

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE FILTRADO,
EN LA ELEVACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL EN MIEL.**



Informe de tesis

Presentado por

Edwin Adalberto Muñoz Espinoza

Para optar el título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, noviembre de 1994.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

TESIS Y ACTO QUE DEDICO

A: MI MADRE

ÍNDICE

	Pag.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Generalidades	5
3.2 Estudios Realizados	7
3.3 Normas de Calidad	11
3.4 Prohibiciones Específicas	12
4. JUSTIFICACIÓN	13
5. OBJETIVOS	14
6. HIPÓTESIS	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1 Universo de trabajo	16
7.2 Medios	16
7.3 Procedimiento	18
7.4 Diseño Experimental	21
8. RESULTADOS	22
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	25
10. CONCLUSIONES	28
11. RECOMENDACIONES	30
12. REFERENCIAS	31
13. ANEXOS	35

1. RESUMEN

Los países importadores de miel, exigen para la misma, estrictas normas de calidad establecidas por la Comisión del Codex Alimentarius, la cual establece dentro de sus prohibiciones específicas para la miel; que esta no deberá calentarse hasta el grado que se inactiven sus componentes naturales, además no deberá contener más de 40 mg de Hidroximetilfurfural (HMF)/ Kg de miel.

Por lo anterior, el presente trabajo se realizó con el objeto de determinar el efecto del calentamiento sobre el contenido de HMF. Se analizaron 6 muestras de miel provenientes de 3 apiarios de la zona occidental de Guatemala y se cuantificó el contenido de HMF, antes y después del procesamiento de la miel en el apiario.

Para las mediciones se utilizó el método de la AOAC para la cuantificación de HMF en miel.

Los resultados obtenidos demostraron que las variables temperatura y tiempo, empleados por el apicultor en el procesamiento del producto; son la causa del alto contenido de HMF en la miel post procesada, aumentando un promedio de 12.5 veces el contenido inicial.

En el laboratorio, la miel no procesada en el apiario, se calentó a 3 temperaturas diferentes (45°C, 55°C y 65°C), y en cada una de las anteriores, por 3 tiempos diferentes (30 min, 60 min y 90 min), con el objeto de establecer el tiempo y la

temperatura más adecuados para el procesamiento. Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos, se llegó a la conclusión de que existe diferencia significativa entre los factores tiempo y temperatura ($p= 0.0001$).

Se estableció que el calentamiento de la miel entre 45°C y 50°C , por un tiempo de 30 min, son los más adecuados para el procesamiento; considerados para un contenido promedio inicial de 12.41 mg de HMF/Kg de miel.

2. INTRODUCCIÓN.

La miel ha sido ampliamente utilizada en todo el mundo, debido a los beneficios que presenta a la nutrición y salud humanas, ya que posee un alto valor energético y propiedades curativas. También es muy utilizada en la industria de cosméticos y confitería; siendo en ésta última muy apreciada, pues proporciona un gusto y sabor únicos; estimándose la demanda para consumo industrial en el año de 1,993, de 12,000 quintales; con un crecimiento anual del 1.2% (1, 2).

La producción mundial supera las 700,000 toneladas, de las cuales el 40% provienen del Continente Americano (2, 3).

En Guatemala, existe un gran número de pequeños productores, quienes venden su miel a las empresas comercializadoras a nivel nacional e internacional (2).

La gran mayoría de estos productores domésticos, calientan su producto para su posterior filtrado y envasado; proceso durante el cual, la temperatura y el tiempo de exposición al calor, no están controlados en forma alguna (2).

Cuando las temperaturas aplicadas son demasiado elevadas, la concentración de Hidroximetilfurfural (HMF) aumenta, ya que ello da lugar a que los azúcares contenidos en la miel, especialmente los de la fructuosa, se transformen por deshidratación en HMF; sobrepasando los niveles aceptables por los países importadores, los cuales observan estrictamente los estándares de calidad establecidos por La Comisión del Codex

Alimentarius; la cual establece un límite máximo de HMF de 40 mg/Kg de miel (2 - 4).

En el presente trabajo se determinó el efecto del calentamiento de la miel a diferentes temperaturas y tiempos, sobre el contenido de HMF; para lo cual se analizaron por triplicado muestras de miel provenientes de 3 apiarios de la zona occidental de Guatemala.

Este estudio contribuye a mejorar las técnicas del procesado de la miel, tomando en cuenta que las implicaciones de los estándares de calidad, son de gran importancia para la comercialización externa del producto, con el consiguiente beneficio y prestigio, o la marginación de los productos nacionales.

3. ANTECEDENTES.

3.1 GENERALIDADES

La miel se define como un fluido dulce, denso, transparente y viscoso; resultante de la acción enzimática sobre el néctar de las flores y exudados de las partes vivas de las plantas, por parte de las abejas de la especie *Apis mellifera*, las cuales los recogen, modifican y almacenan en los panales para servir de alimento a las crías jóvenes (1, 3, 4, 5, 6).

Este alimento natural, rico en calorías (valor energético= 3,100 Kcal/Kg), se compone predominantemente de glucosa y fructuosa. La composición química de la miel, según los requerimientos de la comisión de Codex Alimentarius de la F.A.O./W.H.O., y de las normas Centroamericanas para la calidad de la miel, del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industriales (ICAITI), es la siguiente:

Humedad \leq 21%; sucrosa \leq 5%; azúcares reductores \geq 65%; acidez \leq 40 meq/Kg; acidez total \leq 4 ml, de NaOH 1 N/100 gr; índice diastásico \geq 8; dextrinas \leq 5%; cenizas \leq 0.5%; sólidos insolubles \leq 0.1%; hidroximetilfurfural \leq 40 mg/Kg; y un pH de 3.91 (7, 8).

También están presentes algunos componentes menores como: enzimas (diastasa, invertasa y glucosa-oxidasa), vitaminas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos (cítrico, málico, glocónico, fórmico, acético y butírico), polen, levaduras y otras partículas sólidas resultantes del proceso de extracción de la miel (6 - 10).

El color de la miel, así como el sabor y aroma, pueden variar grandemente; el primero va desde casi incoloro, pasando por amarillo, amarillo verdoso, oro, ámbar, rojizo, y aún cerca del negro. Dichas variaciones, generalmente son debidas a su procedencia botánica (3, 5, 6, 11).

En Guatemala, los apicultores recolectan y envasan su miel; siendo la zona de mayor producción el Departamento de El Petén, siguiéndole la franja transversal del norte, occidente, meseta central y la costa sur (2, 12).

La miel es extraída de los panales por el apicultor, utilizando para ello, la fuerza centrífuga de un extractor mecánico (1, 2, 11).

Posteriormente, los contaminantes como cera, polen, restos de abeja, cristales, larvas, etc., son eliminados en el proceso de filtración, utilizando para tal efecto un filtro de algodón y/o gasa (1, 2, 5, 11).

Previamente al filtrado, la miel se calienta para los siguientes propósitos: disminuir la viscosidad, y así agilizar su paso a través del filtro; prevenir la granulación después de envasada; y por último, destruir las levaduras, que pudieran provocar un ulterior proceso de fermentación, con formación de CO₂, alcohol, y un fuerte aumento en la acidez (1, 3, 5, 11).

La miel es muy sensible a las altas temperaturas, porque pierde rápidamente sus propiedades organolépticas y desarrolla un color más oscuro. Un control de la temperatura de filtración es un parámetro clave para obtener una miel de buena calidad (11).

Se recomienda realizar la filtración, a una temperatura entre 50 °C y 60 °C, durante el menor tiempo posible, para evitar que la miel pierda su color y sabor característicos (1, 11, 13).

Sí bien es cierto, que el calentamiento evita la granulación de la miel posterior a envasarla, el calentarla a temperaturas variables y/o demasiado elevadas, provocará una granulación temprana; y por lo tanto necesitará de un recalentamiento mayor, deteriorando aún más sus cualidades (1, 5, 11).

3.2 ESTUDIOS REALIZADOS

En 1977. Langridge realizó un estudio sobre los factores de la calidad en mieles Australianas, analizando 87 muestras producidas por 34 apicultores; determinándoseles su actividad de diastasa e invertasa, y su contenido de HMF. Las mieles fueron calentadas a 45 °C, por 16 horas, produciéndose una clara disminución en las actividades de sus enzimas, hasta en un 65%; el contenido de HMF aumentó 75 veces durante el proceso de calentamiento; en comparación con los resultados obtenidos del análisis de mieles comerciales de la República Alemana, cuyos niveles fueron relativamente bajos (14).

Estudios realizados por Marletto y colaboradores en 1978, señalan que cuando las mieles sobrepasan el límite máximo permitido de HMF, éste indica que el producto ha permanecido demasiado tiempo almacenado, o que ha soportado un tratamiento térmico demasiado brusco (3).

En 1978, Jackson y Burns evaluaron la calidad de la miel cristalizada, después de ser licuada por sobrecalentamiento, produciéndose una marcada disminución en la frescura y sabor, y además triplicándose el contenido de HMF con respecto al inicial (15).

Doner y White en 1978, recolectaron 480 muestras de miel certificadas como genuinas por sus productores; a las cuales se les determinó su contenido de HMF antes y después del procesamiento; estableciendo que la causa primaria del alto contenido de HMF en el 60% de las muestras, se debe al procesamiento térmico aplicado; el porcentaje restante contenía niveles mucho más elevados, debido a adulteración con azúcar invertido (16).

Entre 1978 y 1982, La Comunidad Económica Europea y la Comisión para la Legislación de Alimentos en Italia, efectuaron un estudio, analizando 60 muestras de miel para determinar sus características fisicoquímicas y microbiológicas, así como para el contenido de Hidroximetilfurfural (HMF). El 31% de las mieles, no llenaron de conformidad las especificaciones fisicoquímicas requeridas; hallándose un exceso de acidez (mayor de 40 meq/Kg), agua (mayor de 21%), y de HMF (mayor de 40 mg/Kg); recomendando mejorar los procedimientos de obtención del producto (17).

En Filadelfia, en el año de 1980, Siciliano y White obtuvieron los datos del procesamiento de miel de 31 productores a gran escala, algunos de ellos calentaban la miel a 66°C o más,

por varias horas; otros lo hacían entre 50°C y 60°C, hasta por 10 horas. Los resultados de HMF obtenidos y comparados con las determinaciones hechas en miel virgen, revelaron concentraciones demasiado elevadas de HMF, hasta de 200 mg/Kg de miel, cuando ésta es sometida a dicho proceso. Los valores comparativos permanecieron entre 10 y 20 mg/Kg; concluyendo, que la determinación del contenido de HMF es informativo, pero no conclusivo de adulteración con azúcar invertido, ya que si éste último está presente, los valores de HMF alcanzan y sobrepasan una concentración de 200 mg/Kg debidos al abuso en la aplicación de calor, con la consecuencia de pérdida del sabor y aroma del producto (18).

En 1980, White planteó la necesidad de cuantificar directamente el contenido de HMF y realizar simultáneamente un análisis de los carbohidratos constituyentes de la miel, por medio de la utilización de métodos más específicos, para poder así, diferenciar entre una miel genuina y una adulterada o sobrecalentada (19).

En 1981, Strang estableció que el agregar azúcar invertido, aún en cantidades del 3% o menos, se incrementa considerablemente el contenido de HMF. Sin embargo, determinó que la clasificación de una miel como adulterada con azúcar invertido, debe hacerse cuidadosamente, ya que el calentamiento también incrementa la cantidad de HMF en la miel; señalando que cuando se somete la miel durante 4 horas a una temperatura de 80°C se obtienen valores de HMF equivalentes al incremento

obtenido, cuando se agrega 3% de azúcar invertido (20).

En 1984, Dhar y Roy propusieron un método para la cuantificación de HMF, utilizando para ello cromatografía en columna de adsorción. El método es bastante útil cuando se desea verificar sobrecalentamiento, ya que a diferencia del método colorimétrico, en donde la fructuosa tiende a interferir formando cromógenos, elevando falsamente la concentración de HMF; en el método propuesto, la fructuosa eluye de la columna juntamente con la sucrosa, logrando así resultados más confiables en cuanto a la cantidad de HMF debida al calor aplicado en forma excesiva (21).

En 1984, White determinó adulteración de miel por medio del análisis específico de sus carbohidratos constitutivos, anotando que la cuantificación de HMF como indicador de adulteración, resulta ser un tanto ambiguo porque sólo resulta útil para establecer el sobrecalentamiento de la miel, especialmente cuando los valores de HMF se encuentran entre 100 y 200 mg/Kg de miel. Si son mayores de 200 mg/Kg una adulteración podría estar implicada, lo cual se aclararía por el análisis de la distribución del contenido de carbohidratos, utilizando métodos enzimáticos y polarimétricos (22).

En 1991, Estrada en un estudio realizado en mieles comerciales de Guatemala, determinó que el 40% de tales mieles, no llenaban las especificaciones de la Comisión del Codex Alimentarius, en cuanto a concentración de HMF se refiere; señalando que el alto contenido del mismo, pudo deberse a

adulteración con azúcar invertido, o a un sobrecalentamiento durante su procesamiento. Recomienda realizar un estudio conjunto con los apicultores, para determinar las causas reales de la elevada concentración de HMF en el producto (23).

3.3 NORMAS DE CALIDAD.

Con el propósito de identificar las normas de calidad que requieren los principales países importadores, se toman como base las que exigen los Estados Unidos de América, y los que integran la Comunidad Económica Europea (4).

Las normas de calidad, establecidas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), que se consideran para efectos de clasificación son: el sabor, ausencia de defectos, y claridad (4). (VER ANEXO I.a y I.b).

La Comunidad Económica Europea (CEE), exige para el producto ciertas características de composición: contenido aparente en azúcares reductores, expresado en azúcares invertidos; contenido de azúcar; contenido aparente en sacarosa; contenido de materias insolubles en agua; contenido en cenizas; contenido en ácidos libres; el índice diastásico y contenido en hidroximetilfurfural (HMF) determinados después de tratamiento y mezcla (4). (VER ANEXO I.c).

3.4 PROHIBICIONES ESPECIFICAS ESTABLECIDAS POR LA COMISION DEL
CODEX ALIMENTARIUS.

3.4.1 La miel no deberá tener ningún sabor, aroma o color desagradable, absorbidos de materias extrañas durante la elaboración y el almacenamiento (4, 7).

3.4.2 La miel no deberá haber comenzado a fermentar ni ser efervescente (4, 7).

3.4.3 La miel no deberá calentarse hasta el grado en que se inactiven, totalmente o en gran parte, la enzimas naturales que contiene (4, 7).

3.4.4 La acidez de la miel no deberá cambiarse artificialmente (4, 7).

4. JUSTIFICACIÓN.

Siendo la miel un producto que posee una gran demanda a nivel internacional, se considera de importancia realizar un estudio que permita determinar las condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento adecuados en su procesamiento; para minimizar la concentración de Hidroximetilfurfural (HMF) de la misma, ya que en determinado momento, esto ha sido un impedimento para que el producto sea aceptado en el mercado extranjero; ya que durante el proceso de su obtención, no se establecen los criterios de calidad específicos, como bien deberían darse. Lo anterior está fundamentado en un análisis organoléptico que incluye color, olor y presentación (libre de impurezas), ya que la comercialización para el mercado interno, no está sujeta a norma de calidad alguna.

La presente investigación, pretende detectar anomalías en las técnicas del procesado de la miel en algunos apiarios de la zona occidental, siendo esta, una de las más productivas de nuestro país. Los resultados que se obtengan, podrán ser utilizados como referencia para el establecimiento de los procedimientos adecuados durante el tratamiento del producto.

5. OBJETIVOS.

5.1 Establecer el efecto que tiene el tiempo de calentamiento y la temperatura de filtrado de la miel, sobre el contenido de Hidroximetilfurfural presente en la miel de la zona occidental de Guatemala.

5.2 Establecer las condiciones de tiempo y temperatura adecuados en la filtración de la miel, para poder obtener un producto de calidad competitiva a nivel local e internacional.

6. HIPÓTESIS.

La temperatura de filtrado y el tiempo de calentamiento aplicados a la miel de la zona occidental de Guatemala, producen aumento en la concentración de HMF a niveles no aceptables por las normas de calidad respectivas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Estuvo constituido por 6 muestras de miel, pre y post procesadas; provenientes de apiarios de las cabeceras Departamentales de Quetzaltenango y San Marcos.

7.2 MEDIOS

7.2.1 Recursos humanos:

- Edwin Muñoz E., investigador.
- Lic. Carlos Klee M., asesor.
- Licda. Karin Herrera, coasesor.

7.2.2 Recursos físicos:

- Biblioteca de la Universidad de San Carlos de Guatemala,
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- Biblioteca del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).
- Biblioteca del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industriales (ICAITI).
- Biblioteca del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA).
- Biblioteca de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

- Laboratorios de Departamento de Fisicoquímica de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

7.2.3 Recursos materiales:

- Espectrofotómetro ultra violeta de doble haz, marca Behring.
- Celdas de cuarzo de 1 cm de espesor.
- Balanza analítica con precisión de 0.0001 gr.
- Matraces volumétricos de 50 y 100 ml.
- Pipetas volumétricas.
- Termómetro.
- Cronómetro.
- Baño de agua de temperatura constante.
- Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.
- Beakers de 50 ml.
- Probetas graduadas.

7.2.4 Reactivos:

- Acido barbitúrico para análisis.
- p-Toluidina para análisis.
- Isopropanol para análisis.
- Acido acético glacial para análisis.
- Nitrógeno gaseoso.

7.3 PROCEDIMIENTO

7.3.1 Muestreo:

El muestreo se realizó por conveniencia, recolectándose una muestra pre y otra post calentadas, en tres apiarios de las cabeceras Departamentales de Quetzaltenango y San Marcos; anotando tiempo y temperatura empleados durante el proceso. Esto hizo un total de 6 muestras de miel recolectadas.

7.3.2 Preparación de reactivos:

7.3.2.1 Solución de ácido barbitúrico:

Pesar 500 mg de ácido barbitúrico en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada libre de oxígeno (4, 24, 25).

7.3.2.2 Solución de p-toluidina:

Pesar 10.0000 gr de p-toluidina y disolver en unos 50 ml de isopropanol, calentando suavemente en baño de agua. Trasvasar a un matraz volumétrico de 100 ml, lavando con isopropanol y añadir 10 ml de ácido acético glacial. Enfriar y completar a volumen con isopropanol. Conservar la solución en lugar oscuro y no utilizarla hasta que por lo menos hayan transcurrido 24 horas (4, 24, 25).

7.3.2.3 Agua destilada libre de oxígeno:

Hacer pasar nitrógeno gaseoso a través de agua destilada en ebullición. Después enfriar el agua (4, 24, 25).

7.3.3 Procesamiento de la muestra en el laboratorio:

Se efectuó la determinación cuantitativa de HMF en las muestras de miel pre y post calentadas por el apicultor, para fines de comparación.

Posteriormente, las muestras de miel que no sufrieron tratamiento calórico en el apiario, se calentaron a 45°C, 55°C, y 65°C, en baño de agua; y en cada una de las temperaturas señaladas, por un tiempo de 30 min, 60 min, y 90 min. Luego se filtraron, utilizando un filtro de gasa, para después efectuar las mediciones cuantitativas (espectrofotométricas) de HMF. Todo el proceso se realizó por triplicado, para minimizar las variaciones internas durante el manipuleo; dando un total de 87 determinaciones de HMF.

7.3.4 Determinación cuantitativa de Hidroximetilfurfural en miel, pre y post calentada a diferentes temperaturas y tiempos:

7.3.4.1 Preparación de la muestra:

Pesar 10.0000 gr de miel y disolver sin calentar, en 20 ml de agua destilada libre de oxígeno. Trasvasar esta solución a un matraz volumétrico de 50 ml, y completar a volumen con agua destilada libre de oxígeno (solución de miel). La determinación de HMF deberá hacerse inmediatamente después de preparada la muestra (4, 24, 26).

7.3.4.2 Determinaciones espectrofotométricas:

Con una pipeta volumétrica, verter 2 ml de la solución de miel en cada uno de dos tubos de ensayo, y añadir a cada uno, 5 ml de solución de p-toluidina. Luego agregar a uno de los tubos, 1 ml de agua destilada libre de oxígeno, que servirá como testigo; y en el otro tubo, 1 ml de la solución de ácido barbitúrico; y agitar ambas mezclas. La adición de los reactivos debe hacerse ininterrumpidamente y terminarse en uno o dos minutos (4, 24, 26).

Inmediatamente después de haber alcanzado el valor máximo (unos 4 minutos después de haber agregado el ácido barbitúrico), leer la absorbancia de la muestra contra el testigo, a una longitud de 550 nm empleando una celda de cuarzo de 1 cm de espesor (4, 24, 26).

7.3.4.3 Cálculos y expresión de resultados:

$$\text{mg/100 gr de miel} = \frac{\text{Absorbancia} \times 19.2}{\text{Espesor de la capa}}$$

Los resultados se expresan en mg de HMF/Kg de miel (4, 26).

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las unidades experimentales del presente trabajo, estuvieron constituidas por las muestras de miel producidas en tres apiarios de las cabeceras Departamentales de Quetzaltenango y San Marcos, escogidos por conveniencia. A cada una de las muestras se les realizó mediciones cuantitativas de HMF, antes y después de aplicarles tratamiento calórico a diferentes temperaturas y tiempos. Cada determinación se realizó por triplicado, dando un total de 87 determinaciones.

El diseño fue:

Factorial de 3 X 3 con bloques, en donde los factores fueron: Tiempos (3 niveles: 30 min, 60 min, y 90 min) y Temperatura (3 niveles: 45°C, 55°C, y 65°C); y los bloques, los apiarios; utilizando 3 replicas por tratamiento.

Se usaron las siguientes pruebas para el análisis de datos:

- Análisis de varianza de Factorial con bloques.
- Diagramas de interacción.
- Comparaciones múltiples por el método de Fisher de La Mínima Diferencia Significativa (LSD).

8. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos del análisis de la miel para su contenido de HMF, fueron los siguientes:

Tabla No. 1

Contenido de HMF antes y después de procesada la miel por el apicultor.

	Apiario 1	Apiario 2	Apiario 3
Antes	9.89	12.34	15.03
Después	107.21	150.17	201.34

Los resultados están expresados en mg de HMF/Kg de miel, siendo un promedio de 3 determinaciones. Estos datos no se sometieron a prueba estadística que estableciera probables diferencias, ya que el análisis es descriptivo.

El tiempo de calentamiento es en promedio de 120 minutos. La temperatura que se alcanza en el apiario 1 es de 72.7°C, en el 2 de 78.1°C y en el 3 de 88.4°C; dando un promedio de 80°C.

Tabla No. 2

Contenido de HMF después de procesada la miel a diferentes temperaturas y tiempos en el laboratorio.

Temperatura	45°C			55°C			65°C		
	Tiempo	30'	60'	90'	30'	60'	90'	30'	60'
Apiario	9.9	18.3	40.5	42.3	41.1	51.1	54.7	64.1	80.1
1	11.3	19.8	41.5	42.9	44.2	54.7	55.1	67.6	81.2
* (9.89)	11.5	21.3	43.2	43.0	46.3	59.0	60.1	67.9	84.5
Apiario	17.3	21.9	39.6	37.9	50.2	59.9	63.2	79.8	99.9
2	19.1	24.0	40.0	43.1	51.8	63.2	63.9	80.0	100.5
* (12.34)	19.2	24.1	40.9	43.2	54.1	63.9	64.0	83.3	105.0
Apiario	19.1	31.2	41.9	51.7	60.0	69.3	71.2	81.9	113.0
3	20.4	33.1	47.8	57.8	63.6	70.2	72.2	83.9	117.1
* (15.03)	20.6	33.2	49.4	58.1	65.3	71.1	74.1	84.0	117.7

* Contenido inicial de HMF.

Los resultados están expresados en mg de HMF/Kg de miel, realizando un total de 81 determinaciones.

Se realizó Análisis de Varianza de Factorial con Bloques a los datos de la tabla anterior. La tabla de ANDEVA se detalla en el anexo II.a.

Se utilizó la prueba de Fisher de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), para el análisis de los datos de la tabla del anexo II.b; con el objeto de comparar entre sí la

temperatura, tiempo y apiarios.

Por último se evaluó la interacción entre la temperatura y el tiempo de calentamiento de la miel y la relación con el contenido de HMF; calculando el promedio de éste por temperatura y tiempo. A partir de estos datos, se construyó una gráfica para determinar la temperatura y tiempo más adecuados para el procesamiento de la miel. (Ver anexo II.c).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Las determinaciones de HMF, realizadas en la miel antes y después de ser procesada por el apicultor, demostraron que las condiciones en que se realiza tal procesamiento, son inadecuadas. El tiempo empleado es simplemente el que se tarda en filtrar y envasar determinada cantidad de miel; la temperatura que se alcanza es muy elevada, ya que es lógico suponer que la temperatura aumenta cuanto más se exponga al calor.

Es debido a lo anterior a que todas las mieles analizadas antes de ser procesadas en el apiario, presentaban un contenido de HMF mucho menor que el límite máximo permitido por las Normas de Calidad, que es de 40 mg de HMF/Kg de miel (Ver anexo I.c). Después del tratamiento con calor (temperatura y tiempo no controlados), la cantidad de HMF se aumentó un promedio de 12.5 veces respecto al contenido inicial, sobrepasando el límite máximo antes mencionado (Tabla No. 1).

Para las determinaciones de HMF realizadas en el laboratorio, se utilizó miel virgen (sin procesamiento alguno). La variación es evidente (Tabla No. 2), y la relación entre la temperatura y el tiempo es directamente proporcional al contenido de HMF presente.

El análisis de varianza (ver anexo II.a), demostró que existe diferencia estadísticamente significativa en la temperatura ($p= 0.0001$), el tiempo ($p= 0.0001$) y temperatura-tiempo ($p= 0.0097$); por lo que la influencia que

ejercen estos dos factores, es la causa primordial de la elevación del HMF durante el procesamiento del producto.

También se encontró diferencia significativa entre los apiarios ($p= 0.0001$), ya que no todos cuentan con la misma tecnología para el procesado de la miel; existiendo variaciones marcadas en el tiempo y la temperatura, lo que hace que estos factores sean determinantes para elevar el contenido de HMF en la miel de la misma zona geográfica.

Con la prueba de LSD de Fisher, utilizada para realizar las comparaciones individuales entre los promedios de temperatura, tiempo y apiarios; se estableció que, al igual que con el ANDEVA, existen diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p<0.05$), comprobando de nuevo la influencia de los factores tiempo y temperatura sobre la elevación de HMF en la miel.

En la gráfica (ver anexo II.c), se observa que existe influencia recíproca entre la temperatura y el tiempo de calentamiento; ya que un cambio en uno o ambos factores, produce un cambio en el contenido de HMF. Sin embargo, la interacción de los factores no se ve reflejada en la gráfica; debido a que la relación de dichos factores con el contenido de HMF, es directamente proporcional, exhibiendo un comportamiento lineal.

Analizando la gráfica, se pudo determinar que el máximo tiempo de calentamiento que se podría aplicar (para alcanzar una cantidad no mayor a 40 mg de HMF/Kg de miel), es de 60 minutos, siempre y cuando no se rebasen los 50°C; mientras que la temperatura máxima podría ser de 52°C, si no se calienta por más

de 30 minutos. El calentamiento por 90 minutos o más, a cualquier temperatura; produce que el contenido de HMF supere el límite establecido por las Normas de Calidad.

Es importante indicar, que lo anterior es válido para un contenido promedio inicial de 12.41 mg de HMF/Kg de miel; ya que de acuerdo a la cantidad que se tenga inicialmente, se podrá variar la temperatura y el tiempo aplicados durante el procesamiento.

10. CONCLUSIONES.

10.1 La temperatura y el tiempo no controlados en el procesamiento de la miel, son la causa principal de la elevación del HMF hasta niveles fuera de los establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius.

10.2 La temperatura y el tiempo de calentamiento empleados por el apicultor en la filtración de la miel, producen aumento en el nivel de HMF, hasta en 12.5 veces el contenido inicial.

10.3 El contenido de HMF, es directamente proporcional a la temperatura y el tiempo de calentamiento de la miel.

10.4 Al comparar las variaciones de tiempo y temperatura sobre el contenido de HMF, se estableció que existe diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.0001$).

10.5 Existe una influencia recíproca entre la temperatura y el tiempo de calentamiento, sobre el contenido de HMF en la miel.

10.6 En general, aplicando temperaturas entre 45°C y 50°C, por un tiempo de 30 minutos y un contenido promedio inicial de 12.41 mg de HMF/Kg de miel; se evitaría que se sobrepasen los 40 mg/Kg, establecidos como límite máximo.

10.7 La cantidad de miel a envasar y el contenido de HMF inicial, son dos aspectos importantes a considerar, para establecer la temperatura y el tiempo de calentamiento más adecuados para el procesamiento de la miel.

11. RECOMENDACIONES.

11.1 Calentar pocas cantidades de miel a la vez, para evitar así exponerla a temperaturas elevadas y por períodos de tiempo prolongados, durante el filtrado y envasado.

11.2 Analizar periódicamente la miel para su contenido de HMF inicial, antes de ser procesada en el apiario; para luego poder determinar la temperatura y el tiempo más adecuados, teniendo en cuenta que el calentamiento a 80°C por 120 minutos, aumenta en promedio 12.5 veces el contenido inicial de HMF presente en la miel.

11.3 Analizar muestras de miel de diferentes zonas geográficas, estableciendo su contenido de HMF a diferentes temperaturas y tiempos; para efectos de comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio.

11.4 Realizar estudios similares, analizando muestras de miel que contengan cantidades similares de HMF antes de ser procesadas; y en donde los apicultores procesen su producto de igual forma.

12. REFERENCIAS.

1. Root AI. The ABC AND XYZ of Bee Culture. Ohio: A.I. Root Company, 1978. 390 p. (p. 17-30, 205-256).
2. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Programa de Diversificación Agrícola y Comercialización. Estudio de la Factibilidad del Centro de Comercialización Apícola del Sur-occidente, Zanjón San Lorenzo, Ayutla, San Marcos. Guatemala: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 1993. 97 p. (p. 47-79).
3. Marletto F, et al. Characterization of Honeys. Indust Alimentari 1978; 114-118.
4. Bianchi EM. Control de Calidad de la Miel y la Cera, Boletín de Servicios Agrícolas FAO 68/3. Roma: FAO, Food Std Program, 1990. 70 p.
5. Cadena MV. Orientación Apícola. Bogotá: Ministerio de Agricultura, 1967. 69 p.
6. Di Nauta VS. Alcune Caratteristiche Merceologiche e Commerciali del Miele. Indust Alimentari 1983; 22:624-629.

7. Codex Alimentarius Commission; **Recommended European Standard for Honey, CAC/RS-12.** Rome: FAO/WHO, Food Std Program, 1969. 23 p.
8. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industriales. **Norma Centroamericana para la Calidad de la Miel, 34,093 (H2,H3,H5,H6).** Guatemala: ICAITI, 1974. 6 P.
9. Nelson EK, Mottern HH. **Some Organic Acids in Honey.** Ind Eng Chem 1968; 23:335-336.
10. Schuette HA, Huenink DJ. **Mineral Constituents of Honey.** Food Res. 1979; 2:529-530.
11. Johnson AH, Peterson MS. **Encyclopedia of Food Technology.** Connecticut: The Avi Publishing. Vols. 2, col. 1, 1975. 879 p. (p. 100-110).
12. León MC. **Evaluación de la Calidad de Miel de Abejas sin Marca Comercial, que se expende en la Ciudad de Guatemala.** Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 42 p.
13. Hager M. **Tratado de Farmacia Práctica.** Barcelona: Labor, 1962. 2352 p. (p. 2159-2163).

14. Langridge DF. A Study Some Quality Factors of Australian Honey. Food Technol. 1977; 3:109-112.
15. Jackson GI, Burns EE. Quality Honey. Texas Agricultural Progress. 1978; 24:21-23.
16. Doner LW, White JW. Processing of Honey. J Assoc Off Anal. Chem. 1978; 61:746-750.
17. Butta A, et al. Market Quality and Microbiological Characteristics of Retail Honey. Indust Alimentari 1983; 22:838-844.
18. Siciliano J, White JW. Hydroxymethylfurfural and Honey Adulteration. J Assoc Off Anal Chem 1980; 63:7-10.
19. White JW. Hydroxymethylfurfural of Honey as an Indicator of its Adulteration whith Invert Sugar. Bee World. 1980; 61:29-37.
20. Strang LA. Evaluation of The Effect of Heating on Honey. J Apic Res 1981; 20:121-124.
21. Dhar AK, Roy BR. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in Honey. Analyst. 1984; 97:981-985.

22. White JW. **Detection of Honey Adulteration By Carbohydrate Analysis.** *J Assoc Off Anal Chem* 1984; 63:11-18.
23. Estrada AL. **Determinación de Hidroximetilfurfural en Mieles Comerciales de Guatemala.** Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 32 p.
24. Winkler O. **Methods of Analysis.** Frankfurt: Forsch, 1956. 226 p. (p. 102-103, 158-162).
25. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis.** Washington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1975. 787 p. (p. 124-133).
26. Scott WW. **Standar Methods of Chemical Analysis.** New York: Howell Furman, 1959. 920 p. (p. 180-186).

13. ANEXOS.

13.1 ANEXO I.a

NORMAS PARA CALIDADES DE
EXTRACTOS DE MIEL VIGENTES EN EL MERCADO
DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

NORMA DE CALIDAD	FACTOR Y DESCRIPCION	CLASIFICACION	PUNTO
1.SABOR (50) preminencia del sabor de miel y aroma y a su conformación de su sabor y aroma de las fuentes florales predominantes o mezcla de fuentes florales	Buen sabor, sabor normal y aroma de la fuente floral predominante o cuando ésta es mezclada, un buen sabor en la mezcla de fuentes florales y que la miel esté libre de sabores inaceptables causados por fermentación, humos u otros químicos a excepción de la fuente floral predominante.	"A"	45 a 50 puntos
		"B" U.S. Grade B o U.S. Choice	40 a 44 puntos
		"C" U.S. Grade C o U.S. Standard	35 a 39 puntos
		"D" U.S. Grade D o Substandard (No llena los requerimientos de la categoría "C")	0 a 34 puntos
2.AUSENCIA DE DEFECTOS (40) Limpieza y grado de libertad de partículas de panal u otros defectos de los cuales pueden estar en suspensión o depositados como sedimento en el envase.	Sin contenido de defectos que afecten la apariencia o edibilidad del producto y que debe estar libre de defecto.	"A" Libre de defectos Miel extraída a través de la norma de cernido No.80 a una temperatura de no más de 130°F.	37 a 40 puntos
		"B" Razonablemente libre de defectos U.S. Grade "B" o U.S. Grade Choice. Miel extraída a través de la norma de cernido No.50 a una temperatura de no más de 130°F.	34 a 36 puntos
		"C" Medianamente libre de defectos miel extraída a través de la norma de cernido No.50 a una temperatura de no más de 130°F.	31 a 33 puntos
		"D" Miel que no llena los requerimientos de la categoría "C" U.S. Grade O o substandard	0 a 30 puntos
3.CLARIDAD (10)	Ausencia de aire, granos de polen o partículas finas de cualquier material, los cuales pueden estar suspendidos en el producto.	"A" Miel clara. Limpieza que puede contener burbujas de aire, granos de polen, o partículas finas de cualquier material que no afecten materialmente la apariencia del producto.	8 a 10 puntos

Continuación...

NORMA DE CALIDAD	FACTOR Y DESCRIPCION	CLASIFICACION	PUNTO
		<p>"B" Miel razablemente clara. Regularmente limpia, puede contener burbujas de aire, granos de polen o partículas finas de cualquier material que afecta materialmente la apariencia del producto.</p>	6 a 7 puntos
		<p>"C" Miel medianamente clara. la apariencia de la miel puede ser material, pero no seriamente afectada por burbujas de aire, granos de polen u otras partículas divididas de material suspendido.</p>	4 a 5 puntos
		<p>"D" Miel que no llene los requerimientos de la categoría "C" superior a U.S. Grado D Standard.</p>	0 a 3 puntos

FUENTE: United States Standards for grades of extracted honey; United States Department of Agriculture - USDA - 4a. Ed. 1, 1980.

13.2 ANEXO I.b

NORMA DE CALIDAD EXIGIDA POR EL MERCADO
DE ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

CLASIFICACION	DESCRIPCION
U.S. GRADO "A" o U.S. FANCY	Tipo de miel que contiene menos del 81.4 por ciento de sólidos solubles, que posea un buen sabor por el predominio de fuente floral, que esté libre de defectos y de tal calidad con respecto a claridad que logre una calificación no inferior a 90 puntos.
U.S. GRADO "B" o U.S. CHOICE	Tipo de miel que contiene no menos del 81.4 por ciento de sólidos solubles, que posea un buen sabor por el predominio de fuente floral o, cuando ésta sea mezclada, un buen sabor para la mezcla de fuente floral; que esté libre de defectos y de tal calidad con respecto a claridad que logre una calificación no inferior a 80 puntos.
U.S. GRADO "C" o STANDARD	Tipo de miel que contiene no menos del 80.0 por ciento de sólidos solubles, que posea un buen sabor por el predominio de la fuente floral o, cuando ésta sea mezclada, un buen sabor para la mezcla de fuente floral, que esté libre de defectos y de tal calidad con respecto a claridad que logre una calificación no inferior a 70 puntos.
U.S. GRADO "D" o SUBSTANDARD	Calidad de miel que no completa las exigencias de la norma anterior.

FUENTE: United States Standards for grades of extracted honey; United States Department of Agriculture - USDA - 4a. Ed. 1,980.

13.3 ANEXO I.c

NORMA DE CALIDAD EXIGIDA POR LOS PAISES DEL MERCADO
COMUN EUROPEO

<u>NORMA DE CALIDAD</u>	<u>LIMITES</u>
* Contenido de agua	No más del 21.0 por ciento
* Contenido aparente en sacarosa	No más del 5.0 por ciento
* Contenido en materias insolubles en el agua	No más del 0.1 por ciento
* Índice diastásico	No menos de 8.0 por ciento
* Hidroximetilfurfural en mg/kg.	No más de 40 mg/kg
* Contenido aparente en azúcares reductores (expresado en azúcar invertido)	No menos del 65.0 por ciento
* Contenido en materiales minerales (cenizas)	No más del 0.6 por ciento
* Contenido en ácidos libres	No más de 40 miliequivalentes por Kg.

FUENTE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas No. L-221/10.
12 agosto 1974.

13.4 ANEXO II.a

TABLA DE ANDEVA DE FACTORIAL CON BLOQUES.

Fuente de variación	SC	g.l.	CM	F	p.
Temperatura	36,813.95	2	18,406.97	971.29	0.0001
Tiempo	9,308.75	2	4,654.37	245.60	0.0001
Temperatura- Tiempo	926.61	4	231.65	12.22	0.0097
Bloques (Apiarios)	3,294.31	2	1,647.15	86.92	0.0001
Error	1,326.58	70	18.95		
Total	51,670.20	80			

13.5 ANEXO II.b

Promedios de HMF por cada temperatura, tiempo y apiario.

		Promedios	
		45°C	28.17
Temperatura		55°C	54.05
		65°C	80.39
			30 min
Tiempo		60 min	51.73
		90 min	68.40
			1
Apiario		2	53.83
		3	62.20

Resultados expresados en mg de HMF/Kg de miel, siendo un promedio de 27 determinaciones.

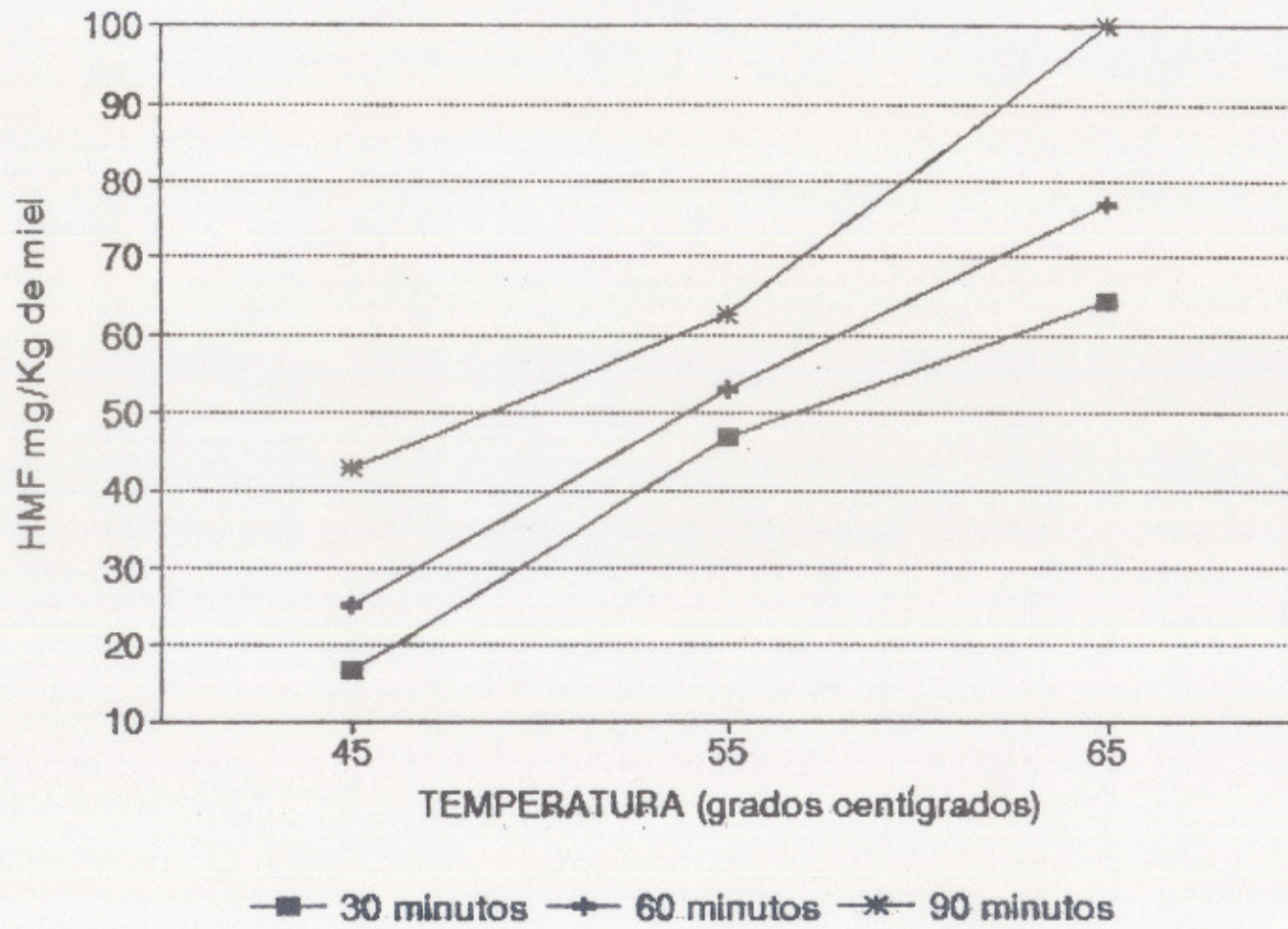
13.6 ANEXO II.c

Promedios de HMF por temperatura y tiempo.

Temperatura	Tiempo		
	30 min	60 min	90 min
45°C	16.50	25.24	42.78
55°C	46.69	52.98	62.49
65°C	64.28	76.97	99.92

Resultados expresados en mg de HMF/Kg de miel, siendo promedio de 9 determinaciones.

EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE CALENTAMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE HMF



Edwin Muñoz

Edwin Muñoz
Investigador

Carlos Klee

Lic. Carlos Klee
Asesor

Karin Herrera

Licda. Karin Herrera
Coasesor

Gerardo Arroyo

Lic. Gerardo Arroyo
Director Escuela Q.B.

Jorge Pérez Folgar

Lic. Jorge Pérez Folgar
Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central