pm 0,7	32,2 \pm 0,7	75,8	309 \pm 9
E ^b	45,2 \pm 0,8	27,5 \pm 0,8	72,7	573 \pm 9
F ^b	39,7 \pm 0,7	30,6 \pm 0,8	70,3	446 \pm 8

^{a)} Suecia

^{b)} Argentina

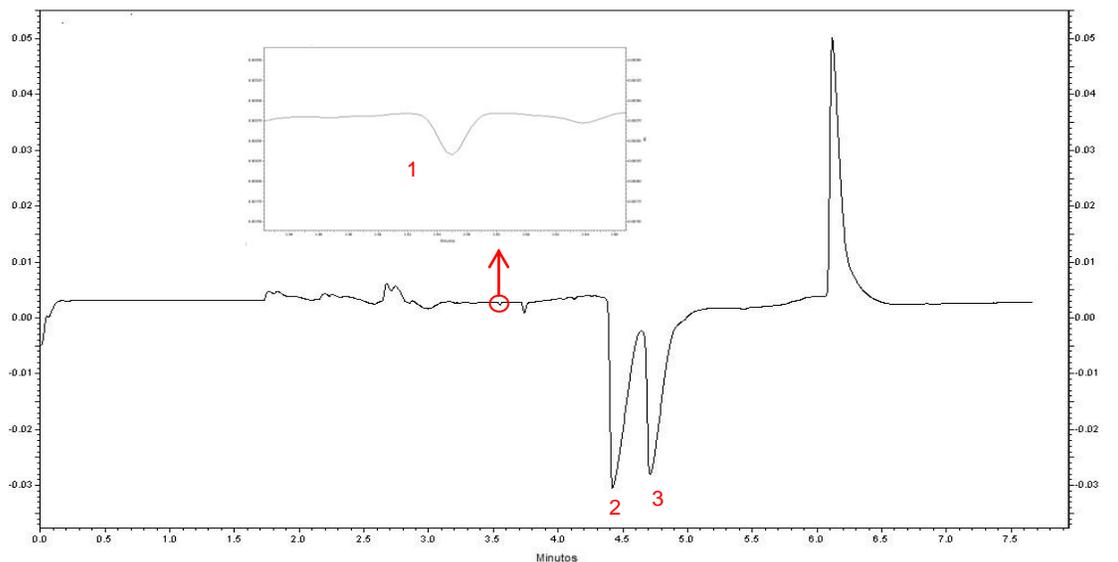


Figura 4.6. Electroferograma de muestra de miel F, donde se pueden observar (1) Prolina, (2) Fructosa y (3) Glucosa.

El análisis cuantitativo de la miel mostró que la fructosa es el azúcar presente en mayor concentración, seguido de la glucosa. Como puede observarse, la cantidad total de azúcares reductores presentes en la miel cumple con lo establecido por el Código Alimentario Argentino (mínimo 65% para mieles de flores) y el Codex Alimentarius (mínimo 60% para mieles de flores).

El contenido de prolina en las muestras también está de acuerdo con lo establecido por el Codex (mínimo de 180 mg/ Kg de miel).

La validación del método se llevó a cabo realizando agregados conocidos de solución estándar que contenía los tres analitos en tres niveles de concentración diferente, a una muestra de miel (muestra F). En la Tabla 4.4 se pueden observar los resultados obtenidos.



Tabla 4.4. Validación del método.

Analito	Adicionado	Concentración encontrada \pm s	% Recuperación
Fructosa (g L ⁻¹)	1,80	1,85 \pm 0,03	103
	3,60	3,59 \pm 0,03	100
	7,20	6,92 \pm 0,21	96
Glucosa (g L ⁻¹)	1,80	1,87 \pm 0,04	104
	3,60	3,66 \pm 0,09	102
	7,20	7,18 \pm 0,02	100
Prolina (mg L ⁻¹)	5,0	4,93 \pm 0,14	99
	10,0	10,23 \pm 0,08	102
	20,0	20,49 \pm 0,08	102

4.6 Conclusiones

En este trabajo se logró la determinación simultánea de fructosa, glucosa, y prolina en muestras de miel empleando Electroforesis Capilar. Las condiciones óptimas se obtuvieron empleando 10 mM de benzoato de sodio y 1,5 mM de CTAB a pH 12,4 como electrolito soporte. Con estas condiciones se obtuvieron líneas de base estables, picos simétricos, buena relación señal/ ruido y óptimas resoluciones.

Los resultados muestran que el método propuesto es simple, requiere tiempos de análisis cortos (aproximadamente 5 min), bajo consumo de reactivos y muestra, mínima generación de residuos y no es necesario llevar a cabo ningún tratamiento previo de la muestra.



Se analizaron muestras de miel provenientes de Argentina y Suecia y los resultados obtenidos muestran que todas cumplen con las exigencias del C.A.A. y Codex Alimentarius.



4.7 Bibliografía

- [1] R.F.A. Moreira, C.A.B. De Maria, M. Pietroluongo, Luiz C. Trugo. Food Chemistry 121 (2010) 697.
- [2] K. Brudzynski, L. Kim. Food Chemistry 126 (2011) 1155.
- [3] L. Frígoli. Consideraciones para la cosecha de miel. PROAPI, INTA.
- [4] M.O. Iurlina, A.I. Saiz, R. Fritz, G.D. Manrique. Food Chemistry 115 (2009) 1141.
- [5] M.F. Silvano, M.S. Varela, M.A. Palacio, S. Ruffinengo, D.K. Yamul. Food Chemistry 152 (2014) 500.
- [6] Código Alimentario Argentino, Capítulo X, Alimentos Azucarados. Actualizado al 9/2010.
- [7] Codex Alimentarius. Norma para la miel. CODEX STAN 12-1981.
- [8] M.C. Zamora, J. Chirife. Food Control 17 (2006) 59.
- [9] E. Venir, M. Spaziani, E. Maltini. Food Chemistry 122 (2010) 410.
- [10] O. Escuredo, I. Dobre, M. Fernández-González, M.C. Seijo. Food Chemistry 149 (2014) 84.
- [11] A. Puscas, A. Hosu, Claudia Cimpoi. Journal of Chromatography A 1272 (2013) 132.
- [12] B. Özbalci, I.H. Boyaci, A. Topcu, C. Kadilar, U. Tamer. Food Chemistry 136 (2013) 1444.
- [13] S. Ouchemoukh, P. Schweitzer, M.B. Bey, H. Djoudad-Kadji, H. Louaileche. Food Chemistry 121 (2010) 561.



- [14] E. de la Fuente, A.I. Ruiz-Matute, R.M. Valencia-Barrera, J. Sanz, I. Martínez Castro. *Food Chemistry* 129 (2011) 1483.
- [15] R. Consonni, L.R. Cagliani, C. Cogliati. *Food Control* 32 (2013) 543.
- [16] O. Anjos, M. Graça Campos, P. Contreras Ruiz, P. Antunes. *Food Chemistry* 169 (2015) 218.
- [17] A. Meda, C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, O.G. Nacoulma. *Food Chemistry* 91 (2005) 571.
- [18] A.L. Ordóñez, M.E. Balanza, A. Chiralt. *Información Tecnológica, Industria Alimentaria* 16 (2005) 11.
- [19] C. Truzzi, A. Annibaldi, S. Illuminati, C. Finale, G. Scarponi. *Food Chemistry* 150 (2014) 477.
- [20] Bogdanov, S. (1999). Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Center, FAM, Liebefeld, CH-3003 Bern, Switzerland.
- [21] A.M. González Paramás, J.A. Gómez Bárez, C. Cordon Marcos, R.J. García-Villanova, J. Sánchez Sánchez. *Food Chemistry* 95 (2006) 148.
- [22] R. Rebane, K. Herodes. *Analytica Chimica Acta* 672 (2010) 79.
- [23] Norma IRAM 15934. Miel. Determinación de azúcares reductores. Método de Fehling-Causse-Bonnans.
- [24] AOAC, Official Method 979.20, Proline in honey.
- [25] T. Soga, G.A. Ross. *Journal of Chromatography A* 767 (1997) 223.
- [26] T. Soga, G.A. Ross. *Journal of Chromatography A* 837 (1999) 231.
- [27] J. Romano, P.Jandik, W.R. Jones, P.E. Jackson. *Journal of Chromatography*, 546 (1991) 411.



- [28] T. Soga, D.N. Heiger. *Analytical Biochemistry* 261 (1998) 73.
- [29] A. Jarméus, A. Emmer. *Chromatographia* 67 (2008) 151.
- [30] M. Kihon Rokhas, S. Mikkonen, J. Beyer, J. Jacksen, A. Emmer. *Electrophoresis* 35 (2014) 450.
- [31] V.M. Rizelio, L.Tenfen, R. da Silveira, L.V. Gonzaga, A.C. Oliveira Costa, R. Fett. *Talanta* 93 (2012) 62.



CAPÍTULO 5

Conclusiones Generales



Conclusiones Generales

En esta Tesis Doctoral se desarrollaron cuatro métodos analíticos que permiten evaluar la calidad de muestras de miel procedentes de la región del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, respondiendo a los objetivos planteados.

1. Desde el punto de vista higiénico-sanitario, se llevó a cabo la determinación de mercurio, contaminante ambiental de interés, en la región de Bahía Blanca. Para ello, se desarrolló un sistema automático Flow-Batch que permite llevar a cabo la digestión de la muestra y la determinación de mercurio por espectroscopia de absorción atómica por vapor frío. De esta forma fue posible reducir el tiempo de digestión de aproximadamente 2 h (método AOAC) a 16 min. El sistema propuesto ha demostrado ser adecuado para la determinación de mercurio en estas muestras.

2. A partir de medidas de color, atributo sensorial de gran importancia en la aceptación de la miel por parte de los consumidores, se desarrollaron dos trabajos empleando imágenes digitales con técnicas de calibración multivariada:

Parte A: se diseñó un sistema Flow-Batch que incluye una cámara web, con el objetivo de lograr, mediante el análisis de imágenes digitales, la clasificación de muestras de miel según su origen geográfico. Para ello, se



empleó SPA-LDA y el modelo de color RGB, lográndose una clasificación media de 97,3% de las muestras analizadas. Este método permite que la muestra pueda ser analizada sin ningún tratamiento previo y es una buena alternativa para ser utilizado en laboratorios de control de calidad y trabajos de campo, para la clasificación de las muestras de miel de acuerdo a su origen geográfico.

Parte B: la aplicación del análisis de imágenes digitales con HSB y PLS, permitió determinar el color de las muestras de miel. Este método no requiere un analista adiestrado o experto para realizar las medidas correspondientes. Por lo tanto, puede ser considerado una alternativa rápida para el control de calidad de este producto de la colmena.

3. Teniendo en cuenta el aspecto nutricional, se desarrolló un método analítico empleando Electroforesis Capilar para la determinación simultánea de fructosa, glucosa y prolina. Empleando éste método se determinaron los analitos de interés sin tratamiento previo de la muestra y en un tiempo aproximado de 5 min. En este trabajo, además de las muestras de Argentina, se analizaron muestras provenientes de Suecia. Los resultados obtenidos muestran que todas cumplen con las exigencias establecidas por el C.A.A. y el Codex Alimentarius.

Los métodos propuestos presentan en general las ventajas de ser simples, requieren tiempos de análisis cortos, bajo consumo de reactivos y mínima generación de residuos.



APÉNDICE I

Productividad de la Tesis



Los resultados derivados de este trabajo de Tesis, así como de estudios relacionados con él, han dado origen a la siguiente productividad:

Publicaciones en Revistas Científicas

- ✓ **“Automatic Flow-Batch system for Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy determination of mercury in honey from Argentina using online sample treatment”.**

Marina A. Domínguez, Marcos Grünhut, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio, María E. Centurión.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (2012) 4812–4817.

- ✓ **“Geographical origin classification of Argentinean honeys using a digital image-based flow-batch system”.**

Marina Alejandra Dominguez, Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, María Susana Di Nezio, Mário César Ugulino de Araújo, María Eugenia Centurión.

Microchemical Journal 112 (2014) 104 – 108.

- ✓ **“Application of digital images to determine color in honey samples from Argentina”.**

Marina A. Dominguez, María E. Centurión.

Microchemical Journal 118 (2015) 110 – 114.



Revistas de divulgación

- ✓ Determinación de mercurio en muestras de miel de la región de Bahía Blanca.

Marina A. Domínguez, Marcos Grunhüt, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio, María E, Centurión.

- * Enero 2013 - Agencia de Noticias Científicas del Instituto Leloir. Noticias de Ciencia, Medicina y Tecnología. Programa de Divulgación Científica y Técnica.

<http://www.agenciacyta.org.ar/2013/01>

- * Enero 2013 – ApiNews.

<http://www.apinews.com/es/noticias/item/20791-argentina-desarrollan-un-nuevo-m%C3%A9todo-para-medir-concentraciones-de-mercurio-en-miel>

- * Marzo 2013 - El otro mate. Innovaciones argentinas.

<http://www.elotromate.com/ciencia/desarrollan-sistema-rapido-para-la-medicion-de-mercurio-en-miel>

- * Marzo 2013 - Beatriz Achával Noticias apícolas y otras yerbas.

<http://beatrizachaval.blogspot.com.ar/2013/03/argentina-desarrollan-sistema-rapido.html>

- * Abril 2013 - Todo Agro.

<http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=23948>

- * Mayo 2013 - Radio Universidad AM 1240, Universidad Nacional del Sur.

Nota periodística, Bahía Blanca.

- * Junio 2013 – Boletín electrónico, CONICET - Bahía Blanca.

http://www.bahia blanca-conicet.gob.ar/boletin/index.php?option=com_content&view=article&id=3117:deteccion-rapida-de-contenido-de-mercurio-en-mieles&catid=188:articulos&Itemid=1623

- * Octubre 2013 – Argentina Investiga, divulgación y noticias universitarias.

http://infouniversidades.siu.edu.ar/noticia.php?titulo=nuevo_metodo_para_detectar_mercurio_en_la_miel&id=1927



Presentaciones en Reuniones Científicas

- ✓ **“Sistemas automáticos para la determinación de mercurio en muestras de miel de la región de Bahía Blanca”.**

Dominguez, M.A., Di Nezio M.S., Centurión M.E.

VI Congreso Argentino de Química Analítica.

Santa Fe, Argentina, 26 al 29 de Septiembre de 2011.

- ✓ **“Clasificación de mieles de Argentina empleando un sistema Flow-Batch con cámara web”.**

Dominguez, M.A., Diniz, G.D.P.H., Lima, M.B., Araújo, M.C.U., Centurión M.E.

5° Congreso Iberoamericano de Química Analítica-2° Congreso Uruguayo de Química Analítica.

Montevideo, Uruguay, 7 al 10 de Octubre de 2012.

- ✓ **“Determinación de color en mieles de Argentina empleando espectroscopía Vis-NIR y calibración multivariada”.**

Dominguez, M.A., Diniz, G.D.P.H., Sanchez, F.A.C., dos Santos M.B.H., de Madeiros E.P., Araújo, M.C.U., Centurión M.E. .

5° Congreso Iberoamericano de Química Analítica-2° Congreso Uruguayo de Química Analítica.

Montevideo, Uruguay, 7 al 10 de Octubre de 2012.



- ✓ **“Determinación de color en mieles de Argentina empleando imágenes digitales y calibración multivariada”.**

Dominguez, M.A., Centurión, M.E.

VII Congreso Argentino de Química Analítica.

Mendoza, Argentina, 1 al 4 de Octubre de 2013.

- ✓ **“Análisis de imágenes digitales para el análisis de color en muestras de miel”.**

Dominguez, M.A., Diniz, P.H., Araújo, M.C.U., Pistonesi M.F., Di Nezio M.S., Centurion M.E.

II Jornada de Intercambio de Becarios y Tesistas del CONICET Bahía Blanca

“Salud y Alimentación”.

Bahía Blanca, Argentina, 25 de Agosto de 2014.

- ✓ **“Sistema automático para la determinación de mercurio en muestras de miel de la región de Bahía Blanca”.**

Dominguez, M.A., Grünhut, M., Pistonesi, M.F., Di Nezio, M.S, Centurión, M.E.

II Jornada de Intercambio de Becarios y Tesistas del CONICET Bahía Blanca

“Salud y Alimentación”.

Bahía Blanca, Argentina, 25 de Agosto de 2014.



APÉNDICE II

Becas obtenidas



Becas obtenidas

✓ Beca interna de postgrado tipo I - CONICET

Lugar de trabajo: INQUISUR (Instituto de Química del Sur), Universidad Nacional del Sur. Resolución N°219.

Tema: Desarrollo de métodos automáticos para el análisis de compuestos de interés en la industria apícola.

Director: Dra. Maria E. Centurión.

Período: 1 de Abril de 2010 al 1 de Abril de 2013.

✓ Beca interna de postgrado tipo II - CONICET

Lugar de trabajo: INQUISUR (Instituto de Química del Sur), Universidad Nacional del Sur. Resolución N° 4072.

Tema: Desarrollo de métodos automáticos para el análisis de compuestos de interés en la industria apícola.

Director: Dra. Maria E. Centurión.

Período: 1 de Abril de 2013 al 1 de Abril de 2015.

✓ Beca EuroTANGO II - Programa Erasmus Mundus Action2-Strand 1

Estancia de movilidad de seis meses (doctorado sandwich), en la KTH, Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suecia.

Tema: Desarrollo de métodos para la determinación de monosacáridos y amino ácidos en miel empleando Electroforesis Capilar.

Director: Prof Asa Emmer.

Período: 3 de Junio de 2013 al 30 de Noviembre de 2013.