



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN TÉRMICA DE LA MIEL DE  
ABEJA EN UNA METODOLOGÍA ALTERNATIVA,  
MONITOREANDO LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA C,  
HIDROXIMETILFURFURAL Y NÚMERO DE DIASTASA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: DANESA AMPARO RUIZ YUPANGUI**

**TUTOR: DR. GALO INSUASTI CASTELO. M.Sc.**

**Riobamba-Ecuador**

**2018**

**© 2018, Danesa Amparo Ruiz Yupangui**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo Experimental, “**ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN TÉRMICA DE LA MIEL DE ABEJA EN UNA METODOLOGÍA ALTERNATIVA, MONITOREANDO LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA C, HIDROXIMETILFURFURAL Y NÚMERO DE DIASTASA**”, de responsabilidad de la señorita Danesa Amparo Ruiz Yupangui, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. Galo Insuasti C. M. Sc.  
**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Carlos Pilamunga  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Danesa Amparo Ruiz Yupangui, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 23 de noviembre de 2018

---

Danesa Amparo Ruiz Yupangui

C.I. 060582008-3

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de titulación se la dedico con mucho amor y cariño a las personas más importantes de mi vida, mis queridos padres Vicente Ruiz y Susana Yupangui, por ser la razón para alcanzar el éxito, el espejo en el cual quiero reflejar sus virtudes que han inculcado en mis hermanas y en mí persona, por ser ejemplos de superación y admiración; a mis hermanas Paulina y Jacqueline por compartir momentos de alegrías y tristezas que en cierto momento de la vida nos enseñó a ser más fuertes y saber que solo necesitamos el apoyo mutuo de cada una para superar los obstáculos; a mi querido sobrino Yadiel la mayor bendición, que llegó a darnos luz y alegría a nuestro hogar; a mi abuelita Hortencia quien sin saberlo me enseñó a ser paciente y tolerante ; a mi amiga Elizabeth Lilian por brindarme su amistad a lo largo de la carrera y coincidir con el mismo objetivo que hoy se ve culminado, por compartir momentos de diversión y de dificultades que se convertirán en gratos recuerdos.

Danesa.

## AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme cada día la oportunidad de compartir con las personas que amo y quiero, por permitirme realizar las actividades que por más insignificantes que yo piense que sean, es una bendición, por la salud de cada uno de los miembros de mi familia, por los momentos gratos y también por los momentos difíciles porque sé que es tu voluntad, por cuidarme y guiarme en cada decisión, por haberme permitido cumplir un logro más en mi vida. A mis padres, por el apoyo desmedido, por las palabras reconfortantes que me brindaron en los momentos de mayor dificultad, por el simple hecho de existir y llegar a casa al final del día, por apoyarme con los recursos necesarios para poder realizarme como profesional.

Al Dr. Galo Insuati por guiarme en cada etapa de la investigación, por compartir sus conocimientos y consejos me sirvieron para culminar el proyecto de titulación.

Al Dr. Carlos Pilamunga quien estuvo presto con sus consejos y conocimientos en cada ocasión que necesite de su ayuda.

A mis amigos y compañeros de la carrera, por compartir momentos de complicidad que hicieron que las situaciones difíciles sean más llevaderas.

Danesa.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvi
SUMMARY .....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Apicultura.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Abeja <i>Apis melífera</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1 <i>Productos de las abejas</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Miel de abeja .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1 <i>Formación de la miel de abeja</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 <i>Proceso de extracción de la miel de abeja</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.3 <i>Características organolépticas de la miel de abeja</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.4 <i>Composición química</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Usos de la miel.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1 <i>Propiedades nutricionales</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2 <i>Propiedades medicinales</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Parámetros prescritos para miel de abeja.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.1 <i>Parámetros físico-químicos</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1.1 <i>Humedad</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1.2 <i>Azúcares reductores</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1.3 <i>Sacarosa</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1.4 <i>Acidez libre</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1.5 <i>Hidroximetilfurfural</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1.6 <i>Número de diastasa</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1.7 <i>Sólidos insolubles en agua</i> .....</b>	<b>15</b>

1.5.1.8	<i>Cenizas</i> .....	15
1.5.1.9	<i>Conductividad eléctrica</i> .....	15
1.5.2	<i>Parámetros microbiológicos</i> .....	15
1.6	<b>Alteraciones más comunes de la miel</b> .....	16
1.6.1	<i>Fermentaciones</i> .....	16
1.6.2	<i>Cristalización</i> .....	16
1.6.3	<i>Separación de fases</i> .....	17
1.7	<b>Calentamiento de la miel</b> .....	17
1.8	<b>Proceso de envasado a nivel industrial</b> .....	18
1.9	<b>Tratamiento térmico</b> .....	19
1.10	<b>Parámetros indicativos del sobrecalentamiento</b> .....	19
1.10.1	<i>Hidroximetilfurfural</i> .....	19
1.10.2	<i>Número de diastasa</i> .....	20
1.10.3	<i>Vitamina C</i> .....	21
1.10.3.1	<i>Condiciones de operación en HPLC</i> .....	21

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	22
2.1	<b>Tipo y diseño de la investigación</b> .....	22
2.1.1	<i>Tipo de investigación</i> .....	22
2.1.2	<i>Diseño de la investigación</i> .....	22
2.2	<b>Operacionalización Conceptual</b> .....	23
2.3	<b>Operacionalización Metodológica</b> .....	23
2.4	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	24
2.4.1	<i>Materiales</i> .....	24
2.4.2	<i>Equipos</i> .....	25
2.4.3	<i>Reactivos</i> .....	26
2.5	<b>Localización del experimento</b> .....	27
2.6	<b>Manejo específico del experimento</b> .....	27

2.6.1	<i>Factores en estudio</i> .....	28
2.6.2	<i>Tratamientos térmicos para miel genuina</i> .....	29
2.7	<b>Hipótesis de la investigación</b> .....	30
2.8	<b>Análisis estadístico</b> .....	31
2.9	<b>Técnicas utilizadas para valorar la alteración térmica</b> .....	33
2.9.1	<i>Determinación de hidroximetilfurfural (NTE INEN 1637)</i> .....	33
2.9.2	<i>Número de diastasa (NTE INEN 1638)</i> .....	34
2.9.3	<i>Vitamina C</i> .....	35
2.10	<b>Técnicas adjuntas para el complemento de análisis de miel</b> .....	37

### CAPÍTULO III

3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	38
3.1	<b>Miel genuina de abeja para el estudio</b> .....	38
3.2	<b>Diseño de la metodología experimental para el tratamiento térmico.</b> .....	38
3.2.1	<i>Equipo experimental diseñado para tratamientos térmicos</i> .....	38
3.2.2	<i>Propuesta de la metodología experimental diseñada para el tratamiento térmico.</i> ...	39
3.3	<b>Resultado de los tratamientos térmicos experimentales y sus indicadores</b> .....	41
3.3.1	<i>Resultados promedios de la determinación de concentración de hidroximetilfurfural (HMF) de los tratamientos térmicos</i> .....	41
3.3.2	<i>Resultados promedios de la determinación del número de diastasa de los tratamientos térmicos</i> .....	43
3.4	<b>Análisis estadístico de los resultados (HMF y ND)</b> .....	45
3.4.1	<i>Hipótesis</i> .....	45
3.4.2	<i>Prueba de hipótesis para los tratamientos térmicos realizados</i> .....	45
3.4.2.1	<i>Análisis de varianza para la concentración de hidroximetilfurfural (HMF)</i> .....	45
3.4.2.2	<i>Análisis de varianza para el número de diastasa</i> .....	49
3.5	<b>Variables para el mejor tratamiento térmico</b> .....	51
3.6	<b>Análisis de todos los parámetros de la norma NTE INEN 1572, para determinación del nivel de afectación térmica de la miel (ambiente y después del mejor tratamiento térmico).</b> .....	52

<b>3.7</b>	<b>Resultados de la degradación de vitamina C, en una muestra de miel adicionada experimentalmente vitamina C.</b> .....	544
<b>3.8</b>	<b>Propuesta de un tratamiento térmico alternativo artesanal para los apicultores y socialización de resultados.</b> .....	56
<b>3.8.1</b>	<i>Equipo alternativo de tratamiento térmico</i> .....	56
<b>3.8.2</b>	<i>Socialización</i> .....	58
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	59
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	60
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Clasificación taxonómica de la abeja <i>Apis mellífera</i> .....	5
<b>Tabla 2-1:</b> Composición química de la miel de abeja.....	11
<b>Tabla 3-1:</b> Requisitos físico-químicos y microbiológicos de la miel de abeja. ....	13
<b>Tabla 1-2:</b> Operacionalización conceptual.....	23
<b>Tabla 2-2:</b> Operacionalización metodológica.....	23
<b>Tabla 3-2:</b> Lista de materiales de laboratorio utilizados.....	24
<b>Tabla 4-2:</b> Lista de equipos de laboratorio utilizados.....	25
<b>Tabla 5-2:</b> Lista de reactivos utilizados.....	26
<b>Tabla 6-2:</b> Descripción de factores y niveles de estudio.....	28
<b>Tabla 7-2:</b> Tratamientos experimentales realizados.....	29
<b>Tabla 8-2:</b> Condiciones de operación para la cuantificación de vitamina C.....	36
<b>Tabla 1-3:</b> Especificaciones del baño María termostático.....	39
<b>Tabla 2-3:</b> Especificaciones del Erlenmeyer.....	39
<b>Tabla 3-3:</b> Concentración promedio de HMF en la miel de abeja, sometida a los diferentes tratamientos térmicos.....	41
<b>Tabla 4-3:</b> Contenido promedio del número de diastasa en la miel de abeja, sometida a los diferentes tratamientos térmicos.....	43
<b>Tabla 5-3:</b> Datos de la concentración de HMF en los tratamientos térmicos.....	45
<b>Tabla 6-3:</b> Prueba de los efectos inter-sujetos para la concentración de HMF.....	47
<b>Tabla 7-3:</b> Datos del contenido del número de diastasa en los tratamientos térmicos.....	49
<b>Tabla 8-3:</b> Prueba de los efectos inter-sujetos para el número de diastasa.....	50
<b>Tabla 9-3:</b> Condiciones óptimas de tratamiento térmico que sea aplicable en la miel de abeja....	51
<b>Tabla 10-3:</b> Resultado de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, de la miel al ambiente y después del mejor tratamiento térmico.....	52
<b>Tabla 11-3:</b> Resultados de la concentración de vitamina C, como indicativo para valorar probable degradación de otras sustancias presentes en la miel procesada al mejor tratamiento térmico.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Abeja <i>Apis melífera</i> recolectando néctar .....	4
<b>Figura 2-1:</b> Productos que se obtienen de la colmena .....	5
<b>Figura 3-1:</b> Equipo de seguridad para la extracción de miel de abejas .....	9
<b>Figura 4-1:</b> Proceso de producción y comercialización de la miel de abeja.....	9
<b>Figura 5-1:</b> Segmentos o mercados en los que se utiliza la miel y sus derivados .....	12
<b>Figura 1-6:</b> Proceso de envasado .....	18
<b>Figura 7-1:</b> Reacción de deshidratación de glucosa y fructosa para la formación del HMF.....	20
<b>Figura 8-1:</b> Hidrólisis del almidón por acción de la diastasa .....	21
<b>Figura 1-2:</b> Descripción de la metodología realizada.....	30
<b>Figura 2-2:</b> Ingreso de datos para la determinación de la concentración de HMF.....	31
<b>Figura 3-2:</b> Ingreso de datos para la determinación del número de diastasa.....	32
<b>Figura 4-2:</b> Ingreso de variables de temperatura, tiempo y concentración de HMF.....	32
<b>Figura 5-2:</b> Ingreso de variables de temperatura, tiempo y número de diastasa.....	32
<b>Figura 1-3:</b> Equipo experimental de tratamiento térmico.....	38

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Comparación de la concentración de hidroximetilfurfural entre los diferentes tratamientos térmicos.....	42
<b>Gráfico 2-3:</b> Concentración del número de diastasa en los diferentes tratamientos térmicos....	44
<b>Gráfico 3-3:</b> Medias marginales estimadas para la concentración de hidroximetilfurfural .....	48
<b>Gráfico 4-3:</b> Medias marginales estimadas para el número de diastasa.....	51
<b>Gráfico 5-3:</b> Degradación de vitamina C en miel de abeja, a temperatura ambiente y después del mejor tratamiento térmico.....	56

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

**Fotografía 1-3:** Entrega de miel genuina de un socio de ASOPROACH

**Fotografía 2-3:** Diseño de la metodología de tratamiento térmico.

**Fotografía 3-3:** Análisis de la concentración de vitamina C, mediante HPLC

**Fotografía 4-3:** Socialización de resultados y de la propuesta alternativa artesanal de tratamiento térmico (ASOPROACH)

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A** Recepción de la muestra de miel de abeja
- Anexo B** Diseño de la metodología experimental de tratamiento térmico
- Anexo C** Análisis físico-químico de la miel de abeja tratada térmicamente
- Anexo D** Determinación de vitamina C
- Anexo E** Socialización a los apicultores
- Anexo F** Aval de la Facultad de ciencias para la ASOPROACH
- Anexo G** Certificado de realización de la socialización ASOPROACH
- Anexo H** Resultados microbiológicos

## RESUMEN

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación del grupo SAGID (Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo) titulado, “ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOPROACH PARA DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO. La investigación tuvo como objetivo realizar un estudio de afectación térmica de la miel de abeja mediante una metodología alternativa, monitoreando la degradación de vitamina C, hidroximetilfurfural (HMF) y número de diastasa (ND). El estudio se realizó con miel genuina de un apicultor de ASOPROACH (Asociación de Producción Apícola de Chimborazo). Se diseñó una metodología experimental de tratamiento térmico para 300 mL de miel a cuatro temperaturas y tres tiempos cada una: 30, 60, 80 y 90 °C a 15, 30 y 60 minutos. Luego de cada tratamiento térmico se analizó la concentración de HMF y ND. Los resultados del análisis mostraron que el mejor tratamiento corresponde a una temperatura de 30 °C por 15 minutos. Para el análisis de la concentración de vitamina C por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se repitió el mejor tratamiento térmico por seis veces, observándose que la vitamina C y todos los parámetros físico-químicos establecidos en la norma NTE INEN 1572 se mantenían en una concentración estable. Los resultados experimentales fueron corroborados con un análisis de varianza (SPSS v21). Se socializó a los apicultores de ASOPROACH sobre la parte experimental de los tratamientos térmicos y la propuesta alternativa artesanal. Se concluyó que el calor afecta negativamente los parámetros normados a medida que se incrementa la temperatura y la duración del tratamiento térmico. Cuando amerite aplicarse calor a la miel de abeja, puede utilizarse la metodología diseñada con un cumplimiento estricto de las condiciones detalladas en la misma.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS>, <TRATAMIENTO TÉRMICO>, <HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)>, <NÚMERO DE DIASTASA (ND)>, <VITAMINA C>, <CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)>.

## SUMMARY

This work is part of the research project of the group Food Safety Research and Development Group (SAGID) entitled, "QUALITY ASSURANCE, THERMAL TREATMENT AND OZONIZATION OF HONEY BEE FROM "ASOPROACH" FOR THE DEVELOPMENT OF PRODUCTS AND POSITIONING IN THE MARKET. The objective of the research was to carry out a study on the thermal affectation of honey by an alternative methodology, monitoring the degradation of vitamin C, hydroxymethylfurfural (HMF) and diastaze number (ND). The study was carried out with genuine honey from a beekeeper of the Apicultural Production Association of Chimborazo (ASOPROACH). An experimental heat treatment methodology was designed for 300 ml of honey at four temperatures and three times each: 30, 60, 80 and 90 °C at 15, 30 and 60 minutes. After each heat treatment, the concentration of HMF and ND was analyzed. The results of the analysis showed that the best treatment corresponds to a temperature of 30°C for 15 minutes. For the analysis of the concentration of vitamin C by high-performance liquid chromatography (HPLC), the best heat treatment was repeated six times, observing that vitamin C and all the physico-chemical parameters established in the NTE INEN 1572 standard were maintained in a stable concentration. The experimental results were corroborated with an analysis of variance (SPSS v21). The beekeepers of ASOPROACH were told about the experimental part of the thermal treatments and the alternative proposal. It was concluded that the heat negatively affects the regulated parameters as the temperature and the duration of the thermal treatment increase. When it is necessary to apply heat to honey, the methodology designed with strict compliance with the conditions detailed there can be used.

**Keywords:** <BIOCHEMISTRY>, <FOOD PROCESSING>, <THERMAL TREATMENT> <HYDROXYMETHYLFURFURAL (HMF)> <NUMBER OF DIASTAZE (ND)>, <VITAMIN C> <HIGH RESOLUTION LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)>

## INTRODUCCIÓN

El presente tema de trabajo de titulación “ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN TÉRMICA DE LA MIEL DE ABEJA EN UNA METODOLOGÍA ALTERNATIVA, MONITOREANDO LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA C, HIDROXIMETILFURFURAL Y NÚMERO DE DIASTASA”, es parte del proyecto “ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO (ASOPROACH) PARA DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO” desarrollado en el grupo SAGID (Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo) de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias y que está bajo un acuerdo interinstitucional entre el grupo SAGID, ASOPROACH y la FACULTAD DE CIENCIAS el mismo que fue presentado al Instituto de Investigación (IDI) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. La miel de abeja es un producto muy consumido, sea como endulzante de bebidas o como materia prima para la elaboración de otros productos. Muchos consumidores relacionan una miel líquida con calidad, rechazando aquellas mieles cristalizadas, razón por la que varios apicultores hoy en día tienden a calentar la miel a altas temperaturas. Otro motivo por el cual el apicultor recurre al calor, es para obtener una miel homogénea cuando se ven en la necesidad de mezclar mieles de diferentes colmenas o apiarios, generando pérdida de las propiedades nativas de la miel, debido a que el calor altera el color, sabor, aroma y propiedades físico-químicas.

La presente investigación se pretende con carácter de opcional dotar una metodología de tratamiento térmico para la miel de abeja, utilizando materiales estandarizados y aplicando cuatro temperaturas a tres tiempos diferentes. El grado de afectación térmica de la miel se valora a través del análisis de parámetros indicativos del sobrecalentamiento, como son: hidroximetilfurfural (HMF) y número de diastasa (ND). La temperatura y el tiempo que generen el cumplimiento de las especificaciones de la norma NTE INEN 1572 serán considerados como las variables del mejor tratamiento térmico para miel de abeja. La miel sometida al mejor tratamiento térmico encontrado será valorará en todos los parámetros establecidos en la normativa, como también en el comportamiento relacionado con la concentración de vitamina C, mediante HPLC.

Con el diseño de la metodología de tratamiento térmico experimental y la propuesta alternativa artesanal que garantiza genuinidad de la miel, se contribuirá a los apicultores y en especial a la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo (ASOPROACH), sin que signifique promocionar el tratamiento térmico de la miel de abeja.

Esta investigación busca precisar los resultados de temperatura y tiempo para el tratamiento térmico de la miel, asociado a la metodología propuesta y asegurar la no alteración de ella, situación que no es clara o muy expuesta en otras fuentes relacionadas con tratamientos térmicos, por ejemplo en los que se expresan a continuación.

- En la tesis realizada por Mélida Vargas Barrionuevo en el año 2006, sobre “El efecto del tratamiento térmico temporal de la miel de abejas sobre la variación de su calidad durante el almacenamiento”, se realiza cuatro tratamientos térmicos de 52, 55 y 58 °C, durante 3, 6, 9 y 12 minutos. En la investigación no señala las condiciones bajo las cuales se realizaron los tratamientos térmicos. (Vargas, 2006, p.19).
- Mario Visquert en su tesis doctoral sobre la “Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel” en el año 2015, menciona la importancia de la temperatura y el tiempo en la calidad de la miel, durante su almacenamiento, licuefacción y pasteurización. Los tratamientos fueron realizados con equipos que no están al alcance de los apicultores. (Visquert, 2015, p.55).
- Un estudio titulado “Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas”, presentado por Ana Correa en el 2015, realiza dos tratamientos térmicos de pasteurización (65 °C por 15 y 21 minutos) y dos tratamientos de tindalización (80 °C por 15 y 21 minutos). En la investigación no se especifica la metodología aplicada. (Correa, 2015, p.88).

En la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, no se han realizado estudios previos sobre la temática por lo cual se tomó el interés de diseñar una metodología alternativa de tratamiento térmico aplicado en la miel de abeja, monitoreando los parámetros de calidad establecidos en la norma NTE INEN 1572.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo general**

Realizar el estudio de la afectación térmica de la miel de abeja en una metodología alternativa, monitoreando la degradación de vitamina C, hidroximetilfurfural (HMF) y número diastasa.

### **Objetivos específicos**

1. Seleccionar un proveedor de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo que garantice una miel de abeja genuina, requisito básico del estudio.
2. Diseñar una metodología experimental de tratamiento térmico para un volumen definido de miel de abeja.
3. Aplicar en la metodología diseñada cuatro tratamientos térmicos de 30 °C, 60 °C, 80 °C y 90 °C a la miel de abeja por 15, 30 y 60 minutos.
4. Monitorear en los tratamientos experimentales el deterioro de vitamina C y los parámetros de HMF, número de diastasa, según Norma INEN 1572.
5. Según la metodología planteada definir las variables del tratamiento térmico que permita el cumplimiento de la norma INEN 1572.
6. Realizar el análisis físico-químico y microbiológico de una sola miel de abeja para comprobar la metodología obtenida.
7. Sugerir un equipo alternativo artesanal de tratamiento térmico y socialización de resultados.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1 Apicultura

La apicultura es una rama de la zootecnia que se dedica al cuidado de las abejas *Apis mellífera*, con la finalidad de obtener beneficios económicos, aprovechando la producción de miel como principal producto elaborado por estos insectos, así como la jalea real, polen, propóleos y cera. Sin dejar de lado la actividad de polinización como un beneficio indirecto que realizan las abejas en los cultivos agrícolas. Las abejas más que miel aportan economía, es por ello que el ser humano aplica todos sus conocimientos, tecnologías y experiencias para obtener un mejor rendimiento de sus productos. (Scarabino, 2015a, p.54). El Ecuador es un país rico en recursos naturales, con una diversidad de pisos climáticos y biológicos considerándose como fuentes inagotables de néctar, polen y resinas para la producción de propóleos, dirigiendo a la apicultura hacia un mayor desarrollo económico y social. (Telégrafo, 2016).

#### 1.2 Abeja *Apis mellífera*



**Figura 1-1: Abeja *Apis mellífera* recolectando néctar**

Fuente: (Farmer, 2018).

Son insectos que viven en colonia, habitan en un panal construida por ellas mismas o por el hombre para obtener beneficios económicos, constituyen la especie con mayor interés en la apicultura ya que es una de las especies más productivas y fáciles de manejar, se alimentan del néctar y polen de las plantas, como fuentes de carbohidratos y proteínas. (Scarabino, 2015b, p.56)

**Tabla 1-1:** Clasificación taxonómica de la abeja Apis melífera

<b>Orden</b>	Himenóptero
<b>Familia</b>	Apidae
<b>Género</b>	Apis
<b>Especie</b>	Melífera

Fuente: (González et al., 2005, p.29)

Realizado por: Ruiz Danesa, 2018

Las colmenas están constituidas por tres miembros de la colonia cumpliendo cada miembro una función específica.

- La reina: es la encargada de guiar la colmena, además es la responsable de perpetuar la especie.
- Los zánganos: responsables de fecundar a la abeja reina
- Las abejas obreras: responsables de varias actividades, son las encargadas de suministrar alimentos a las larvas y a la abeja reina; además son responsables de elaborar los múltiples productos de la colmena como: miel, jalea real, cera y almacenamiento del polen. (Fernández, 2002, pp.9-10).

### 1.2.1 Productos de las abejas



**Figura 2-1:** Productos que se obtienen de la colmena

Fuente: (Apaza, 2013a)

### - **Miel de abeja**

La miel es un producto natural fabricado por las abejas a partir de la transformación de néctares presentes en las diferentes especies florales, dotándola de propiedades nutritivas e inclusive terapéuticas, presenta propiedades que la hacen diferente de los demás tipos de mieles, se caracteriza por tener una alta concentración de azúcares en su composición. (Ávila, 1980a, pp. 66-67)

### - **Jalea real**

Es un producto elaborado por las glándulas salivales de las abejas, es considerada una de las mayores fuentes energéticas y proteicas constituyendo la principal fuente de alimento de las larvas en formación, tiene un aspecto viscoso de coloración lechosa, es muy apetecida en el mercado debido a sus propiedades medicinales (combate la anemia), presenta propiedades cosméticas por su contenido de vitamina E por lo que es utilizada como rejuvenecedor. (Ballesteros y Vásquez, 2007a, p.74)

Para la obtención de este producto se necesita invertir económicamente, debido a que su producción requiere de tiempo e insumos, es por ello que el precio en el mercado también va acorde a su inversión.(Ballesteros y Vásquez, 2007b, p.75)

Debido a que la producción de la jalea real no es continua durante el año, se han realiza estudios sobre como incrementar su producción, mediante la implementación de un suplemento energético y proteico en la alimentación de las abejas para mejorar el rendimiento.(Martínez y Ojeda, 2006, p.2)

### - **Polen**

El polen contienen los gametos de las plantas y se encuentran en las anteras de los estambres de las flores, las abejas recogen el polen en sus patas y alas a lo largo de su travesía en busca de néctar, depositan parte de este polen en los estambres de otras flores cuando se posan sobre ellas, contribuyendo de esta manera en la polinización. Una vez que la abeja llega a la colmena se posan en la entrada depositando allí el polen es por ello que los apicultores tienen trampas en la entrada de la colmena para recoger este producto. (Carpes, 2008a, p.22).

Tiene en su composición una gran cantidad de proteínas mucho más que la leche, carne, huevos, también presenta lípidos, aminoácidos, sales minerales y sustancias polifenólicas con propiedades antioxidativas mismas que son objeto de estudio para obtener el máximo provecho de este producto. Es consumido generalmente en batidos, yogurt, ensaladas. (Carpes, 2008b, p.23).

## - **Cera**

Es secretado por las glándulas ceríparas de las abejas, presentan una consistencia plástica, su punto de fusión oscila entre los 60 y 65 °C, es de suma importancia la secreción de esta sustancia ya que permite construir el panal y sellar los orificios para permitir la maduración de la miel, está compuesta generalmente por lípidos lo cual le permite ser soluble en compuestos orgánicos. (Vit, 2005a, p.37).

Sus usos son muy variados como por ejemplo: en la cosmética como vehículo de un preparado cosmético, es decir en la elaboración de pomadas, ungüentos, bálsamos, etc., también es utilizado en la fabricación de velas.(Vit, 2005b, p.38).

## - **Propóleos**

Es una sustancia resinosa obtenida por las abejas de los árboles, tiene múltiples funciones dentro de la colmena, debido a su propiedad antibacteriana y antimicótica, ayuda a proteger el panal de microorganismos. Es comercializado como tintura en alcohol para combatir problemas respiratorios, dermatitis, como desinfectante, cicatrizante, etc. (Vargas et al., 2013, p.705)

### **1.3 Miel de abeja**

El Codex Alimentarius en su norma para la miel CODEX STAN 12-19811, la define como una “sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje”. (Maskeliunas, 1981, p.3). La miel es consumida desde la antigüedad no solo por su gran valor nutricional, sino también por sus propiedades medicinales utilizándola como ingredientes en varios productos: cosméticos, medicinales, en repostería, etc. (Ulloa, 2010a, p.14).

#### **1.3.1 Formación de la miel de abeja**

La transformación de néctar a miel pasa por un proceso de concentración de azúcares y reducción del contenido de agua de un 70 – 92 % hasta aproximadamente un 17 %. Es un proceso físico y químico en el que la sacarosa se transforma en fructosa y glucosa, mediante la enzima invertasa que se encuentra en la saliva de las abejas. (Ulloa, 2010b, p.15).

Una vez que el néctar se encuentra en el buche de la abeja pecoleadora, se mezcla con la invertasa, la abeja al llegar a la colonia lo traspasa al buche de una obrera almacenista, aumentando la concentración de invertasa hasta 20 veces acelerando la inversión de la sacarosa. La temperatura elevada del interior de la colonia ayuda a la deshidratación natural del néctar. (Ulloa, 2010c, p.16).

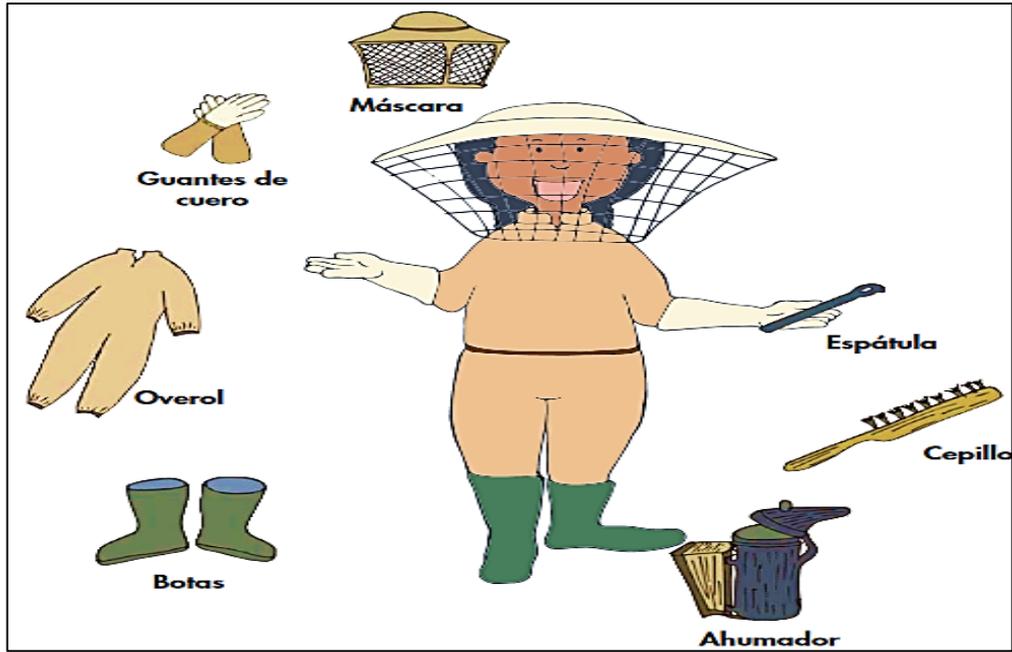
El proceso finaliza cuando la última obrera almacenista lo deposita en una celdilla, a un tercio de su capacidad. En su interior continua el proceso enzimático y el néctar pierde agua hasta que madura. Una vez madurada, la obrera añade el segundo tercio y continúa el proceso hasta su total capacidad. Cuando la miel está elaborada, la celdilla es operculada. Si las condiciones ambientales no son las adecuadas (baja temperatura), la miel es trasvasada por una cadena de abejas almacenistas hasta que queda totalmente elaborada. (Ulloa, 2010d, pp.17-18)

### ***1.3.2 Proceso de extracción de la miel de abeja***

Como primer paso para extraer la miel de abeja es necesario contar con una vestimenta segura y completa con la finalidad de evitar picaduras de estos insectos, las abejas al sentirse invadidas se tornan agresivas, algunas personas son alérgicas al veneno por lo que se debe tomar todas las medidas de precaución. La vestimenta consta de:

- Overol
- Máscara
- Guantes de cuero
- Botas

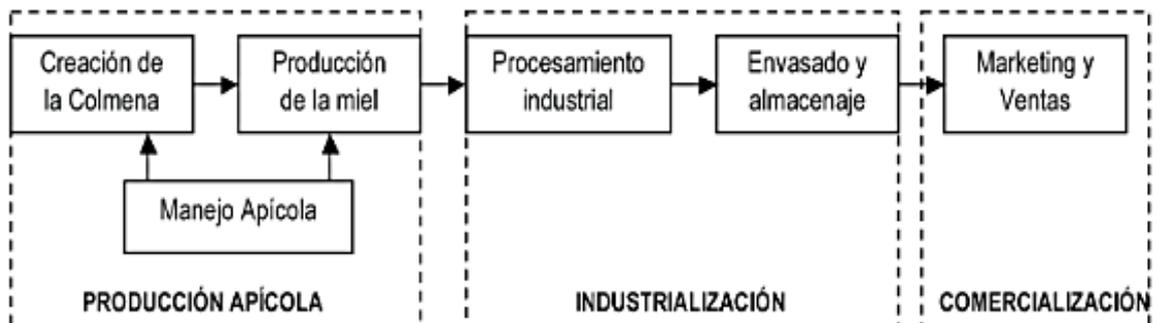
Además se debe contar con los siguientes materiales: ahumador, cepillo y espátula.



**Figura 3-1: Equipo de seguridad para la extracción de miel de abejas**

Fuente: (Apaza, 2013b)

Una vez equipado se procede a humear las colmenas para que las abejas se retiren de las cajas, se retira los cuadros y con la ayuda de un cepillo o trinche se procede a realizar el desoperculado es decir se procede a retirar la cera que cubre los orificios donde se encuentra la miel. La extracción se puede realizar manualmente o mediante el uso de una centrífuga, el primer método no es muy recomendado ya que implica tiempo mientras que el segundo es más eficiente. Finalmente para obtener una miel libre de impurezas (cera, polen e incluso tierra) se procede a filtrar y envasar en recipientes de vidrio o plástico para su respectiva comercialización.



**Figura 4-1: Proceso de producción y comercialización de la miel de abeja**

Fuente: (Pérez, 2012a).

### ***1.3.3 Características organolépticas de la miel de abeja***

Las características organolépticas que presenta la miel son las siguientes:

- **Consistencia.-** la miel recién extraída es ligeramente fluida, esta característica depende del tiempo de almacenamiento. Transformándose en una masa pastosa, granulada y opaca debido a la cristalización de la glucosa y fructosa cuando es almacenada durante mucho tiempo. (Ávila, 1980b, p.68)
- **Color.-** generalmente la miel es de color castaño claro o ambarino, un color castaño oscuro es indicativo que la miel es rica en folatos, hierro, vitaminas B<sub>1</sub> y C, mientras que un color claro son ricas en vitamina A. (Ávila, 1980b, p.68)
- **Sabor.-** independientemente de la intensidad del color, tiene un sabor dulce debido a su composición, también influye la procedencia floral de la miel. (Ávila, 1980c, p.69).

### ***1.3.4 Composición química***

Los distintos tipos de miel se diferencian entre si según su origen botánico y geográfico, así como según el tipo de elaboración. El rango de oscilación natural de sus más de 180 componentes hace imposible definir unos valores exactos de composición. (Ávila, 1980d, p.75).

Existen varios factores que determinan la composición de la miel de abeja como: la especie, la naturaleza del apiario, el estado fisiológico de la colmena, el tipo de floración. Entre los principales componentes de la miel se encuentran: hidratos de carbono (75 a 80 %) siendo los principales azúcares la glucosa y fructosa, sustancias diversas (1 a 5 %) y el agua en un (20 %), valores aproximados dependientes de los factores antes mencionados. (Ávila, 1980d, p.75)

**Tabla 2-1:** Composición química de la miel de abeja

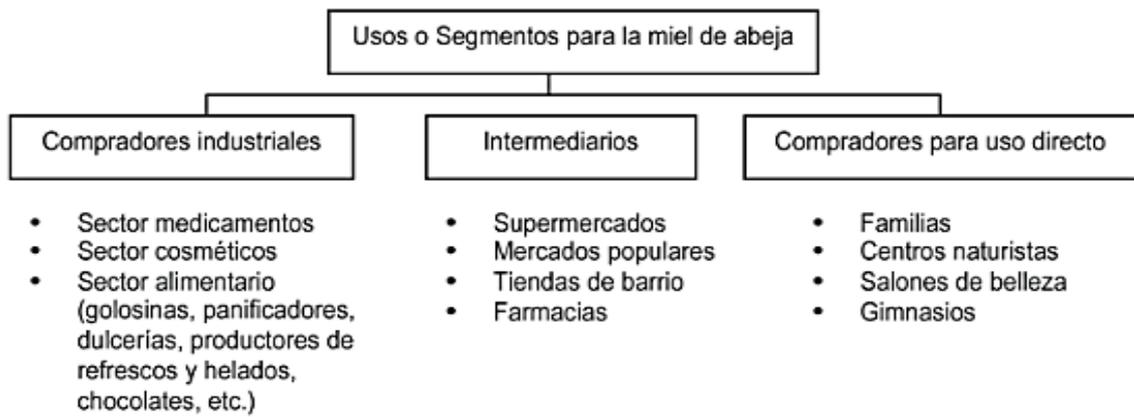
NUTRIENTE	CANTIDAD/100 g
Agua	17,1 g
Carbohidratos	82,4 g
Fructosa	38,5 g
Glucosa	31,0 g
Maltosa	7,20 g
Proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales	0,50 g
Energía	304 Kcal
Riboflavina	0,06 mg
Niacina	0,36 mg
Ácido pantoténico	0,11 mg
Piridoxina (B6)	0,32 mg
Ácido ascórbico	2,2 – 2,4 mg
Calcio	4,4 – 9,2 mg
Cobre	0,003 – 0,10 mg
Hierro	0,06 – 1,5 mg
Magnesio	1,2 – 3,5 mg
Fosforo	1,9 – 6,3 mg
Potasio	13,2 – 16,8 mg
Sodio	0,0 – 7,6 mg

Fuente: (Balansiya, 2014)

Realizado por: Ruiz Danesa, 2018

#### 1.4 Usos de la miel

A través del tiempo el uso de miel se ha extendido en varias áreas y mercados, debido a que presenta un sin número de propiedades que la hacen útil. Su producción se ha incrementado generando fuentes de empleo e ingreso económico para quienes se dedican a la apicultura.



**Figura 5-1: Segmentos o mercados en los que se utiliza la miel y sus derivados**

Fuente: (Pérez, 2012b)

#### ***1.4.1 Propiedades nutricionales***

Debido a su composición rica en carbohidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, es muy consumida en la dieta diaria de las personas, ya sea como edulcorante de bebidas o como aditivo alimenticio en repostería, panadería. (Lavandera, 2011a, p.188)

#### ***1.4.2 Propiedades medicinales***

La presencia de flavonoides, enzimas (invertasa y diastasa), ácido ascórbico le atribuyen propiedades medicinales a la miel, utilizándola en la fabricación de cremas, ungüentos para tratar heridas infectadas por su poder antibacterial; se han realizado estudios sobre la curación de heridas con miel de abeja generando resultados favorables que corroboran dicha actividad antibiótica, debiéndose a la presencia de compuestos fenólicos en su composición. (Lavandera, 2011b, p.189)

### **1.5 Parámetros prescritos para miel de abeja**

Para el consumo y comercio de miel de abeja genuina es necesario realizar pruebas específicas que garanticen su calidad con la finalidad de satisfacer las necesidades y seguridad del consumidor, para ello la norma NTE INEN 1572 redactada a partir del Código Alimentario (CODEX STAN 12-19811), establece las siguientes especificaciones a considerarse para el control de calidad en mieles de abeja.

**Tabla 3-1:** Requisitos físico-químicos y microbiológicos de la miel de abeja.

REQUISITOS	UNIDADES	CLASE		MÉTODOS DE ENSAYO
		Mínimo	Máximo	
Contenido de humedad	% en masa	-	20	INEN 1632
Contenido de azúcares reductores	% en masa	65	-	INEN 1633
Contenido de sacarosa	% en masa	-	5	INEN 1633
Contenido de sólidos insolubles en agua		-	0,2	INEN 1635
Acidez libre	meq/kg	-	50	INEN 1634
Número de diastasa	-	8	-	INEN 1638
Contenido de hidroximetilfurfural	mg/kg	-	40	INEN 1637
Contenido de cenizas	% en masa	-	0,5	INEN 1636
Conductividad eléctrica	mS/cm	-	0,8	Anexo A
Recuento total de hongos y levaduras	UPC/g	-	1 x 10 <sup>2</sup>	NTE INEN 1529-10

Fuente: (NTE INEN 1572, 2016.)

Realizado por: Ruiz Danesa, 2018

### 1.5.1 Parámetros físico-químicos

#### 1.5.1.1 Humedad

La determinación del contenido de humedad, es indicativo para conocer el grado de madurez de la miel al momento de ser cosechada, recomendándose cosechar la miel cuando el 90% del panal se encuentre operculado, la miel cosechada en esas condiciones presenta entre un 17 y 18 % de humedad, cumpliéndose la normativa. (Zandamela, 2008a, p.42)

La miel al ser un producto higroscópico, absorbe humedad del medio en el que se almacena, el exceso de humedad en la miel puede generar fermentaciones e incremento de microorganismos, para mantener el nivel de humedad dentro de los valores de referencia se recomienda lo siguiente: cosechar cuando el panal este operculado el 90 %, cosechar en horas de la mañana con la finalidad de evitar recolectar el néctar, una vez extraída la miel es aconsejable envasarla y sellarla herméticamente, además mantenerla en ambientes con baja humedad relativa. (Zandamela, 2008b, p.43). Su determinación se realiza mediante el uso de un refractómetro.

### *1.5.1.2 Azúcares reductores*

Parámetro útil para determinar características físicas de la miel como por ejemplo: índice de refracción, grado de cristalización, actividad de agua y con ello su tendencia a fermentar y el desarrollo de microorganismos. Es considerado como un parámetro indicativo de calidad ya que su concentración disminuye en procesos de sobrecalentamiento, adulteraciones y en procesos de extracción de miel inmadura. (Zandamela, 2008c, p.47).

### *1.5.1.3 Sacarosa*

El contenido de sacarosa en la miel nos permite determinar si existe adulteraciones o falsificaciones, en la norma estipula una concentración máxima permitida del 5 %, si existen cantidades superiores al valor mencionado se presume que a la miel se le incorporó azúcar de mesa o jarabe de azúcar. (Zandamela, 2008d, p.36)

### *1.5.1.4 Acidez libre*

El pH de la miel oscila entre un rango de 3,4 y 6,1 dependiendo del tipo de floración del que procede la miel, este factor va a depender de la concentración de ácidos que se encuentran en la miel, siendo el más representativo el ácido glucorónico. El pH de la miel brinda de cierto modo protección reduciendo la proliferación de microorganismos que puedan fermentar la miel. (Zandamela, 2008e, p.38). Se determina mediante el uso de un pH-metro.

### *1.5.1.5 Hidroximetilfurfural*

Es un parámetro muy importante que determina la calidad de la miel, puesto que es una sustancia no es propia de la miel, es decir no forma parte de su composición, se forma a partir de la degradación y deshidratación de la glucosa y principalmente de la fructosa, dicha degradación generalmente se produce por procesos de calentamiento de la miel y aumenta mucho más con el sobrecalentamiento en los procesos de pasteurización y en procesos para evitar la cristalización, su concentración también va a depender del tiempo y lugar de almacenamiento. Su medición se realiza mediante métodos espectrofotométricos. (Zandamela, 2008f, p.37)

### *1.5.1.6 Número de diastasa*

La diastasa es una enzima aportada por las abejas durante el proceso de maduración de la miel, tiene como función degradar el almidón a compuestos menos complejos, de ahí la importancia de

su concentración en la composición de la miel, además proporciona características típicas, como el olor, sabor y color. La diastasa es una enzima muy inestable al calor, razón por lo que es considerado como un parámetro de calidad, puesto que el calentamiento u sobrecalentamiento de la miel en procesos industriales genera una disminución muy considerable de la enzima, generando valores inferiores a lo estipulado en la normativa. Se determina mediante el uso del espectrofotómetro. (Zandamela, 2008g, p.35)

#### ***1.5.1.7 Sólidos insolubles en agua***

El contenido de sólidos insolubles se relaciona con la higiene utilizada durante el proceso de extracción y envasado de la miel. Durante los procedimientos antes mencionados es posible que la miel se contamine con partículas de cera, polen, polvo, tierra, etc., siendo el proceso de filtración importante para eliminar dichos residuos.

#### ***1.5.1.8 Cenizas***

Este parámetro está relacionado con la cantidad de sales minerales e impurezas presentes en la miel de abeja.

#### ***1.5.1.9 Conductividad eléctrica***

La conductividad eléctrica indica la capacidad que tiene la miel de abeja para dejar pasar la corriente eléctrica a través de ella, la concentración de sales minerales presentes en la miel aportan indirectamente a dicha propiedad. Este parámetro está relacionado con el contenido de cenizas a mayor cantidad de sales minerales mayor será la conductividad eléctrica. (Zandamela, 2008h, p.34)

### ***1.5.2 Parámetros microbiológicos***

La miel al igual que otros productos de origen natural presenta una flora microbiana propia. Presenta algunas bacterias y levaduras osmófilas, capaces de sobrevivir en un medio con condiciones extremas, por ejemplo la miel presenta una baja actividad de agua baja, un pH ácido y la presencia en pequeñas cantidades de peróxido de hidrogeno sustancia conocida por su propiedad antimicrobiana. Aun cuando la miel es considerada como un medio poco probable de proliferación de microorganismos, estos pueden desarrollarse por la manipulación inadecuada y la escasa higiene aplicada por parte de los apicultores en los procesos de extracción, envasado y almacenamiento del producto para lo cual se debe utilizar materiales limpios y desinfectados antes

de su utilización para garantizar la calidad de la miel y por ende la economía del apicultor. (Coll Cárdenas F et al., 2008a, pp. 30-31).

## **1.6 Alteraciones más comunes de la miel**

La recolección inadecuada, el tratamiento que se aplica durante el procesamiento y la forma de almacenamiento tanto del apicultor como del consumidor, son factores que influyen en la alteración de la miel de abeja generando como consecuencia incumplir los parámetros establecidos en la norma, además la miel puede sufrir alteraciones en su color, desarrollar sabores, olores extraños y pérdida del valor nutritivo.

Las alteraciones más frecuentes que puede presentar la miel de abejas son las siguientes:

### **1.6.1 Fermentaciones**

El grado de fermentación está determinado por la presencia de levaduras osmófilas en la miel, quienes son capaces de desdoblar el azúcar contenido en la miel, en ácidos orgánicos y alcohol etílico, este último responsable de la pérdida del sabor y color característico de la miel. (Coll Cárdenas et al., 2008b, p. 30). La cantidad y especies toleradas de microorganismos presentes en la miel se determinan en la norma NTE INEN 1572.

### **1.6.2 Cristalización**

La cristalización es un efecto natural que se produce en la miel de abeja. Existen varios factores que aceleran este proceso, como por ejemplo: la cantidad de azúcar y agua presente en la miel, la temperatura y tiempo de almacenamiento y la presencia de partículas extrañas. (Pérez y Jimeno, 1987a, p.5).

La temperatura sin duda es uno de los factores que más favorece la cristalización, a temperaturas frías, por debajo de los 10 °C disminuye la cristalización, mientras que temperaturas moderadas de entre 10 - 21 °C, generalmente la promueven. Temperaturas de 21 - 27 °C, disminuyen la cristalización pero degrada la miel y temperaturas muy altas sobre los 27 °C previenen la cristalización pero incentivan la fermentación y degradación de la miel de abeja. (Pérez y Jimeno, 1987b, p.6).

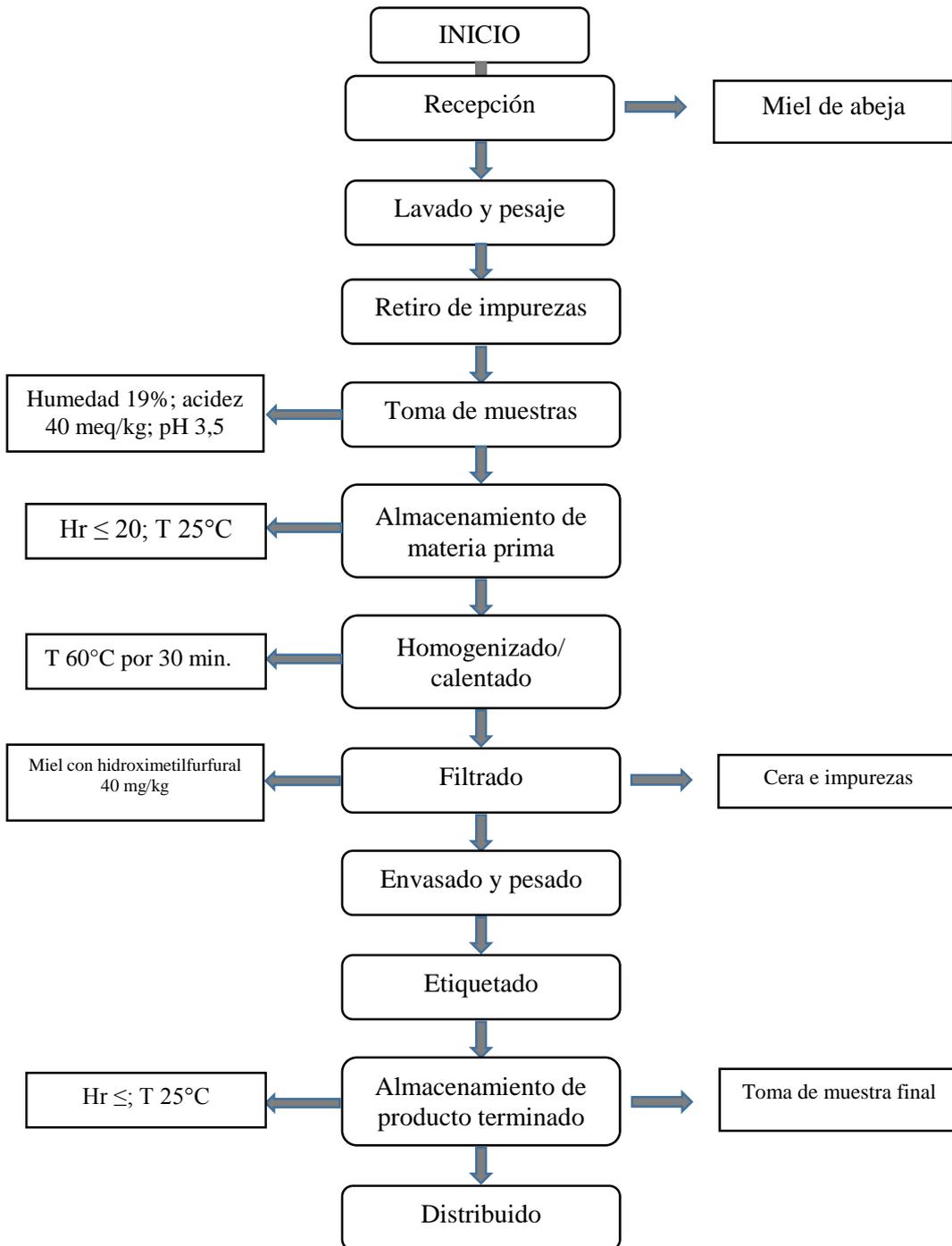
### ***1.6.3 Separación de fases***

Debido a la formación de cristales de glucosa estos tienden a separarse, precipitando en el fondo del recipiente, generando un aspecto heterogéneo.

### **1.7 Calentamiento de la miel**

Existen varias razones por las cuales el apicultor y en especial la industria apícola hacen uso de la temperatura y es que a través del calentamiento se logra obtener una miel más fluida y homogénea al momento de su envasado, si el caso amerita mezclar mieles de distinta procedencia, por lo que el calentamiento permite conseguir una miel agradable a la vista del consumidor. Además retrasa el proceso de cristalización.

### 1.8 Proceso de envasado a nivel industrial



**Figura 6-1: Diagrama de flujo del proceso de miel de abeja envasada (Toyva Eirl)**

Fuente: (Análisis de peligros y puntos críticos de control TOYVA, 2013)

Realizado por: Ruiz Danesa, 2018

## **1.9 Tratamiento térmico**

El empleo de tratamientos térmicos en la industria alimentaria tiene como finalidad la conservación de alimentos, siendo una de las principales causas para la formación de sustancias no propias del alimento dañinas para la salud denominadas como contaminantes químicos de procesado. En el caso de la miel, los parámetros influenciados directamente por la temperatura y el tiempo de calentamiento son: el hidroximetilfurfural y el número de diastasa, es así que una cantidad superior a 40 mg/kg para hidroximetilfurfural y menos de ocho en la escala de Goethe para el número de diastasa, indican que la miel no se encuentra en buen estado. (Valega, 2005a)

Los azúcares de la miel, al igual que otros componentes, se ven afectados negativamente por un almacenamiento prolongado a temperaturas superiores a 27°C y por un tratamiento térmico superior a 75°C, en estas condiciones pierde actividad enzimática; disminuye su acción antibiótica; se reduce el sabor y olor debido a la pérdida de sus compuestos volátiles y, además hay un aumento de hidroximetilfurfural. (Hernández et al., 2013, p.11).

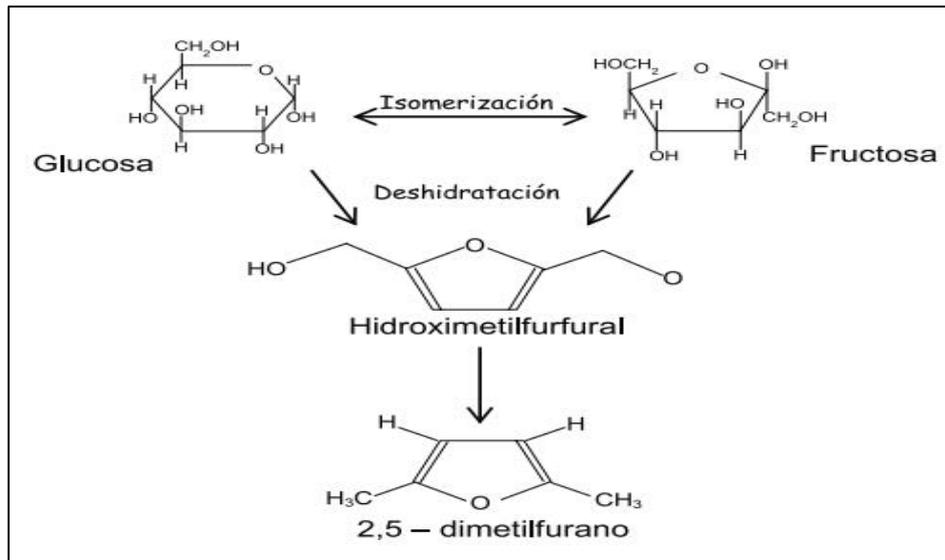
## **1.10 Parámetros indicativos del sobrecalentamiento**

### ***1.10.1 Hidroximetilfurfural***

El hidroximetilfurfural (HMF) se forma a partir de la degradación de los azúcares presentes en la composición de la miel, en particular por deshidratación de la fructosa. La presencia de HMF está relacionada con alteraciones de color, aparición de sabores y olores extraños. Estos factores hacen que la concentración del aldehído sea considerado uno de los parámetros de calidad a tener en cuenta, concretamente en la miel. (Subovsky et al., 2004a, p.33)

Este compuesto aparece en forma espontánea y natural en la miel debido a las altas temperaturas del interior de la colmena, al pH ácido de la miel, a la cantidad de agua y a la composición rica en monosacáridos (fructosa y glucosa), aumentando su concentración con el tiempo de almacenamiento. (Subovsky et al., 2004, p.35)

El hidroximetilfurfural es considerado como una sustancia tóxica para la salud, existen estudios experimentales en animales que evidencian acción cancerígena. Sin embargo a nivel industrial a partir de la deshidratación de azúcares, se utiliza al hidroximetilfurfural para la obtención de productos químicos intermedios renovables como el 2,5-dimetil furano. (Jiménez, 2016a, p. 12)



**Figura 7-1: Reacción de deshidratación de glucosa y fructosa para la formación del HMF**

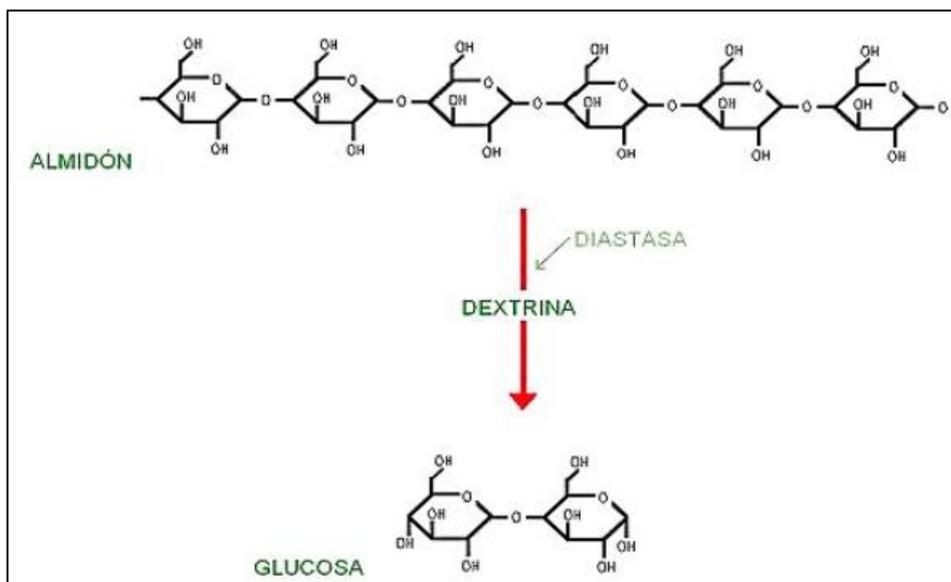
Fuente: (Jiménez, 2016b)

### 1.10.2 Número de diastasa

La determinación de enzimas de la miel está adquiriendo cada vez mayor importancia como una forma de valorar su calidad. Una de las enzimas que marca la calidad de la miel es la diastasa, cuya determinación es analítica, la enzima es degradada por el calentamiento o envejecimiento de la miel. (Polaino, 2006, p. 214)

Es una enzima más sensible al calor que la amilasa de la miel, lo cual constituye una prueba importante para ver si las mieles han sufrido sobrecalentamiento. Se destruye calentando una solución de miel al 50% durante cinco minutos a 100 °C, diez minutos a 80°C, o treinta minutos a 56°C. (Mazariegos, 2006, p.13).

La diastasa conocida también como  $\alpha$ -amilasa, tiene como función hidrolizar el almidón a dextrinas y/o azúcar, tal como se observa en el figura 8-1.



**Figura 8-1: Hidrólisis del almidón por acción de la diastasa**

Fuente: (Casallas et al., 2015)

### 1.10.3 Vitamina C

Vitamina C o ácido ascórbico es un nutriente, toma un papel importante en el funcionamiento del organismo, ayuda en el proceso de la cicatrización, fortalece el sistema inmunitario, actúa como antioxidante. Es inestable por lo que se degrada fácilmente cuando se someten las frutas y verduras que la contienen a calentamiento. (Naturimport, 2017a)

La dosis diaria que se debe consumir oscila entre 75 y 90 mg, esta vitamina se encuentra generalmente en cítricos, aunque también se lo encuentra en otros alimentos. La miel de abeja también contiene cierta cantidad de vitamina C, aproximadamente 0,5 mg por 100 g de miel. (Naturimport, 2017b)

#### 1.10.3.1 Condiciones de operación en HPLC

Es necesario establecer las condiciones adecuadas y óptimas que faciliten la determinación de vitamina, para ello se debe seleccionar el tipo de columna de acuerdo a las características de la sustancia a analizar. Para las sustancias con un peso molecular menor a 200 como es el caso de la vitamina C y soluble en agua e iónica se utiliza columnas en modo de fase reversa con sílice sin tratar, este tipo de columnas permite una adecuada retención de pequeños analitos polares, altamente sensible. La columna más utilizada es la Hypersil C<sub>18</sub>. (Agilent, 2015).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Tipo y diseño de la investigación

##### 2.1.1 *Tipo de investigación*

La investigación realizada es de tipo descriptiva y aplicativa porque se dirige a desarrollar una metodología basada en conocimientos y técnicas ya existentes que buscan lograr el objetivo de determinar la temperatura y el tiempo que harán que la miel de abeja cumpla con la norma NTE INEN 1572, al determinar indicadores como la concentración de HMF, número de diastasa y concentración de vitamina C.

##### 2.1.2 *Diseño de la investigación*

El estudio tiene un diseño con pos-prueba y grupo de control.

RG1 X O1

RG2 X O2

RG3 X O3

RG4 X O4

RG5 – O5

R = hay aleatoriedad

G = grupo de tratamiento

X = tratamiento

O = medición del tratamiento

## 2.2 Operacionalización Conceptual

**Tabla 1-2:** Operacionalización conceptual

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	CONCEPTO
Temperatura	Independiente	Valores de temperatura de 30, 60, 80 y 90 °C que fueron aplicados a la miel de abeja pura, bajo la metodología de tratamiento térmico diseñada.
Tiempo	Independiente	Cada temperatura aplicada a la miel de abeja pura, se realizó en tiempos de 15, 30 y 60 minutos.
Parámetros normados (norma NTE INEN 1572) afectados por el tratamiento térmico	Dependiente	Los principales parámetros normados que se consideraron son hidroximetilfurfural, número de diastasa, vitamina C parámetros indicativos del calentamiento.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

## 2.3 Operacionalización Metodológica

**Tabla 2-2:** Operacionalización metodológica

VARIABLE	CATEGORIAS	INDICADOR	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS/ FUENTES DE VERIFICACION
Temperatura	Implementación de una metodología para aplicar el tratamiento térmico.	Equipo: material, volumen, espesor del recipiente, fuente de calor	Construcción manual según el diseño programado	Información bibliográfica
		Volumen de miel	Medidor de volumen	-----
	Ejecución de los tratamientos térmicos (30, 60, 80 y 90) °C.	Temperatura	Control de temperatura	Baño María con termómetro
Tiempo	Aplicación de los tratamientos térmicos a 15, 30 y 60 minutos	Tiempo	Control de tiempo (15, 30 y 60 min.)	Cronómetro
Afectación de parámetros normados por efecto del tratamiento térmico	Análisis de las mieles sometidas a los distintos tratamientos térmicos, de los parámetros normados: hidroximetilfurfural, número de diastasa y vitamina C	Concentración de hidroximetilfurfural	Norma INEN 1572	NTE INEN 1637
		Número de diastasa	Norma INEN 1572	NTE INEN 1638
		Concentración de vitamina C	Cromatografía líquida de alta resolución	Información bibliográfica
	Interpretación de resultados obtenidos en los tratamientos térmicos.	Resultados	Tratamiento estadístico	Software estadístico

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

## 2.4 Materiales, equipos y reactivos

### 2.4.1 *Materiales de laboratorio*

**Tabla 3-2:** Lista de materiales de laboratorio utilizados.

<b>Análisis</b>	<b>Materiales</b>
Determinación de hidroximetilfurfural	Vasos de precipitación de 50 y 100 mL
	Agitador
	Balón de aforo de 50 mL
	Pipeta volumétrica de 5 mL
	Embudo
	Trípode
	Papel filtro
	Tubos de ensayo
	Gradilla
Determinación de número de diastasa	Vasos de precipitación de 50 mL
	Balón aforado de 25 mL
	Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL
	Tubos de ensayo
	Gradilla
Determinación de vitamina C	Balones de aforo de 50 mL
	Vasos de precipitación de 500 y 50 mL
	Viales para HPLC
	Filtro
	Jeringuilla de 5 mL
	Frascos ámbar
Análisis físico-químico	Cápsulas de porcelana
	Reverbero

	Crisol de Gosh
	Vasos de precipitación de 250 mL
	Agitador
	Pinza para cápsula
	Termómetro

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

## 2.4.2 Equipos

**Tabla 4-2:** Lista de equipos de laboratorio utilizados.

Análisis	Equipo
Determinación hidroximetilfurfural	Espectrofotómetro UV-Visible
Determinación de número de diastasa	Baño María
	Espectrofotómetro UV-Visible
Determinación de vitamina C	Baño María
	Equipo de filtración
	Bomba de vacío
	HPLC
Análisis físico-químico	Estufa
	Desecador
	Balanza
	Baño María
	Espectrofotómetro
	pH-metro
	Refractómetro
	Conductímetro

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

### 2.4.3 Reactivos

**Tabla 5-2:** Lista de reactivos utilizados.

Análisis	Reactivo
Determinación hidroximetilfurfural	Ferrocianuro de potasio 15%
	Acetato de zinc 30%
	Bisulfato de sodio 0,2%
Determinación de número de diastasa	Solución de yodo 0,0007 N
	Acetato de sodio pH 5,3
	Cloruro de sodio 0,5 M.
	Solución de almidón
Determinación de vitamina C	Solución de ácido ascórbico 5 ppm
	Ácido fosfórico 0,5 M
	Acetonitrilo 50%
	Agua bidestilada
Análisis físico-químico	Ácido acético 0.05 N
	Ácido clorhídrico 0.05 N
	Solución Fehling A y B
	Azul de metileno 0,2%
	Solución patrón de azúcar invertido
	Hidróxido de sodio 1 N
	Hidróxido de amonio (NH <sub>4</sub> OH)
	Cloruro de bario (BaCl)
	Alumbre (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 24H <sub>2</sub> O)

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

## **2.5 Localización del experimento**

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de los siguientes laboratorios pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Laboratorio de Bioquímica
- Laboratorio de Bromatología
- Laboratorio de Análisis Instrumental
- Laboratorio de Investigaciones

Además se contó con la colaboración de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo (ASOPROACH) y el grupo de investigación SAGID de la ESPOCH.

### **a. Unidad experimental**

El análisis del tratamiento térmico se efectuó en una miel de abeja genuina cosechada el 20 de marzo del presente año.

### **b. Selección de muestra**

Para asegurar confiabilidad en los resultados sobre la afectación térmica se consideró importante trabajar con un solo apicultor que nos asegure una muestra de miel genuina sin tratamientos previos de ninguna índole, teniendo que administrar la existencia y la obtención de miel de abeja según el tiempo de cosechas con los apicultores.

## **2.6 Manejo específico del experimento**

El estudio de afectación térmica se realizó con miel genuina provista de un solo apicultor socio de ASOPROACH, la afectación térmica fue observada sobre una metodología experimental diseñada de tratamiento térmico, donde se efectuó cuatro tratamientos térmicos a temperatura de 30 °C, 60 °C, 80 °C y 90 °C con tiempos de 15, 30 y 60 minutos para cada variación de temperatura, a un volumen de 300 mL de miel de abeja genuina, la afectación térmica se valoró realizando un control de la concentración de HMF, número de diastasa. El objetivo fue determinar el punto en el que tanto la temperatura y tiempo, con la metodología experimental de tratamiento térmico propuesta cumpla las especificaciones normadas en los parámetros propuestos para valorar la afectación térmica de la miel. Al final se analizó e interpretó estadísticamente los resultados obtenidos para comprobar la hipótesis planteada. Con el valor de temperatura y tiempo

del mejor tratamiento térmico, se trató a una sola miel seis veces analizando cada repetición la concentración de vitamina C. El análisis físico-químico y microbiológico se realizó en una sola muestra de miel tratado con el mejor tratamiento térmico y a temperatura ambiente, para comprobar el grado de afectación térmica. Las especificaciones de los parámetros mencionados son los establecidos en la norma INEN 1572. Se redactó y socializó los resultados obtenidos.

### 2.6.1 Factores en estudio

**Tabla 6-2:** Descripción de factores y niveles de estudio.

Factor	Descripción del factor	Descripción del nivel	Nivel
A	Tiempo	15 min. 30 min. 60 min.	a1 a2 a3
B	Temperatura	30 °C 60 °C 80 °C 90 °C Control	b1 b2 b3 b4 bc*
* bc = temperatura ambiente (aprox. 18 °C)			

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

Fuente: Análisis de laboratorio

### 2.6.2 Tratamientos térmicos para miel genuina

La investigación tiene un diseño experimental A \* B con tres repeticiones

**Tabla 7-2:** Tratamientos experimentales realizados.

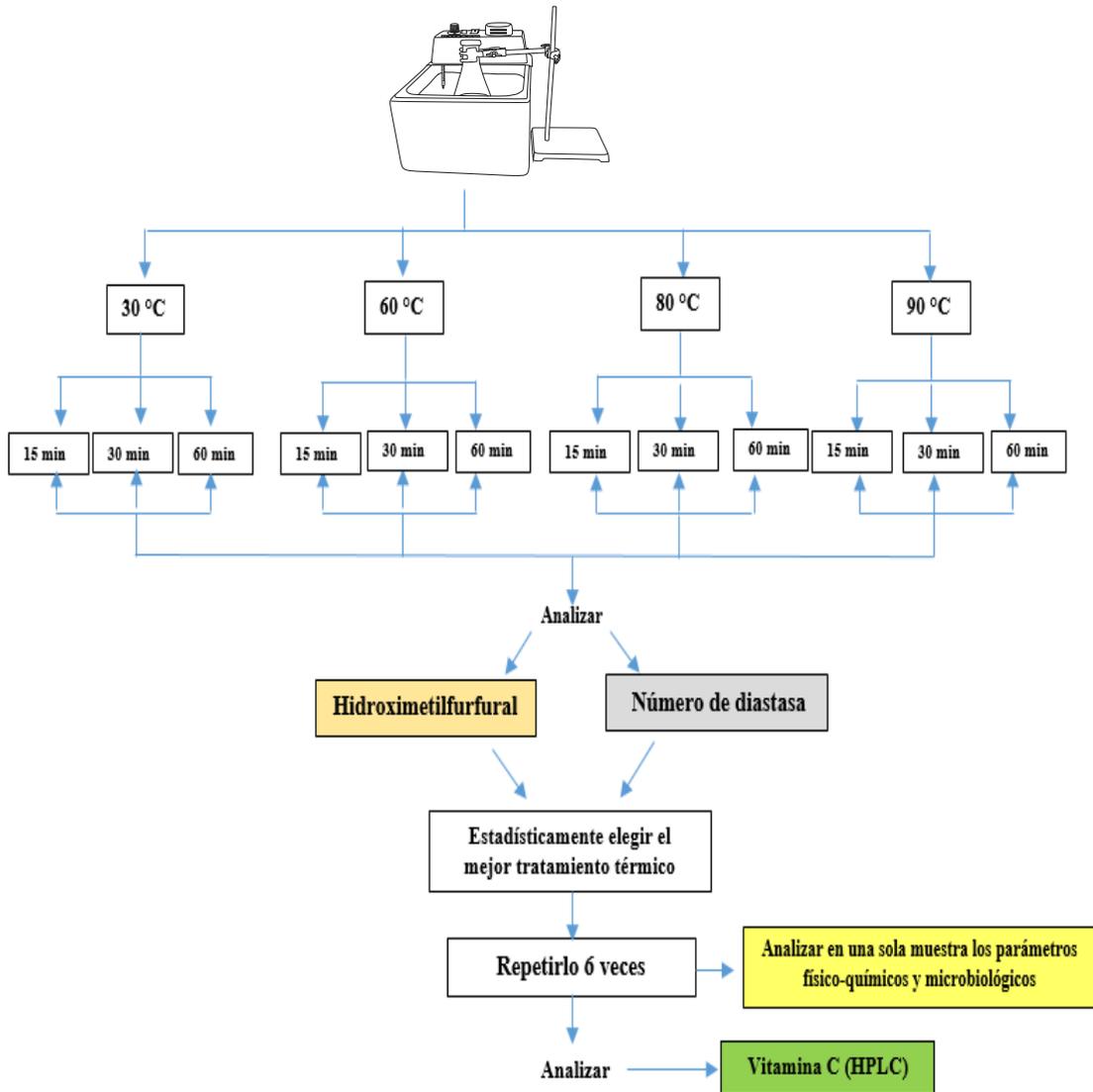
Tratamientos AxB 3X4=12	Tratamientos / repetición	r1	r2	r3
1	a1b1			
2	a1b2			
3	a1b3			
4	a1b4			
5	a2b1			
6	a2b2			
7	a2b3			
8	a2b4			
9	a3b1			
10	a3b2			
11	a3b3			
12	a3b4			
Control	bc*			

\* bc = temperatura ambiente (aprox. 18 °C)

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

## Esquema de tratamientos térmicos experimentales e indicadores pertinentes utilizados.



**Figura 1-2: Descripción de la metodología realizada**

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

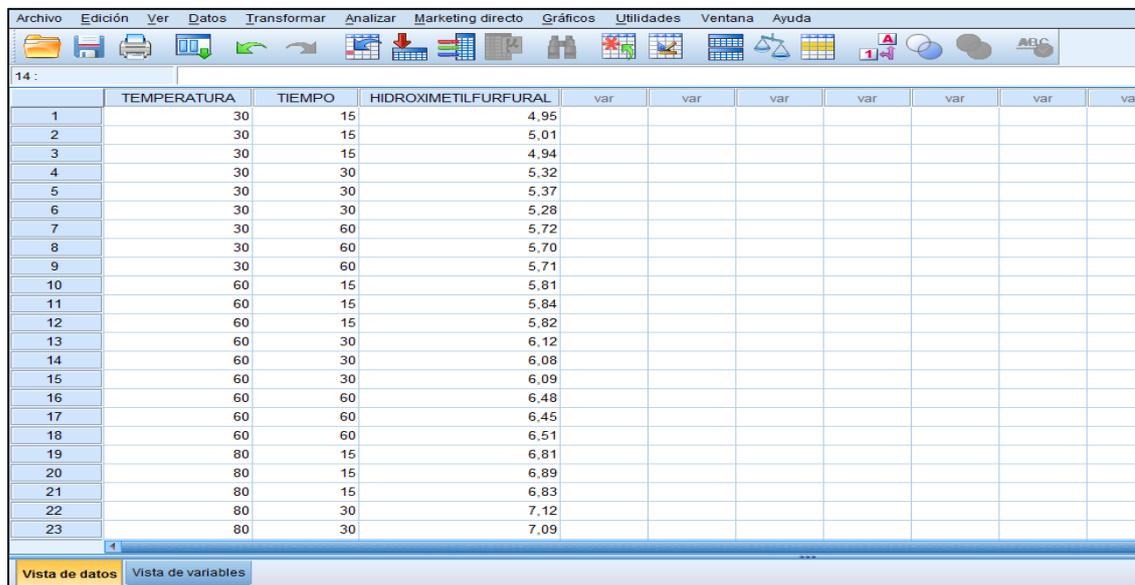
### 2.7 Hipótesis de la investigación

El tratamiento térmico de la miel de abeja pura afecta los valores normados de la concentración de hidroximetilfurfural y número de diastasa.

## 2.8 Análisis estadístico

Los resultados generados en la investigación se trataron estadísticamente en el software SPSS v.21 para valorar la diferencia entre medias de los distintos tratamientos y comprobar de esa manera la hipótesis planteada.

- Se procedió a ingresar los resultados experimentales de las variables consideradas para el tratamiento térmico, resultados de la concentración de hidroximetilfurfural y resultados del número de diastasa:



	TEMPERATURA	TIEMPO	HIDROXIMETILFURFURAL	var						
1	30	15	4,95							
2	30	15	5,01							
3	30	15	4,94							
4	30	30	5,32							
5	30	30	5,37							
6	30	30	5,28							
7	30	60	5,72							
8	30	60	5,70							
9	30	60	5,71							
10	60	15	5,81							
11	60	15	5,84							
12	60	15	5,82							
13	60	30	6,12							
14	60	30	6,08							
15	60	30	6,09							
16	60	60	6,48							
17	60	60	6,45							
18	60	60	6,51							
19	80	15	6,81							
20	80	15	6,89							
21	80	15	6,83							
22	80	30	7,12							
23	80	30	7,09							

**Figura 2-2: Ingreso de datos para la determinación de la concentración de HMF**

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

	TEMPERATURA	TIEMPO	DIASTASA	var						
1	30	15	9.62							
2	30	15	9.45							
3	30	15	9.52							
4	30	30	8.91							
5	30	30	8.99							
6	30	30	8.81							
7	30	60	7.47							
8	30	60	7.42							
9	30	60	7.50							
10	60	15	7.73							
11	60	15	7.79							
12	60	15	7.71							
13	60	30	6.51							
14	60	30	6.64							
15	60	30	6.54							
16	60	60	4.85							
17	60	60	4.99							
18	60	60	4.93							
19	80	15	3.45							
20	80	15	3.37							
21	80	15	3.33							
22	80	30	2.93							
23	80	30	2.92							

**Figura 3-2: Ingreso de datos para la determinación del número de diastasa.**  
 Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

- Se procedió asignar nombres de variables a los datos ingresados:

	Nombre	Tipo	Anchura	Decimales	Etiqueta	Valores	Perdidos	Columnas	Alineación	Medida	Rol
1	TEMPERATURA	Numérico	8	0		Ninguna	Ninguna	8	Derecha	Escala	Entrada
2	TIEMPO	Numérico	8	0		Ninguna	Ninguna	8	Derecha	Escala	Entrada
3	HIDROXIMETILFURFURAL	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	Derecha	Escala	Entrada

**Figura 4-2: Ingreso de variables de temperatura, tiempo y concentración de HMF**  
 Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

	Nombre	Tipo	Anchura	Decimales	Etiqueta	Valores	Perdidos	Columnas	Alineación	Medida	Rol
1	TEMPERATURA	Numérico	8	0		Ninguna	Ninguna	11	Derecha	Escala	Entrada
2	TIEMPO	Numérico	8	0		Ninguna	Ninguna	11	Derecha	Escala	Entrada
3	DIASTASA	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	11	Derecha	Escala	Entrada

**Figura 5-2: Ingreso de variables de temperatura, tiempo y número de diastasa.**  
 Realizado por: Ruiz Danesa

- Se analizó los resultados con un modelo lineal general univariante, para comparar la concentración de hidroximetilfurfural y número de diastasa, como variables dependientes en relación a la temperatura y tiempo de los distintos tratamientos experimentales.
- Se seleccionó un modelo personalizado para factores y covariables. Se ejecutó una prueba Post hoc, utilizando la prueba de Tukey-b, asumiendo varianzas iguales.
- El procedimiento del análisis descrito anteriormente generó los efectos inter-sujetos, separadamente para el monitoreo de hidroximetilfurfural y del número de diastasa.

## **2.9 Técnicas utilizadas para valorar la alteración térmica**

### **2.9.1 *Determinación de hidroximetilfurfural (NTE INEN 1637)***

#### **Fundamento:**

Detectar mediante espectrofotometría la presencia del aldehído hidroximetilfurfural (HMF) en la miel de abeja, mismo que se forma de la degradación de glucosa y fructosa.

Parámetro indicativo del sobrecalentamiento y frescura de la miel, su análisis es útil para determinar el grado de calentamiento y el tiempo de almacenamiento.

#### **Procedimiento:**

- Disolver 5 g de miel con 25 mL de agua.
- Trasvasar a un balón aforado de 50 mL.
- Adicionar 0,5 mL de ferrocianuro de potasio y 0,5 mL de acetato de sodio con agitación en cada adición.
- Aforar y filtrar desechando los primeros 10 mL.
- Colocar 5 mL de la solución de miel en dos tubos de ensayo, a un tubo agregar 5 mL de agua (muestra), al segundo tubo agregar 5 mL de bisulfito de potasio (referencia).
- Medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible tanto el tubo de la muestra como el de referencia a una longitud de onda de 284 y 336 nm respectivamente.

**Cálculo:**

El contenido de hidroximetilfurfural se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg hidroximetilfurfural (HMF) } 100\text{g de miel} = \frac{(A_{284} - A_{336}) * 14,97 * 5}{\text{g muestra}}$$

**Dónde:**

A284 = absorbancia de la muestra a 284 nm.

A336 = absorbancia de la muestra a 336 nm.

Factor = 14,97

**2.9.2 Número de diastasa (NTE INEN 1638)****Fundamento:**

Se basa en la decoloración que sufre el almidón en presencia de esta enzima. La solución de almidón se adiciona a la muestra de miel, produciéndose la hidrólisis enzimática, que se determina por el agregado de solución de yodo, el que produce coloración con el remanente de almidón no hidrolizado.

Su análisis sirve para evidenciar el nivel de sobrecalentamiento de la miel de abeja.

**Procedimiento:**

- Pesar 5 g de miel de abeja y disolver en 10 mL de agua.
- Adicionar 2,5 mL de solución tampón (pH 5,3).
- Agitar y trasvasar a un balón aforado de 25 mL que contiene 1,5 mL de NaCl 0,05 M.
- Colocar en un vaso de precipitación 10 mL de la solución de miel y en otro vaso 5 mL de solución de almidón.
- Colocar los dos vasos en Baño María a 40 °C por 15 minutos.
- Transcurrido el tiempo mezclar la solución de almidón en la solución de miel, tomar el tiempo a partir de ese momento.
- Luego de 5 minutos tomar 1 mL de la solución y colocar en un tubo con 10 mL de solución diluida de yodo.

- Realizar la dilución con agua y medir la absorbancia a 660 nm, repetir el proceso cada 5 minutos, hasta obtener una absorbancia menor a 0,235.

**Cálculo:**

Leer el tiempo de reacción correspondiente a la absorbancia de 0,235 y luego aplicar la siguiente ecuación:

$$ND = \frac{300}{t}$$

**Dónde:**

**ND** = Número de diastasa; este número expresa la actividad de la diastasa en ml de solución de almidón al 1 por ciento hidrolizada por la enzima contenida en 1 g de miel, en una hora, a 40°C.

**t** = tiempo de reacción correspondiente a la absorbancia de 0,235, en minutos.

### 2.9.3 *Vitamina C*

**Fundamento:**

Mediante el uso del equipo de HPLC, determinar la concentración existente de vitamina C en miel de abeja genuina y miel tratada térmicamente en una muestra tratada experimentalmente. Útil para determinar la concentración de Vitamina C en la miel de abeja.

Para el análisis se utilizó el equipo de HPLC marca SHIMADZU (Inyector automático: SIL-10A/10Ai; Sistema controlador: SCL-10A vp; Cromatógrafo líquido: LC-10Ai; Programador de bomba: FCV-10AL vp; Columna oven: CTU-10A vp; Detector UV-Visible: SPP-10AVi). En las siguientes condiciones de operación.

**Tabla 8-2:** Condiciones de operación para la cuantificación de vitamina C

<b>Fase móvil</b>	Ácido fosfórico 0,05 M
<b>Fase estacionaria</b>	Hypersil C <sub>18</sub> 5 um 120 A° (4,6 * 150 nm)
<b>Vol. inyección</b>	10 uL
<b>Longitud de onda</b>	2,59 nm
<b>Temperatura</b>	30 °C
<b>Flujo</b>	1 mL/min.
<b>AUSF</b>	0,00010
<b>D</b>	Lamp.

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

Fuente: Análisis de laboratorio de Investigaciones. ESPOCH. 2018

Debido a la poca cantidad de vitamina C que contiene la miel de abeja (0,5 mg/100 g), no se pudo efectuar la lectura en el equipo, motivo por el que se realizó una investigación direccionada, adicionando experimentalmente a una muestra de miel genuina una cantidad conocida de la vitamina C (1,5 mg/mL), con la finalidad de estimar el nivel de degradación de la concentración de vitamina C real, cuando la miel es sometida al mejor tratamiento térmico obtenido.

### **Procedimiento**

*Preparar las siguientes soluciones:*

- Ácido fosfórico 0,05 M (colocar 3,4 mL en 1000 mL de agua bi-distilada)
- Solución patrón de ácido ascórbico (vitamina C) de 5ppm (pesar 0,075 g de ácido ascórbico y disolver en 50 mL de ácido fosfórico 0,05 M)
- Solución de acetonitrilo 50% (para limpiar la columna)

### **Preparación de la muestra de miel**

*Miel de abeja sin tratamiento térmico*

- Adicionar a 300 mL de miel, 1 mL solución patrón de ácido ascórbico (vitamina C) y homogenizar.

- Disolver en ácido fosfórico 5 g de muestra y aforar a un volumen de 50 mL con el mismo ácido fosfórico.
- Finalmente se realizar la lectura en el HPLC.

#### *Miel de abeja tratada térmicamente*

- Agregar 1 mL de la solución patrón de ácido ascórbico (vitamina C) a 300 mL de miel de abeja.
- Mezclar y someter la muestra a 30 °C por 15 minutos.
- Disolver 5 g de la muestra en ácido fosfórico 0,05 M y aforar en un balón de 50 mL.
- Finalmente efectuar la lectura en el cromatógrafo.

#### **Cálculo**

El cálculo de la concentración de vitamina C en la miel de abeja se efectuó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{ST}}{A_M} = \frac{C_{ST}}{C_M} \Rightarrow C_M = \frac{C_{ST} * A_M}{A_{ST}}$$

#### **Dónde:**

$A_{ST}$  = área del pico de la solución estándar

$A_M$  = área del pico de la muestra

$C_{ST}$  = concentración de la solución estándar

$C_M$  = concentración de la muestra

#### **2.10 Técnicas adjuntas para el complemento de análisis de miel**

- Contenido de Humedad (NTE INEN 1632)
- Contenido de Azúcares reductores totales (NTE INEN 1633)
- Sacarosa Aparente (NTE INEN 1633)
- Acidez Total (NTE INEN 1634)
- Contenido de cenizas (NTE INEN 1636)
- Sólidos insolubles (NTE INEN 1635)
- Conductividad Eléctrica (NTE INEN 1572)
- Mohos y levaduras (NTE INEN 1529)

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

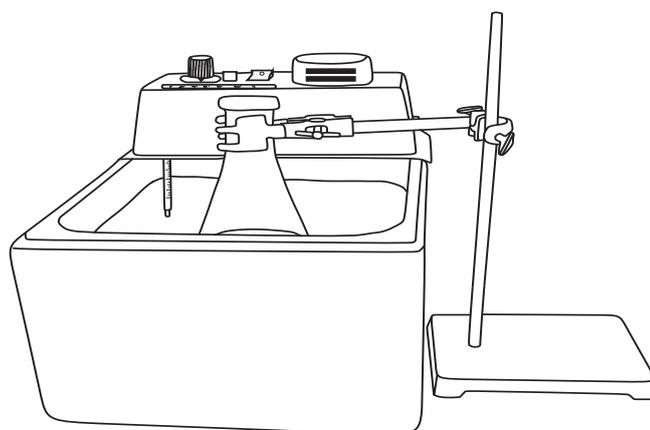
#### 3.1 Miel genuina de abeja para el estudio

El trabajo experimental de la investigación se desarrolló con aproximadamente 6 litros de miel de abeja cosechada tres días antes de la entrega por parte de un apicultor de la asociación de ASOPROACH, para asegurar una misma miel en las distintas repeticiones.

#### 3.2 Diseño de la metodología experimental para el tratamiento térmico.

##### 3.2.1 *Equipo experimental diseñado para tratamientos térmicos*

El equipo para los tratamientos térmicos a nivel de laboratorio consta de: un Baño María termostático, un Erlenmeyer de 500 mL con especificaciones definidas (tabla 1-3 y 2-3), y unificadas para todos los tratamientos térmicos realizados en la investigación y que deben ser obligatorias en el caso de ser necesario replicar el estudio. El Erlenmeyer deberá estar sumergido en el baño María sostenida por la pinza del soporte universal, el cual llevara la miel en la cantidad y forma que se indica en el procedimiento descrito (3.2.2). Se debe disponer de un termómetro móvil para medir la temperatura que se controlara según el procedimiento, el esquema de equipo se observa a continuación. Se debe indicar que a partir de los resultados de temperatura y tiempo obtenidos experimentalmente en este equipo se utilizaron para el equipo domestico propuesto, con los cuidados anotados en el procedimiento correspondiente (3.8.1).



**Figura 1-3:** Equipo experimental de tratamiento térmico

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

**Tabla 1-3:** Especificaciones del baño María termostático utilizado.

ESPECIFICACIÓN	MEDIDA
Marca	YCW-04M GEMMY
Capacidad de agua	11 litros
Volumen de agua utilizada	5 litros
Temperatura mínima que marca el equipo	25 °C
Temperatura máxima que marca el equipo	100 °C

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Fuente:** Análisis de laboratorio

**Tabla 2-3:** Especificaciones del Erlenmeyer utilizado experimentalmente.

ESPECIFICACIÓN	DIMENSIONES
Marca	JNS (borosilicate GG-17)
Volumen	500 mL
Espesor	0,22 mm
Diámetro externo de la base	10,14 cm
Ángulo de base	80 °

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

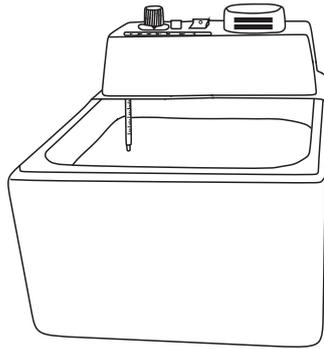
**Fuente:** Análisis de laboratorio

### **3.2.2 Propuesta de la metodología experimental diseñada para el tratamiento térmico.**

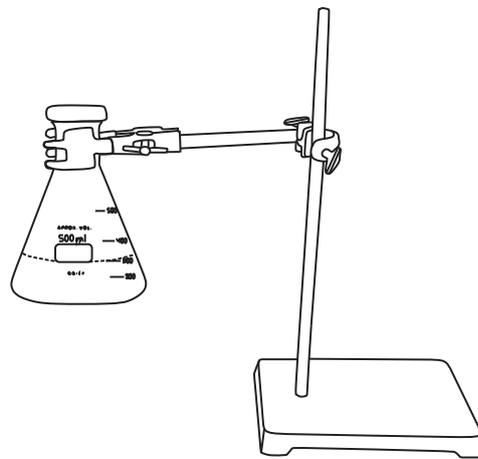
Para el tratamiento térmico se debió usar el equipo experimental diseñado (figura 1-3).

#### **Procedimiento:**

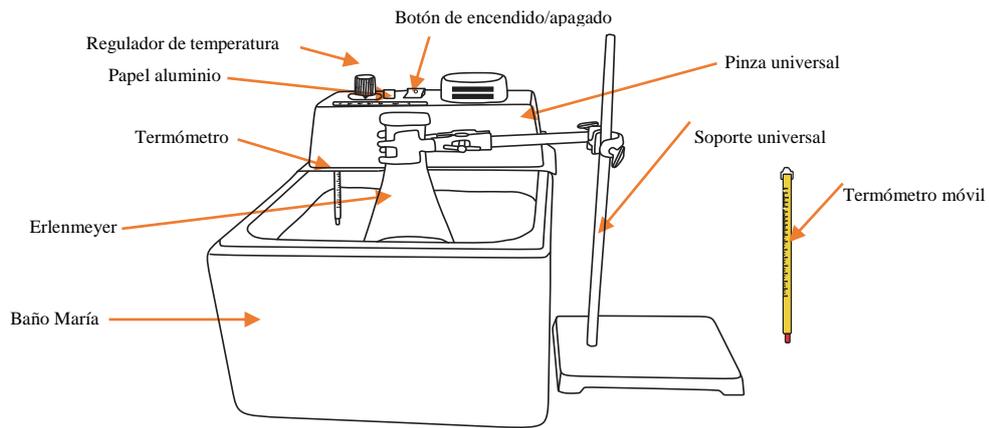
1. Colocar 5 litros de agua destilada (o la cantidad adecuada) en el equipo de Baño María termostático y regular la *temperatura deseada de tratamiento térmico* programado.



2. Añadir 300 mL de miel de abeja en el Erlenmeyer, tapar con papel aluminio (*obligatorio*) y luego sujetar con la pinza universal al soporte.



3. Cuando el agua del baño María haya alcanzado la *temperatura deseada de tratamiento térmico*, introducir el Erlenmeyer con miel, es "*obligatorio*" que el nivel del agua del baño exterior este al mismo nivel de la miel contenida en el Erlenmeyer.  
Con la ayuda de un termómetro medir la temperatura de la miel, una vez que la miel alcanza la temperatura del baño externo (*obligatorio*), corre el inicio del tiempo de tratamiento térmico.



Debe existir una distancia prudencial entre la base del Erlenmeyer y la base del equipo baño María (*obligatorio el no contacto con el fondo del baño*).

### 3.3 Resultado de los tratamientos térmicos experimentales y sus indicadores.

Una vez diseñada la metodología, se procedió a realizar los tratamientos térmicos programados para la miel de abeja (factores y niveles de la tabla 3-2) y el respectivo análisis de la concentración de hidroximetilfurfural y número de diastasa, parámetros indicativos de sobrecalentamiento en la miel.

#### 3.3.1 Resultados promedios de la determinación de concentración de hidroximetilfurfural (HMF) de los tratamientos térmicos.

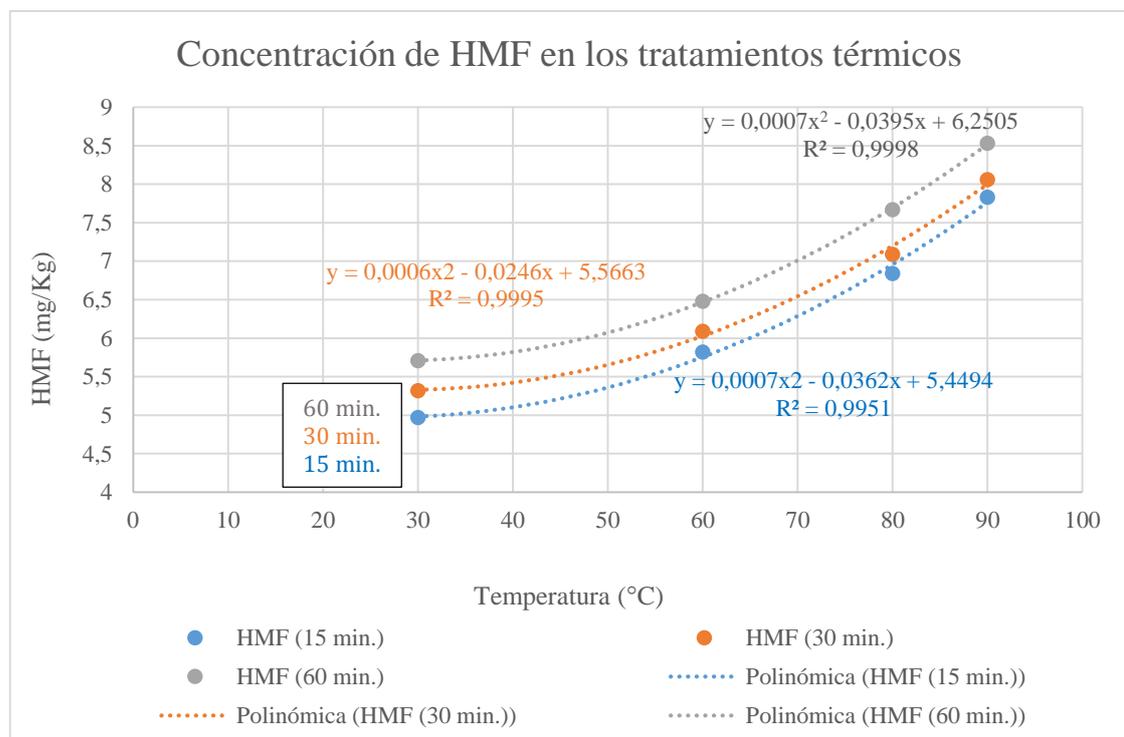
**Tabla 3-3:** Concentración promedio de hidroximetilfurfural en la miel de abeja sometida a los diferentes tratamientos térmicos.

Valor de referencia HMF: hasta 40 mg/kg (INEN 1572)			
CONTROL (Miel a temperatura ambiente): 4,72 mg/kg			
T°/Tiempo	15 minutos	30 minutos	60 minutos
30 °C	4,97	5,32	5,71
60 °C	5,82	6,09	6,48
80 °C	6,84	7,09	7,67
90 °C	7,83	8,06	8,53

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

Uno de los problemas que enfrenta el apicultor al momento de comercializar la miel, es su rápida cristalización, recurriendo a calentarla a temperaturas altas para mantenerla en estado líquido, el someter la miel al calor afecta negativamente las propiedades nativas, alterando principalmente la concentración de los parámetros indicativos de sobrecalentamiento como lo son el hidroximetilfurfural y número de diastasa. La formación de hidroximetilfurfural se debe a la degradación de carbohidratos, en el caso de la miel se debe por la descomposición y deshidratación de glucosa y fructosa cuando es sometida a calentamiento, razón por lo que es considerado como un factor fundamental para establecer la calidad de la miel. (Subovsky et al., 2004a, p.33)

En la tabla 3-3, se observa que todos los valores para el hidroximetilfurfural se encuentran dentro del valor de referencia (40 mg/kg), establecido en la norma INEN 1572, su concentración tiende a incrementar a medida que se aplica a la miel mayor temperatura y más aun a tiempos prolongados. El hidroximetilfurfural no es una sustancia propia de la miel sin embargo la muestra control (miel a temperatura ambiente) presentó una concentración de 4,72 mg/k, este valor puede deberse a que la miel fue cosechada a una temperatura ambiente de 18 a 20 °C, se sabe también que la temperatura en los panales puede alcanzar los 35 °C.



**Gráfico 1-3: Comparación de la concentración de hidroximetilfurfural entre los diferentes tratamientos térmicos.**

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

Un estudio realizado por Ana Correa sobre la “Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas”, (Ana Correa, 2015), demuestra que aun cuando se aplica temperaturas de 65 y 80 °C por una hora, el contenido de HMF se mantiene por debajo del valor máximo permitido, corroborando con los resultados obtenidos, debido a que en esta investigación la miel sometida a 90 °C por 60 minutos (mayor temperatura y tiempo), presentó valores aceptables de hidroximetilfurfural cumpliendo con la normativa. Sin embargo el tratamiento térmico correspondiente a 30 °C por 15 minutos presenta una concentración de HMF muy por debajo de los demás tratamiento, tal como se observa en el gráfico 1-3, acercándose al valor de la muestra control, por esta razón se lo consideró como el mejor tratamiento térmico para ser aplicado en la miel de abeja.

### 3.3.2 *Resultados promedios de la determinación del número de diastasa de los tratamientos térmicos.*

**Tabla 4-3:** Contenido promedio del número de diastasa en la miel de abeja sometida a los diferentes tratamientos térmicos.

<b>Valor de referencia:</b> mínimo 8 unidades Gothe (INEN 1572)			
<b>CONTROL (Miel a temperatura ambiente):</b> 10,28 unidades Gothe			
<b>T°/Tiempo</b>	<b>15 minutos</b>	<b>30 minutos</b>	<b>60 minutos</b>
<b>30 °C</b>	9,53	8,90	7,46
<b>60 °C</b>	7,74	6,53	4,92
<b>80 °C</b>	3,38	2,94	2,01
<b>90 °C</b>	-	-	-

\* Valores en cursiva no cumplen la norma

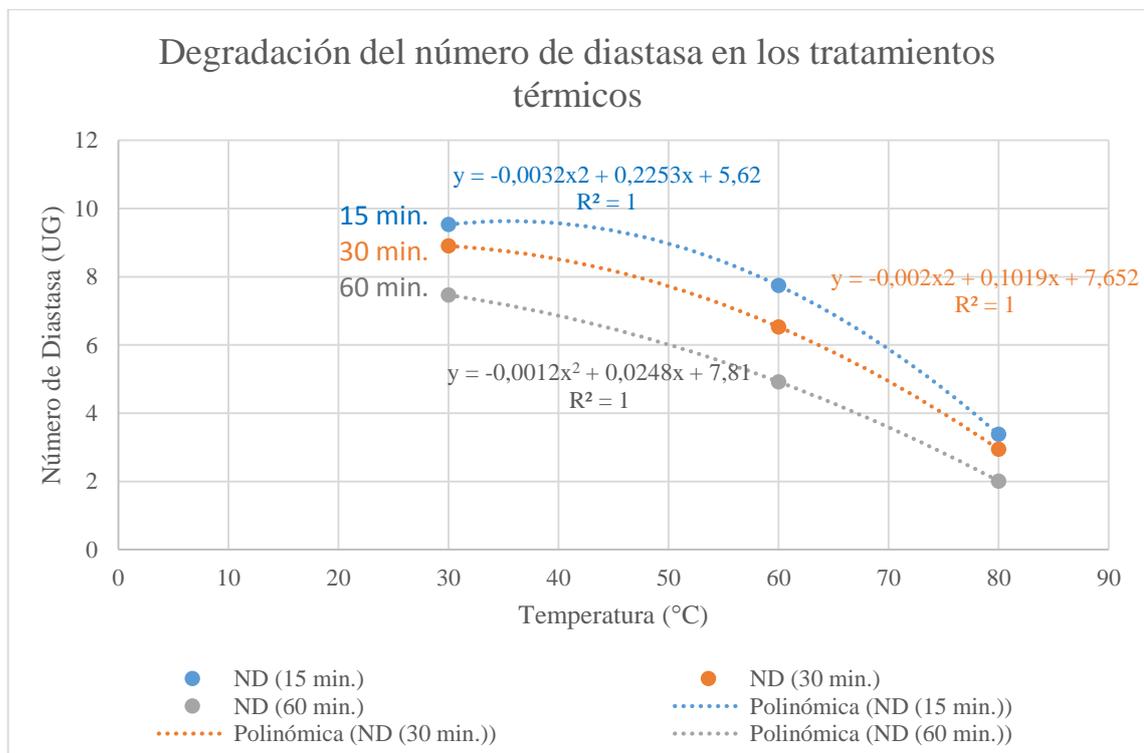
**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

La concentración de diastasa en la miel depende de varios factores como: las características de la colonia, el período de extracción y el tipo de floración. Las mieles procedentes de floración de cítricos y tomatillo presentan un menor contenido de la enzimas valor que oscila entre 3 unidades de Gothe, las mieles de algodón presentan un mayor número de diastasa entre 20 - 22 unidades y las mieles de tipo multifloral presentan un valor entre 9 - 14 unidades Gothe (Pacias et al., 2017), la miel utilizada en esta investigación fue de tipo multifloral presentando un valor de 10,28 unidades Gothe, encontrándose dentro de los valores establecidos en la bibliografía mencionada.

En la tabla 4-3, se observa que el número de diastasa disminuye a medida que se aplica los diferentes tratamientos térmicos a la miel, en relación a la muestra control, misma que se encontró a una temperatura ambiente de 18 °C cuando se realizó el análisis, presentando un valor de 10,28 unidades Goethe encontrándose dentro del valor de referencia establecido en la norma INEN 1572 en la que se especifica un valor mínimo a 8 unidades Goethe.

La diastasa es una enzima inestable al calor, su concentración en la miel depende de la temperatura y el tiempo de duración del tratamiento térmico aplicado, es así que la miel sometida a 30 °C por 15 minutos presentó una mínima disminución de la enzima, con respecto a la muestra control, con un valor de 9,53 unidades Goethe considerando como el mejor tratamiento térmico, mientras que a la misma temperatura (30 °C) pero esta ocasión por 30 minutos, presenta una mayor disminución de la enzima con un valor de 8,90 unidades, hallándose dentro del límite inferior permitido en la norma. Para los tratamientos térmicos con temperaturas de 60 °C y 80 °C a tiempos de 15, 30 y 60 minutos, se observa valores por debajo de las 8 unidades de Goethe, finalmente la miel sometida a una temperatura de 90 °C la lectura de la enzima en el espectrofotómetro no se efectuó, independientemente del tiempo, por lo que se presume que la enzima a esta temperatura tiende a desaparecer tal como se observa en el gráfico 2-3.



**Gráfico 2-3:** Concentración del número de diastasa en los diferentes tratamientos térmicos.

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

### 3.4 Análisis estadístico de los resultados (hidroximetilfurfural y número de diastasa)

#### 3.4.1 Hipótesis

El tratamiento térmico de la miel de abeja pura afecta los valores normados para la concentración de hidroximetilfurfural y para el número de diastasa.

#### Hipótesis nula

Las concentraciones medias de los tratamientos térmicos experimentales no difieren significativamente ( $H_0: M_{T1} = M_{T2} = M_{T3} \dots \dots \dots M_{T36}$ ).

#### Hipótesis alternativa

Las concentraciones medias de los tratamientos térmicos experimentales difieren significativamente ( $H_A: M_{T1} \neq M_{T2} \neq M_{T3} \dots \dots \dots M_{T36}$ ).

#### 3.4.2 Prueba de hipótesis para los tratamientos térmicos realizados

Los resultados generados en los tratamientos térmicos que valoran la concentración hidroximetilfurfural y número de diastasa fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza utilizando el programa SPSS.

##### 3.4.2.1 Análisis de varianza para la concentración de hidroximetilfurfural (HMF)

**Tabla 5-3:** Datos de la concentración de hidroximetilfurfural en los tratamientos térmicos.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min.)	HMF (mg/kg)
30	15	4,95
		5,01
		4,94
	30	5,32
		5,37
		5,28
	60	5,72
		5,7

		5,71
60	15	5,81
		5,84
		5,82
	30	6,12
		6,08
		6,09
	60	6,48
		6,45
		6,51
80	15	6,81
		6,89
		6,83
	30	7,12
		7,09
		7,08
	60	7,71
		7,62
		7,69
90	15	7,81
		7,83
		7,84
	30	8,05
		8,04
		8,08
	60	8,53
		8,53
		-8,49

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Tabla 6-3:** Pruebas de los efectos inter-sujetos para la concentración de hidroximetilfurfural de los tratamientos térmicos

<b>Variable dependiente:</b> Concentración de hidroximetilfurfural (HMF)					
<b>Origen</b>	<b>Suma de cuadrados tipo III</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Intersección</b>	1616,576	1	1616,576	1807352,099	,000 (***)
<b>TEMPERATURA</b>	40,480	3	13,493	15085,764	,000 (***)
<b>TIEMPO</b>	3,257	2	1,629	1820,957	,000 (***)
<b>TEMPERATURA * TIEMPO</b>	,051	6	,008	9,478	,000 (***)
<b>Error</b>	,021	24	,001		
<b>Total</b>	1660,386	36			
<b>Total corregida</b>	43,810	35			
*** Altamente significativo (p: <0,001)					

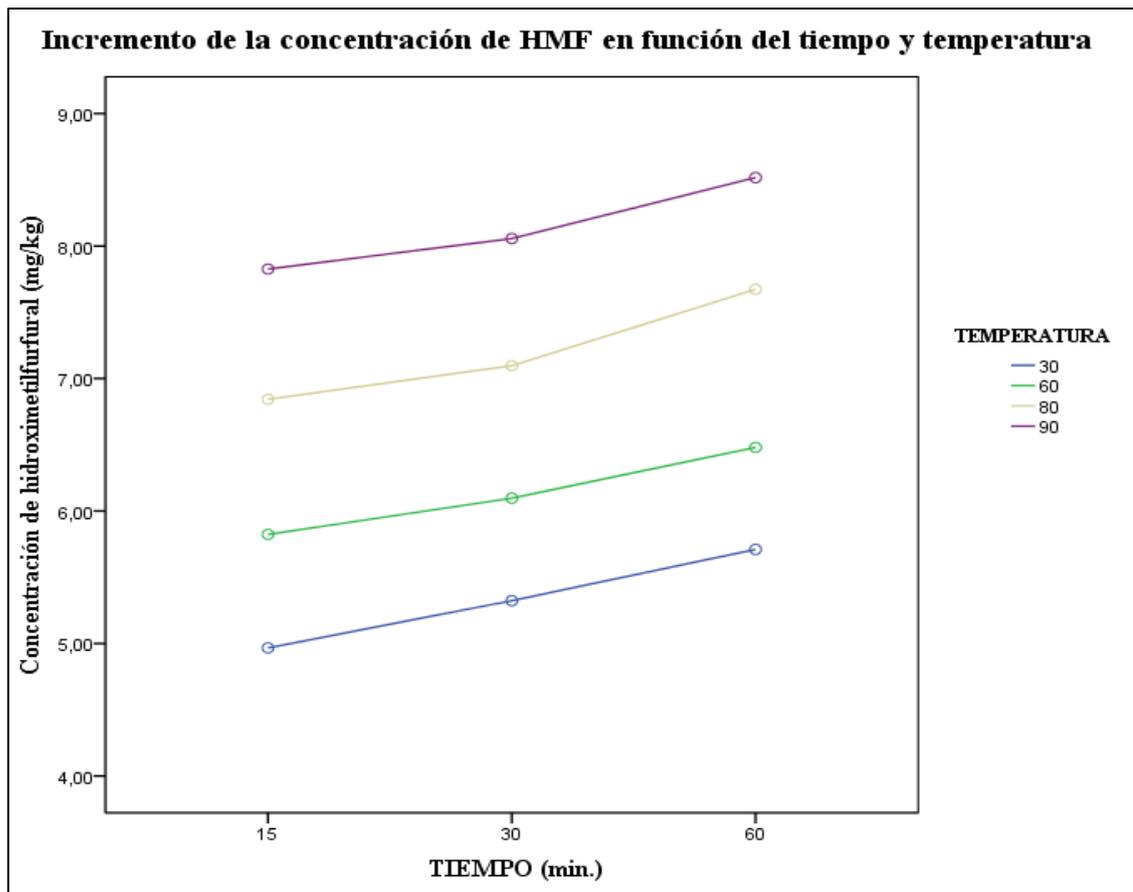
**Fuente:** Análisis en laboratorio

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018.

### **Interpretación:**

La prueba estadística expresa que las medias de las concentraciones de hidroximetilfurfural de los distintos tratamientos experimentales son altamente diferentes entre sí, en relación a la temperatura y tiempo que se apliquen, porque se encuentra en un nivel de significancia menor al 0,001.

Al existir diferencias altamente significativas se acepta que el tratamiento térmico afecta la calidad de la miel, incrementando progresivamente la formación de hidroximetilfurfural, mostrándose este efecto principalmente a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo de duración del tratamiento térmico. En el gráfico 3-3 se observa que el tratamiento térmico correspondiente a 30 °C por 15 minutos presenta un mínimo incremento de la concentración de hidroximetilfurfural, considerándolo el mejor tratamiento térmico para ser aplicado a la miel de abeja.



**Gráfico 3-3: Medias marginales estimadas para la concentración de hidroximetilfurfural**

Fuente: Análisis en laboratorio.

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

### 3.4.2.2 Análisis de varianza para el número de diastasa

**Tabla 7-3:** Datos del contenido del número de diastasa en los tratamientos térmicos

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min.)	NÚMERO DE DIASTASA (unidades Goethe)
30	15	9,62
		9,45
		9,52
	30	8,91
		8,99
		8,81
	60	7,47
		7,42
		7,5
60	15	7,73
		7,79
		7,71
	30	6,51
		6,64
		6,54
	60	4,85
		4,99
		4,93
80	15	3,45
		3,37
		3,33
	30	2,93
		2,92
		2,96
	60	1,95
		2,01
		2,07

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

**Tabla 8-3:** Prueba de los efectos inter-sujetos para el contenido del número de diastasa.

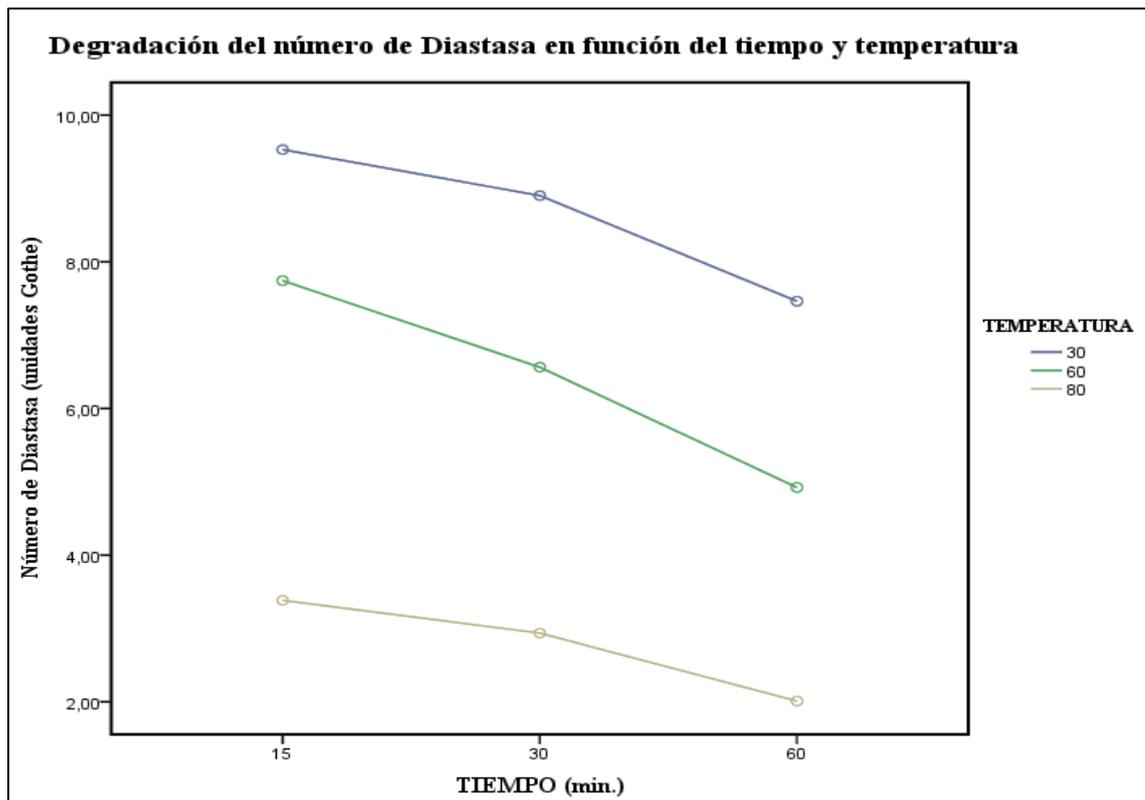
Variable dependiente: Número de diastasa					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	952,538	1	952,538	237255,875	,000 (***)
TEMPERATURA	157,281	2	78,640	19587,546	,000 (***)
TIEMPO	20,106	2	10,053	2503,996	,000 (***)
TEMPERATURA * TIEMPO	1,610	4	,402	100,249	,000 (***)
Error	,072	18	,004		
Total	1131,608	27			
Total corregida	179,069	26			
*** Altamente significativo (p: <0,001)					

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018.

### Interpretación:

La prueba estadística expresa que las medias del número de diastasa de los distintos tratamientos térmicos experimentales son altamente diferentes entre sí, en relación a la temperatura y tiempo que se aplican, porque se encuentra en un nivel de significancia menor al 0,001.

Al existir diferencias altamente significativas se acepta que el tratamiento térmico afecta la calidad de la miel, disminuyendo progresivamente el número de diastasa, mostrando este efecto principalmente a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo de duración del tratamiento térmico. En el gráfico 4-3 se observa que el tratamiento térmico correspondiente a 30 °C por 15 minutos presenta una mínima disminución del número de diastasa, considerándolo como el mejor tratamiento térmico aplicable a la miel de abeja.



**Gráfico 4-3: Medias marginales estimadas para el número de diastasa**

Fuente: Análisis en laboratorio.

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

### 3.5 Variables para el mejor tratamiento térmico

**Tabla 9-3: Condiciones óptimas para que un tratamiento térmico sea aplicable en la miel de abeja.**

CONDICIONES	
Temperatura óptima	30 °C
Tiempo óptima	15 minutos
Volumen de miel	300 mL

Fuente: Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

Realizado por: Ruiz Danesa. 2018

### 3.6 Análisis de todos los parámetros de la norma NTE INEN 1572, para determinación del nivel de afectación térmica de la miel (ambiente y después del mejor tratamiento térmico).

A través del análisis de los requisitos de la norma INEN, se determinó el nivel de afectación térmica en cada uno de ellos, tanto en la miel a temperatura ambiente y en la miel sometida al mejor tratamiento térmico (30 °C por 15 minutos).

**Tabla 10-3:** Resultados de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, de la miel de abeja al ambiente y después del mejor tratamiento térmico.

<b>Parámetros físico-químicos</b>				
<b>Requisitos</b>	<b>Temperatura ambiente</b>	<b>30 °C por 15 minutos</b>	<b>Valores de referencia</b>	
			<b>Min.</b>	<b>Máx.</b>
<b>Contenido de humedad</b>	16,80 %	16,45 %		20 %
<b>Contenido de azúcares reductores</b>	81,30 %	79,99 %	65 %	
<b>Contenido de sacarosa</b>	3,78 %	3,60 %		5 %
<b>Contenido de sólidos insolubles</b>	0,0084 %	0,008 %		0,1 %
<b>Acidez libre</b>	8,38 meq/kg	8,91 meq/kg		50 meq/kg
<b>Número de diastasa</b>	10,28	9,53	8	
<b>Contenido de HMF</b>	4,72 mg/kg	4,96 mg/kg		40 mg/kg
<b>Contenido de cenizas</b>	0,158 %	0,157 %		0,5 %
<b>Conductividad eléctrica</b>	0,201 mS/cm	0,195 mS/cm		0,8 mS/cm
<b>Parámetro microbiológico</b>				
<b>Recuento total de hongos y levaduras</b>	0 UPC/g	0 UPC/g		1x10 <sup>2</sup> UPC/g

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018.

En la tabla 9-3, se aprecia la variación que existe en cada uno de los parámetros establecidos en la norma INEN 1572, antes y después de aplicar el mejor tratamiento térmico en la miel de abeja.

El contenido de humedad es un parámetro muy importante pues se lo relaciona con la fermentación, es así que valores de humedad entre 17 – 20 % facilita el crecimiento de levaduras

osmófilas responsables de fermentar la miel. Este parámetro varía de acuerdo a la procedencia de la miel y el periodo de extracción, aquellas mieles cosechadas en temporadas de lluvia presentan mayor concentración de humedad. (Yelitza and Olivero, 2010)

El valor del contenido de humedad de la muestra control (temperatura ambiente) presentó un valor de 16,80 %, mientras que la muestra de miel sometida a 30 °C por 15 minutos presentó un valor de 16,45 %, ambos valores se encuentran dentro del valor de referencia especificado en la norma INEN. Sin embargo se puede apreciar que existe una mínima variación entre una y otra muestra esto quizás se debe a que el agua se evaporó al momento de destapar el papel aluminio durante el tratamiento térmico para comprobar que la miel alcance la temperatura de 30 °C.

El contenido de azúcares reductores en la muestra control presentó un valor de 81,30 %, mientras que la muestra sometida con el mejor tratamiento térmico presentó una ligera disminución de 79,99 %, esta variación se debe a que en los procesos de calentamiento la glucosa y fructosa contenidos en la miel, sufren un proceso de deshidratación dando como resultado la formación de hidroximetilfurfural, cabe mencionar que la degradación de los azúcares reductores es mayor a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico.

El contenido de sacarosa permitido en la norma es máximo el 5 %, tanto la muestra control con un valor de 3,78 % como la muestra tratada térmicamente con un valor de 3,60 % se encuentran dentro del valor de referencia. La disminución de este parámetro durante el tratamiento térmico es mínima y explicar la diferencia no es muy adecuado, sin embargo se podría pensar en algún proceso de posible inversión y deshidratación remota.

En cuanto al contenido de sólidos insolubles se puede apreciar que existe una mínima disminución del 0,0004 % entre la muestra control y la muestra tratada térmicamente, esto indica que este parámetro no está muy influenciado por el calor. La cantidad de sólidos insolubles en agua permite determinar principalmente las impurezas que se encuentran en la miel, este parámetro se asocia a las condiciones en las que se extrae la miel.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el parámetro de acidez libre, se observa que la miel tratada térmicamente presenta un incremento mínimo de 8,91 % con respecto a la muestra control de 8,38 %, esta diferencia podría deberse a que la miel al ser sometida al calor genera la mínima formación de ácido levulínico y fórmico, la proporcionalidad pequeña se explicaría debido al tratamiento térmico óptimo bajo (30 °C por 15 minutos).

Los parámetros indicativos del calentamiento de la miel, como lo son el hidroximetilfurfural y el número de diastasa presentan una mínima variación cuando se somete al calor la miel, encontrándose dichos valores dentro de los valores de referencia especificados en la norma INEN.

El contenido de cenizas presente tanto en la muestra control como en la muestra tratada a 30 °C por 15 minutos presenta tan solo una variación del 0,001 %, el resultado se debe a que este parámetro no es influenciado por el calor aplicado. El contenido de cenizas hace referencia a la presencia de polvo, polen, cera, etc., siendo difícil que se disuelvan a una temperatura de 30 °C en 15 minutos. Este parámetro está relacionado con el proceso de filtración durante la extracción de la miel.

La conductividad eléctrica en la muestra tratada térmicamente (0,195 mS/cm) presenta una disminución con respecto a la muestra control (0,201 mS/cm), se puede deber a la mínima cantidad de agua que pudo perderse por evaporación al destapar el papel aluminio, debido a que tanto la presencia de agua, minerales, ácidos orgánicos pueden influir de manera indirecta en la conductividad.

Los resultados microbiológicos de la miel genuina muestran ausencia de microorganismos, esto indicaría que la cosecha y almacenamiento de la miel han sido realizadas adecuadamente, por ende la miel posteriormente tratada térmicamente tampoco presentó contaminación microbiana.

### 3.7 Resultados de la degradación de vitamina C, en una muestra de miel adicionada experimentalmente vitamina C.

**Tabla 11-3:** Resultados de la concentración de vitamina C, como indicativo para valorar probable degradación de otras sustancias presentes en miel procesada con el mejor tratamiento.

Mejor tratamiento	Concentración de vitamina C adicionada en miel (mg)	Porcentaje de vitamina C
Temperatura ambiente (control)	1,5	100
30 °C por 15 minutos	1,4512	96,75
Degradación de vitamina C	0,0488	3,25
<i>Valor de referencia para miel genuina: 0,05 mg/100 g de miel (G et al., 2010)</i>		

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

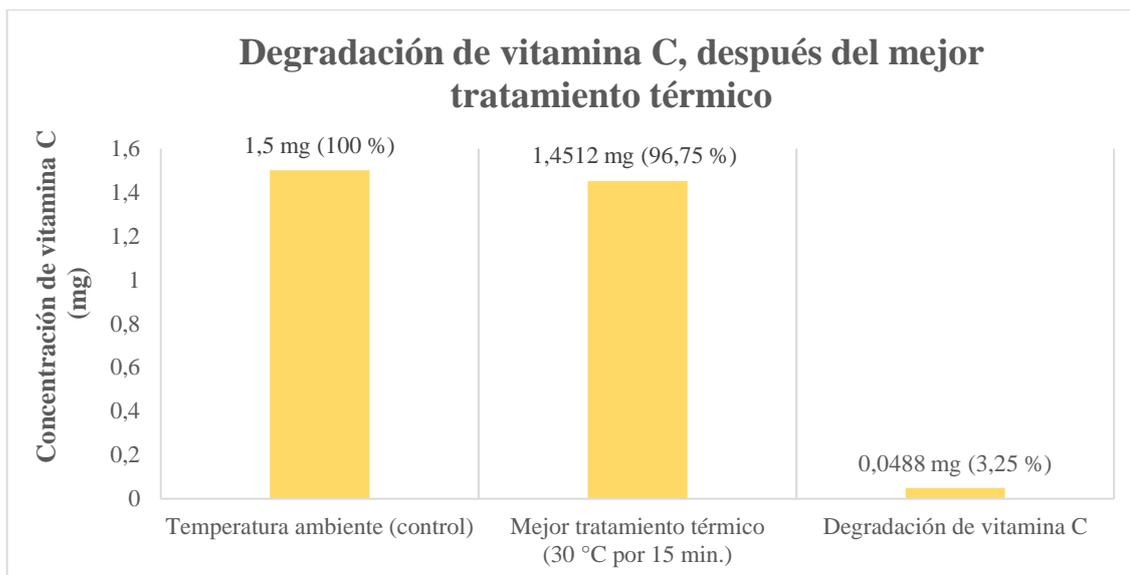
**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

La vitamina C es inestable en presencia de oxígeno, y termolábil degradándose con facilidad cuando se somete al calor (pH de miel genuina = rango 3,6 – 6,1), siendo un probable inconveniente en potenciales aplicaciones, pues la concentración de vitamina C puede verse afectada como lo confirma un estudio realizado por Nicoleta Matei en el 2003, quien determinó la degradación de vitamina C en la miel de abeja en soluciones hervidas (Matei et al., 2004).

La cantidad de vitamina C en miel de abeja es muy pequeña (0,05 mg/100 g de miel) (G et al., 2010), esto resulto una dificultad en la detección de su concentración con los recursos disponibles, con este escenario se decidió realizar un estudio direccionado consistente en adicionar una solución estándar de vitamina C a la miel, con el fin de determinar el porcentaje de degradación de la vitamina luego del tratamiento térmico encontrado como óptimo.

En la presente investigación la miel metodológicamente adicionada solución patrón de vitamina C (blanco) a temperatura ambiente presentó una concentración de 1,5 mg (100 %), mientras que la miel adicionada solución patrón de vitamina C y sometida al mejor tratamiento térmico (30 °C por 15 minutos), muestra una disminución de vitamina C, dando una concentración final de 1,4512 mg (96,75 %), luego del tratamiento térmico. Con estos resultados se concluye que la degradación de vitamina C a esa temperatura y tiempo fue de 3,25 %, tal como se observa en la figura 6-3.

La degradación mínima de vitamina C (3,25 %) con el tratamiento óptimo (30 °C por 15 minutos) permitiría valorar referencialmente la probable estabilidad que pueden tener otros componentes existentes en la miel luego del tratamiento térmico, por ejemplo otras vitaminas y compuestos varios. Una de las propiedades más conocidas y sobresalientes de la vitamina C es su propiedad anti-oxidativa, por lo que protege de la oxidación a las vitaminas A y E que también se encuentran en la composición de la miel de abeja. (Tauguin et al., n.d.)



**Gráfico 5-3:** Degradación de vitamina C en miel de abeja, a temperatura ambiente y después del mejor tratamiento térmico.

**Fuente:** Análisis en laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. ESPOCH.

**Realizado por:** Ruiz Danesa. 2018

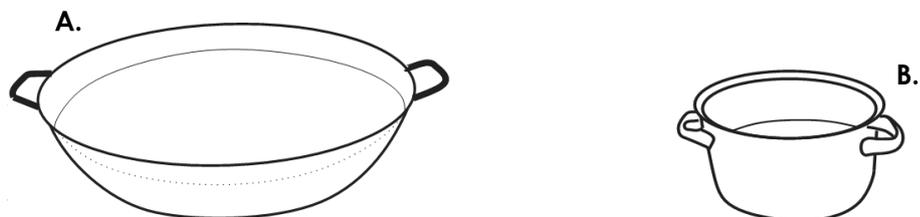
### 3.8 Propuesta de un tratamiento térmico alternativo artesanal para los apicultores y socialización de resultados.

#### 3.8.1 *Equipo alternativo de tratamiento térmico*

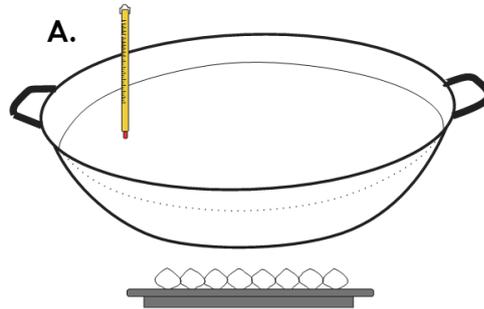
La metodología planteada debe ser aplicada solamente cuando la situación lo amerite.

#### **Procedimiento:**

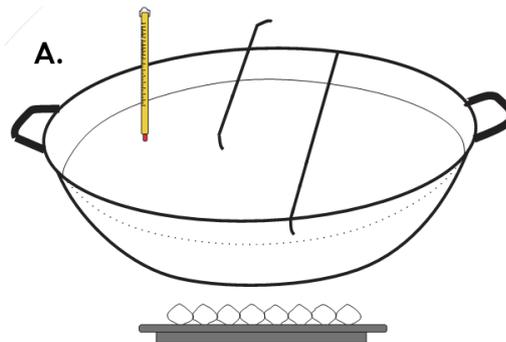
1. Disponer de 2 recipientes de aluminio: un recipiente grande (A.) y un recipiente pequeño (B.). En el recipiente A colocar agua y en el recipiente B colocar miel de abeja.



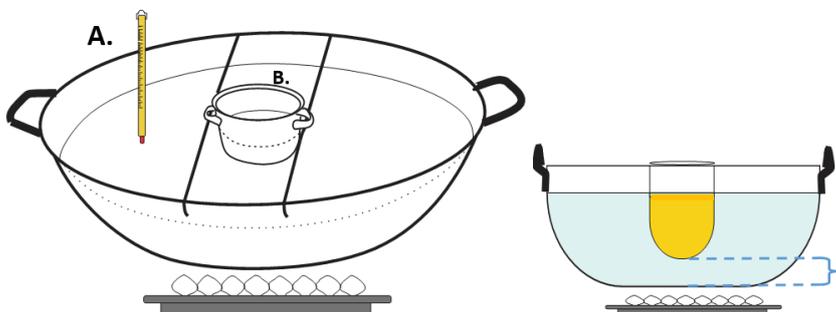
2. Calentar el recipiente **A**. hasta que alcance 30 °C, controlar la temperatura



3. Colocar varillas de hierro a lo largo de la superficie del recipiente **A**.

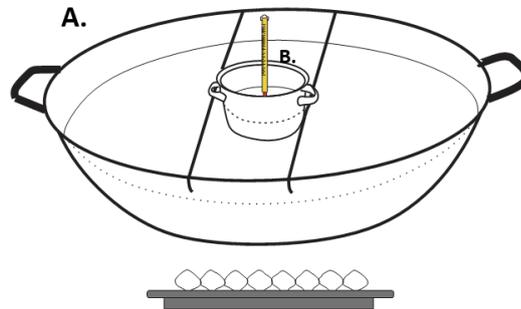


4. Cuando el agua haya alcanzado los 30 °C, colocar el recipiente **B**. apoyado en las varillas sobre el recipiente **A**. El nivel del agua del baño exterior debe estar al mismo nivel de la miel en el recipiente interior (obligatorio).

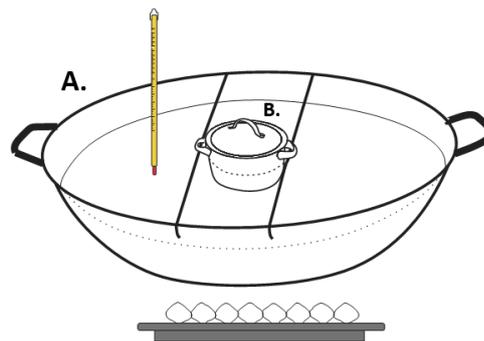


La base del recipiente **B** y la base del recipiente **A** deben estar separados a una distancia prudencial (obligatorio).

5. Cuando el medio interno (miel) alcance los 30 °C del medio externo (agua), a partir de este instante correrá el tiempo de 15 minutos a los 30 °C (obligatorio).



6. Igualadas las temperaturas del exterior y de la miel proceda a tapan el recipiente de miel con la ayuda de papel aluminio o su equivalente, durante los 15 minutos a 30 °C con control permanente de temperatura.



7. Cumplido los 15 minutos a 30 °C la miel debería ser considerada apta en todas sus características y estaría disponible para cualquier aplicación.

### 3.8.2 Socialización

La socialización se realizó el 08 de junio del 2018, en las instalaciones donde se efectúan reuniones de la asociación ASOPROACH (anexo E).

## CONCLUSIONES

- Siguiendo la metodología experimental del trabajo, el tratamiento térmico mayor a 30 °C por 15 minutos afecta progresivamente la integridad en las especificaciones de la miel de abeja principalmente en hidroximetilfurfural y número de diastasa.
- Las especificaciones básicas en el diseño del dispositivo y de la metodología experimental del trabajo de investigación son: un baño María termostático, un Erlenmeyer marca JNS (borosilicate GG-17) de 500 mL, espesor de 0,22 mm, diámetro externo de base de 10,14 cm con un ángulo de base 80 °, y un termómetro móvil para control de temperatura permanente.
- La ejecución de los tratamientos térmicos con la metodología diseñada (miel de abeja a 30, 60, 80 y 90 °C por 15, 30 y 60 minutos), muestra un deterioro progresivo de HMF, número de diastasa, a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico.
- El seguimiento experimental conjuntamente con el análisis estadístico, indica que el mejor tratamiento térmico corresponde a valores de 30 °C por 15 minutos, este tratamiento garantiza estabilidad de la concentración de HMF y número de diastasa en un volumen de 300 mL de miel de abeja.
- La concentración de vitamina C en miel de abeja genuina se mantiene estable en el mejor tratamiento térmico de 30 °C por 15 minutos, aspecto que permitiría pensar en la integridad de las demás vitaminas y sustancias diversas presentes en la miel. También la miel cumple las especificaciones de la norma NTE INEN 1572.
- El equipo alternativo artesanal propuesto para el tratamiento térmico de la miel de abeja, garantiza la estabilidad de la misma, siempre y cuando se cumpla obligatoriamente las condiciones de la metodología diseñada experimentalmente, aplicando las variables del mejor tratamiento térmico encontrado.
- El uso de una miel genuina garantiza experimentalmente los resultados.
- El estudio aporta conocimientos alrededor del tratamiento térmico de miel de abeja, sin embargo esto no significa propiciar el uso de calor sobre la miel de abeja.

## **RECOMENDACIONES**

- En caso de tener la necesidad de reproducir la metodología experimental, se recomienda cumplir cada una de las especificaciones señaladas.
- En aquellos casos en los que el apicultor necesite someter la miel de abeja a calentamiento, se recomienda seguir la metodología alternativa artesanal planteada.
- Frente a la alta sensibilidad térmica de la miel en los parámetros de HMF y número de diastasa tal vez sería importante, de ser necesario, considerar medios mecánicos de mezcla de mieles.

## BIBLIOGRAFÍA

**Apaza Condori, Carla Sofía.** *Proceso de cultivo de abejas y producción de miel*, in: "Producción Sostenible Para El Empoderamiento Económico de Las Mujeres Campesinas Del Cantón Conchupata" Municipio Quiabaya La Paz-Bolivia. Bolivia. Bolivia. Producción del Centro de Capacitación y Servicio para la Mujer CECASEM. 2013, pp. 7-14.

**Ávila Montesó, José O.** *La miel, el polen y la jalea real*. España. CEDEL. 1980, pp. 66-75

**AGILENT.** *Guía de selección de columnas para HPLC*. [en línea]. Agilent. 2015. [Consulta: 20 agosto 2018]. Disponible en: <http://cientificanacional.com.ar/v2/catalogos/Croma%20-%20Columnas%20HPLC%20-%20Catalogo.pdf>

**BALANSIYA.** La miel. Propiedades, composición, origen, historia. [en línea]. Valencia. Balansiya. 2014. [Consulta: 1 junio 2018]. Disponible en: [http://www.balansiya.com/ingredientes\\_miel.html](http://www.balansiya.com/ingredientes_miel.html)

**Ballesteros, H.H., Vásquez, R.E.** "Determinación de la producción de jalea real en colmenas de recría de diferentes dimensiones". *CORPOICA. Ciencia y Tecnología*, n° 8 (2007), (Colombia), pp. 74-75.

**Carpes, Solange.** *Estudo das características físico-químicas e biológicas do polen apícola de Apis mellifera L* (tesis). da região sul do Brasil. Universidade Federal do Paraná, Brasil. 2008, pp. 22-23.

**Correa, Ana.** *Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas* (tesis). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2015, p. 88

**Farmer, Sarah.** *Auburn University*. Alabama NewsCenter. 2018, p. 9.

**González, et al.** *Abejas altoandinas de Colombia: guía de campo*. Bogotá, D.C., Colombia. 2005, p. 29.

**Hernández, M., et al.** 2013. "Determinación de propiedades termofísicas en diferentes mieles de abeja recolectadas en el Estado de Puebla". *Rev. Verde Agroecol. E Desenvolv. Sustentável*, vol. 7, pp. 8–15.

**Lavandera Rodríguez, I.** "Curación de heridas sépticas con miel de abejas". *Rev. Cuba. Cir.*, vol. 50, 2011, pp. 187–196.

**Martínez, V.C.P., Ojeda, R.** “Estudio de viabilidad económica de la producción de jalea real con abejas *Apis mellifera* alimentada artificialmente en época de escasez en Yucatán, México”. *Revista Mexicana de Agronegocios*, n° 18 (2006). (México), p. 15

**MASKELIUNAS, J. (ESNC).** *Codex norma para la miel codex stan 12-1981 9*. 1981.

**Matei, et al.** “Determination of c Vitamin and Some Essential trace Elements (ni, mn, fe, cr) in Bee Products”. *Acta Chim Slov*, n° 51 (2004), pp. 169-175

**Mazariegos, F.** *Determinación de la actividad de la enzima diastasa y análisis microbiológico en miel producida en la finca el guardabarranco, municipio de Pastores, departamento de Sacatepequez* (tesis). Univ. San Carlos Guatemala. 2006, p. 43.

**NTE INEN1572.** *Requisitos: Miel de abeja*. 2016

**Pasias, I., et al.,** “HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration”. *Food Chemistry* [en línea], 2017, (229), pp. 425–431. [Consulta: 2 abril 2018]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.084>

**Pérez Llanes, R.** “Descubriendo el Marketing con las abejas”. *PERSPECTIVAS*, n° 30 (2012), (Bolivia), pp. 117–144.

**Pérez, C., Jimeno, F.** *Manejo y Alteraciones de la Miel*. Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario. 1987, pp. 5-6.

**Polaino, C.** *Manual práctico del apicultor*. Cultural, España. 2006, pp. 214-215

**Scarabino, J.C.,** “Valuation of products made in the beekeeping industry, in Santa Fe, Argentina republic”. *Rev. Científica Pensam. Gest*, pp. 52–66. <https://doi.org/10.14482/pege.39.8442> 2015.

**Subovsky, M.J. et al.** *Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles del nordeste argentino* (No. Agraria 12). UNNE. Facultad de CIENCIAS, Argentina. 2004, pp. 33-35.

**Tauguinas, Alicia L et al.** Análisis de niveles de concentración de vitamina C en mieles de la provincia del Chaco. [en línea]. UNNE. [Consulta: 29 junio 2018]. Disponible en: <http://studylib.es/doc/106767/an%C3%A1lisis-de-niveles-de-concentraci%C3%B3n-de-vitamina-c-en-mie>.

**TELÉGRAFO, E.** *La apicultura rinde como alternativa de producción* [en línea]. Ecuador. El Telégrafo. 2016. [Consulta: 4 abril 2018]. Disponible en: <http://tinyurl.com/yapeqn7e>

**Ulloa & Mondragón, C.** *La miel de abeja y su importancia*. 2010, pp. 14–18.

**Valega, O.** Todo sobre la miel [en línea]. Apiservices - Apic. - Beekeep. 2005. [Consulta: 20 agosto 2018]. Disponible en: <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/938-todo-sobre-la-miel>

**Vargas, R. et al.** “El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria”. *Interciencia*. 38 (10). 2013, pp. 705-711.

**VIT, P.** “Productos de la colmena secretados por las abejas: Cera de abejas, jalea real y veneno de abejas”. *Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel*. (36). 2005, pp. 37–48.

**Yelitza, A., et al.** “Determinación de adulteración y aceptabilidad de mieles (*Apis mellífera*) comercializadas en Cartagena, Bolívar, Colombia”. *Rev. Colombiana cienc. Anim*, n° 2, (2010), (Colombia), pp.349–354.

**Zago, G., Karina, I., et al.** “Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción”. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*. Rafael Rangel, vol. 41, 2010, pp. 25–30.

## ANEXOS

### Anexo A: Recepción de la muestra de miel de abeja



Envasado de miel de abeja genuina

**Fotografía 1-3:** Entrega de miel genuina de un socio de ASOPROACH

**Anexo B:** Metodología experimental de tratamiento térmico.



Armado del equipo



Aplicación de los tratamientos térmicos

**Fotografía 2-3:** Diseño de la metodología de tratamiento térmico.

**Anexo C: Análisis físico-químico de la miel de abeja tratada térmicamente.**



Hidroximetilfurfural



Número de diastasa



Humedad



Conductividad eléctrica



Sólidos insolubles



Cenizas



Azúcares reductores totales y reductores



Acidez

**Fotografía N° 3-3:** Control de calidad de la miel de abeja, norma INEN 1572

**Anexo D** Determinación de vitamina C.



Preparación de las muestras



Preparación del equipo de HPLC



Recolección de datos

**Fotografía 3-3:** Análisis de la concentración de vitamina C, mediante HPLC

**Anexo E** Socialización a los apicultores de ASOPROACH.



Exposición de resultados experimentales



Exposición de la propuesta artesanal de  
tratamiento térmico

**Fotografía 4-3:** Socialización de resultados y de la propuesta alternativa artesanal de tratamiento térmico (ASOPROACH)

Anexo F Aval para la fase de socialización ASOPROACH



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



SAGID – PROYECTO MIEL

Oficio No 004-2018-PROY MIEL SAGID  
Riobamba, 7 de junio del 2018.

Sr.  
Dr. Edmundo Caluña.  
VICEDECANO FACULTAD DE CIENCIAS.  
Presente.



De nuestra consideración.

Reciba un cordial saludo, bajo el proyecto de investigación del grupo SAGID, presentado al IDI para su aprobación y titulado "ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO, PARA EL DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO", solicitamos a Usted el aval para la fase de socialización de los resultados generados y de interés de ASOPROACH de los trabajos de titulación siguientes:

- ✓ VALORACIÓN COMPARATIVA DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO CON MIELES EXISTENTES EN EL MERCADO SEGÚN NORMA NTE INEN 1572.  
Autor. Elizabeth Guangasi. (Tesista)
- ✓ ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN TÉRMICA DE LA MIEL DE ABEJA EN UNA METODOLOGÍA ALTERNATIVA, MONITOREANDO LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA C, HIDROXIMETILFURFURAL Y NÚMERO DE DIASTASA.  
Autor. Danesa Ruiz. (Tesista)

La mencionada socialización a los miembros de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo, se realizará el día 08 de junio del 2018 en el lugar de reuniones que acostumbran (altos de Farmacia Silvana de la Dolorosa) a las 14h00. En tal circunstancia solicitamos se facilite la firma de los certificados para los apicultores que han colaborado con sus mieles para la valoración comparativa con las mieles existentes en el mercado.

Esperando su atención a la presente anticipamos nuestro agradecimiento.

Atentamente.

Dr. Carlos Pitámunga.  
DIRECTOR DEL GRUPO DE INVESTIGACION – SAGID

Dr. Galo Insuasti C.  
RESPONSABLE PROYECTO INVESTIGACION

cc. Dr. Eduardo Fonseca. Presidente ASOPROACH.

## Anexo G Certificado de realización de la socialización ASOPROACH

### CERTIFICADO

A petición de parte interesada, certifico que el día 8 de Junio del 2018, 15h00, se realizó la socialización de resultados a los miembros de la Asociación de Producción Apícola de Chimborazo, de los dos trabajos de titulación del proyecto interinstitucional (ESPOCH, SAGID, ASOPROACH), titulado "ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, TRATAMIENTO TÉRMICO Y OZONIZACIÓN DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO, PARA EL DESARROLLO DE ELABORADOS Y POSICIONAMIENTO EN EL MERCADO", los trabajos socializados fueron:

- ✓ VALORACIÓN COMPARATIVA DE MIELES DE ABEJA DE LA ASOCIACIÓN DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DE CHIMBORAZO CON MIELES EXISTENTES EN EL MERCADO SEGÚN NORMA NTE INEN 1572.  
Autor. Elizabeth Guangasi. (Tesisista)
- ✓ ESTUDIO DE LA AFECTACIÓN TÉRMICA DE LA MIEL DE ABEJA EN UNA METODOLOGÍA ALTERNATIVA, MONITOREANDO LA DEGRADACIÓN DE VITAMINA C, HIDROXIMETILFURFURAL Y NÚMERO DE DIASTASA.  
Autor. Danesa Ruiz. (Tesisista)

Particular que certifico, pudiendo los interesados hacer uso necesario del presente certificado

Riobamba 4 de julio del 2018



Dr. Eduardo Fonseca.  
PRESIDENTE ASOPROACH

060155163-3

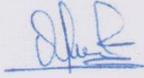
## Anexo H Resultados microbiológico



Servicios Analíticos Químicos y Microbiológicos  
en Aguas y Alimentos

### EXAMEN BROMATOLOGICO DE ALIMENTOS

CÓDIGO 295-305-18

<b>CLIENTE:</b> Danesa Ruiz				
<b>DIRECCIÓN:</b> Politécnica			<b>TELÉFONO:</b> 0990664397	
<b>TIPO DE MUESTRA:</b> Miel de abejas				
<b>FECHA DE RECEPCIÓN:</b> 23 de marzo del 2018				
<b>FECHA DE MUESTREO:</b> 23 de marzo del 2018				
<b>EXAMEN FISICO</b>				
COLOR: Característico				
OLOR: Característico				
ASPECTO: Normal , libre de material extraño				
COD. LAB	MUESTRA	DETERMINACION	UNIDAD	RESULTADO
125	Miel (temperatura ambiente)	Microbiológico	UFC	0
126	Miel (30 °C por 15 min.)	Microbiológico	UFC	0
<b>OBSERVACIONES:</b>				
<b>FECHA DE ANÁLISIS:</b> 25 de marzo del 2018				
<b>FECHA DE ENTREGA :</b> 29 de abril del 2018				
<b>RESPONSABLE:</b>				
				
<b>Dra. Gina Álvarez R.</b>				
El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo, el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.				
*Las muestras son receptados en laboratorio.				