



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Prof. Miguel Neira C.**  
Instituto de Producción y  
Sanidad Vegetal  
Facultad de Ciencias Agrarias

Profesor Copatrocinante  
**Dr. Ociel Muñoz F.**  
Instituto de Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

**ESTUDIOS PRELIMINARES DE CARACTERIZACIÓN DE  
MIEL DE ABEJA: DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS  
POR GC/MS Y ANÁLISIS ENZIMÁTICOS**

Tesis de Grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**HANILE ELIZABETH BACHMANN LOVECE**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

*Dedicado a mis padres Carlos y Amelia, a mi Nonna, a mis hermanos Pablo y Hans y a Gaspar.*

Quiero agradecer a todas las personas que conforman el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Austral, por su gran apoyo en la realización de este trabajo. Agradezco al profesor Miguel Neira y a la Señora Nimia Manquián,, por haberme dado la posibilidad de realizar esta tesis, al profesor Ociel Muñoz por su excelente disposición y especialmente al profesor Alejandro Reyes por sus muchos consejos y constante apoyo durante todo el tiempo que duró esta tesis.

Agradezco a mis padres Carlos y Amelia por haberme entregado las herramientas necesarias que me han permitido alcanzar mis metas, por todo su amor, apoyo y paciencia con lo que siempre he podido contar, gracias por la vida que me han regalado. Agradezco a mi Nonna por estar aun conmigo y por su infinidad de consejos cargados de sabiduría, a mis hermanos Pablo y Hans por su cariño. Gracias por poder contar con ustedes siempre.

Agradezco a Gaspar por el amor y la compañía que me ha entregado todos estos años, por su paciencia, comprensión y su enorme apoyo, sé que sin él no lo hubiera logrado.

Gracias a Andrea por su amistad y cariño, en las buenas y en las malas, a Ihannella por el compañerismo, amistad y apoyo en todos estos años. Gracias a mis chiquilines Fernando, Petra y Mateo por todas las alegrías que me han regalado y por alimentar día a día mi espíritu infantil. A mis amigos, Yogui, Erica, Pato y Marce, por los buenos momentos vividos y todas las alegrías compartidas.

Agradezco también a todas aquellas personas anónimas en este trabajo pero no en mi corazón, porque directa o indirectamente me demostraron su cariño y me dieron su apoyo. Gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Agradecimientos	
Indice de contenidos	
Indice de figuras	
Indice de tablas	
Lista de abreviaturas	
1. Resumen	1
1.1 Summary	2
2. Introducción	3
2.1 La Miel.	3
2.2 Los carbohidratos.	9
2.3 Carbohidratos en la miel.	10
2.4 Técnicas utilizadas para determinar carbohidratos.	13
2.5 Hipótesis.	14
2.6 Objetivo General.	15
2.7 Objetivos Específicos.	15
3. Material y método	16
3.1 Material.	16
3.1.1 Muestras de Miel:	16
3.1.2 Reactivos:	16
3.1.3 Soluciones:	17
3.1.4 Equipos e instrumentos:	18

3.2 Métodos.	19
3.2.1 Preparación de estándares de carbohidratos:	19
3.2.2 Separación cromatográfica de estándares de carbohidratos:	19
3.2.3 Determinación de carbohidratos en muestras de miel:	20
3.2.4 Análisis por espectrometría de masa de los estándares de carbohidratos:	23
3.2.5 Determinación de la actividad de diastasa en miel:	23
3.2.6 Determinación de la actividad de invertasa en miel:	25
3.2.7 Determinación de actividad glucosa-oxidasa en miel:	27
4. Resultados	29
4.1 Optimización de los parámetros cromatográficos para el análisis de carbohidratos.	29
4.2 Análisis Cromatográfico.	31
4.3 Análisis mediante espectrometría de masa.	34
4.4 Análisis cromatográfico de muestras de miel.	46
4.5 Análisis enzimáticos en miel.	47
5. Discusión	60
5.1 Análisis cromatográfico.	62
5.2 Análisis de espectrometría de masa.	65
5.3 Análisis enzimáticos en miel de abeja.	72
5.4 Conclusiones.	74
5.5 Proyecciones del trabajo.	75
6. Referencias	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Carbohidratos más abundantes en la naturaleza.	11
Figura 2: Esquema del método Pierce – Pourtallier	21
Figura 3: Estructuras químicas de los monosacáridos derivatizados	30
Figura 4: Superposición de los cromatogramas de los estándares	33
Figura 5: Perfiles cromatográficos de las oximas trimetil sililadas de carbohidratos	35
Figura 6: Estructuras moleculares de los disacáridos maltosa y celobiosa	36
Figura 7: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de fructosa	38
Figura 8: Espectro de masa obtenido en el análisis del monosacárido glucosa	39
Figura 9: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de sacarosa.	40
Figura 10: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de trehalosa	41
Figura 11: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de celobiosa	42
Figura 12: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de maltosa	43
Figura 13: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de melibiosa.	44
Figura 14: Perfiles cromatográficos obtenidos para miel de raps y las fortificaciones	48
Figura 15: Perfiles cromatográficos obtenidos para miel de raps y las fortificaciones.	49
Figura 16: Perfiles cromatográficos obtenidos para miel de raps y para la fortificación con melibiosa.	50
Figura 17: Cromatograma de una muestra de miel monofloral de alfalfa chilota	51
Figura 18: Cromatograma de la muestra de miel multifloral 1	52
Figura 19: Cromatograma de la muestra de miel multifloral 2.	53

Figura 20: Cromatograma de una muestra de miel multifloral 3	54
Figura 21: Cromatograma de una muestra de miel multifloral 4	55
Figura 22: Comparación de los espectros de masa de maltosa oxima octaquis trimetil silil.	69
Figura 23: Comparación de espectros de masa obtenidos para glucosa oxima hexaquis trimetil silil.	70

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Constituyentes de la miel expresados en porcentaje.	5
Tabla 2: Principales enzimas presentes en la miel y su función.	8
Tabla 3: Temperaturas del horno de la columna utilizadas para el análisis de carbohidratos.	22
Tabla 4: Tiempo de retención de los estándares de carbohidratos analizados.	32
Tabla 5: Iones de mayor abundancia observados en los espectros de masa de los diferentes carbohidratos.	45
Tabla 6: Análisis enzimático y sus correspondientes orígenes botánicos.	57
Tabla 6 (Cont.): Análisis enzimático y sus correspondientes orígenes botánicos.	58
Tabla 7: Comparación de los iones obtenidos por Medeiros & Simoneit (2007) con los determinados en el presente estudio.	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

CE	: Electroforesis capilar.
DN	: Número Diastásico.
ELSD	: Detector de dispersión de luz por evaporación ( <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> ).
ESI – MS	: Espectrometría de Masas de Ionización por Electrospray.
FID	: Detector de ionización de llama.
GC	: Cromatografía de Gas ( <i>Gas Chromatography</i> ).
HPLC	: Cromatografía Líquida de Alta Precisión ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ).
IN	: Número Invertásico.
LC	: Cromatografía Líquida.
MS	: Espectrometría de Masa.
PAD	: Detector de pulsación amperométrica.
pNPG	: p – nitrofenil – D – glucopiranosido.
RI	: Detector del índice refractivo.
SPLIT	: Modo de partición de la muestra antes de ingresar a la columna cromatográfica.

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la técnica de cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa utilizando una columna capilar altamente polar, para la determinación de siete carbohidratos encontrados en miel (monosacáridos y disacáridos). Se logró definir un método para determinar siete estándares de carbohidratos presentes en la miel. A través de éste se obtuvo el tiempo de retención de dos estándares de monosacáridos (glucosa y fructosa) y de cinco disacáridos (sacarosa, maltosa, trehalosa, celobiosa y melibiosa). Se realizaron algunas pruebas de detección de estos mismos estándares en miel, obteniéndose picos bien definidos y claramente diferenciables en los monosacáridos, fructosa y glucosa. En el caso de los disacáridos no se observó un patrón bien definido en la separación. Esto puede haberse debido a la gran similitud estructural entre ellos y a la presencia de muchos otros disacáridos que no fueron analizados en este trabajo. Por otra parte, se obtuvo el espectro de masa de los siete carbohidratos analizados, observándose gran similitud en sus iones.

En paralelo a estos análisis se evaluaron las actividades de las enzimas diastasa e invertasa presente en mieles de la Región de Los Lagos. Sin embargo no fue posible realizar algún tipo de caracterización desde el punto de vista enzimático, debido a la gran heterogeneidad en la edad de las muestras de miel, origen botánico y posibles tratamientos térmicos post cosecha de las muestras.

## 1.1 SUMMARY

The present study has evaluated the technique of gas chromatography coupled with mass spectrometry using a highly polar capillary column for determination of seven carbohydrate standards found in honey (monosaccharides and disaccharides). It was possible to define a standard method for to determine seven carbohydrates present in honey. Using this method we have obtained the retention time of two standards of monosaccharides (glucose and fructose) and five disaccharides (sucrose, maltose, trehalose, cellobiose and melibiose). Some tests of detection were made for these same honey standards obtaining well-defined and clearly distinguishable peaks for monosaccharides fructose and glucose. For this disaccharides we didn't see a well-defined pattern of separation. This may be due to the large structural similarity between them and the presence of many other disaccharides that were not analyzed in this study. Moreover, we have obtained the mass spectrum of the seven analyzed carbohydrates, wich show great similarity in their ions. In parallel to these studies we assessed the activities of the enzymes diastase and invertase present in honey samples from the Región de Los Lagos. We were unable to perform an enzyme characterization because the great heterogeneity in age, botanical origin and possible heat post-harvest treatments of the honey samples.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 La Miel.

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos del Ministerio de Salud de Chile de 1997, la denominación de miel (miel de abeja o miel virgen), está sólo y exclusivamente reservada para designar el producto natural elaborado por la abeja *Apis mellífera*, con el néctar de las flores y exudados de plantas aromáticas (Servicio Nacional de Salud, Chile, 1997). La miel es un producto alimenticio líquido, espeso o cristalino, azucarado, producido por las abejas melíferas mediante la recolección del néctar de las flores, de las secreciones procedentes de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos sobre ellas. Luego, la miel es enriquecida con secreciones propias de la abeja, transformada, almacenada y madurada en los panales de la colmena (Gozálvez, 1990; Bianchi, 1990).

La composición de la miel depende de muchos factores, tales como especies cosechadas, naturaleza del suelo, raza de abejas, estado fisiológico de la colonia, entre otros (Jean -Prost, 1995). Su composición varía según la fuente floral del néctar, y aún para una misma especie botánica presenta fluctuaciones dentro de ciertos límites (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), citado por Figueroa, 2003).

Como néctar se entiende por aquella solución acuosa que contiene azúcar y es secretada por las glándulas de las plantas llamadas “nectarios”, y que deriva básicamente de la savia de las plantas por un proceso activo de secreción (García *et al.*, 1986). La miel también puede ser producida a partir de secreciones de insectos succionadores, los cuales ingieren la savia de las

plantas mezclándola con saliva y secreciones intestinales y el exceso de savia ingerido lo depositan como pequeñas gotas sobre la superficie de las hojas, siendo ésto utilizado por la abeja. (García *et al.*, 1986).

Según la norma del Instituto Nacional de Normalización del 2007, las mieles pueden ser clasificadas según su origen floral en:

- Miel monofloral: Se denomina a aquellas mieles en las que al menos el 45% del total de sus granos de polen corresponden a una misma especie vegetal.
- Miel bifloral: Se denomina a aquellas mieles que presentan pólenes de dos especies, alcanzando un valor mínimo de 50% en su conjunto, y un porcentaje no mayor al 5% de diferencia entre ella.
- Miel polifloral: Se denomina a aquellas mieles que presenten en su composición, en forma significativa, granos de polen de tres o más especies vegetales, sin que ninguna de ellas alcance un porcentaje mayor o igual al 45%.

La miel se compone principalmente de carbohidratos disueltos en agua, predominando glucosa y fructosa, encontrándose también en menor cantidad azúcares tales como sacarosa, maltosa, trehalosa, melicitosa, celobiosa y otros oligosacáridos. Las proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, minerales, polen y otras sustancias como levaduras, algas, vestigios de hongos y partículas sólidas se encuentran en menor cantidad en la miel, (Crane, 1990). En la tabla 1 se muestra un valor medio de los componentes de la miel.

**Tabla 1:** Constituyentes de la miel expresados en porcentaje.

<b>Constituyentes mayores</b>	<b>Promedio (%) 99,0</b>	<b>Rango (%)</b>
Agua	17,0	13,4 – 26,6
Fructosa	39,3	21,7 – 53,9
Glucosa	32,9	20,4 – 44,4
Sacarosa	2,3	0,0 – 7,6
Maltosa	7,3	2,7 – 16,0
Polisacáridos	1,5	0,0 – 8,5
<b>Constituyentes menores</b>	<b>Promedio (%) 1,0</b>	<b>Rango (%)</b>
Ácidos totales	0,57	0,17 – 1,17
Minerales	0,17	0,02 – 1,03
Nitrógeno (en aminoácidos y proteínas)	0,04	0,00 – 0,13
Enzimas	< promedio	< promedio
Constituyentes aromáticos	< promedio	< promedio
Otras sustancias	< promedio	< promedio

(Crane, 1990).

La miel contiene pequeñas cantidades de diferentes enzimas, que son aportadas por las abejas cuando traspasan la miel desde el buche a las celdillas. Las enzimas se encuentran dentro de los componentes más importantes de la miel, no porque sean significativas en la dieta humana, sino porque juegan un rol vital en la producción de miel y en la calidad de ésta (Crane, 1990). Las más importantes son diastasa ( $\alpha$  – amilasa), invertasa ( $\alpha$  – glucosidasa), glucosa - oxidasa, catalasa y fosfatasa ácida. La diastasa rompe las cadenas de almidón liberando dextrinas y maltosa; la invertasa es la enzima responsable de convertir la sacarosa en fructosa y glucosa, azúcares principales de la miel (White, 1975). Los componentes enzimáticos de la miel han sido investigados por años; el principal interés ha sido distinguir entre las mieles naturales y artificiales (White, 1975), sin embargo, enzimas como la diastasa y la invertasa son también utilizadas como indicadores de la frescura y tratamientos térmicos de la miel, debido a que sus actividades disminuyen con los años, almacenamiento inadecuado y calentamiento (Karabournioti *et al.*, 2001).

Karabournioti y colaboradores, en el 2001, menciona que la cantidad de enzima depende de la edad de la abeja, el estado de la colonia, el flujo de néctar, las condiciones del ambiente y las condiciones de práctica de la apicultura. La invertasa ha sido considerada como la enzima más importante presente en la miel, cataliza la reacción de transformación de la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa (Graham, 1993). Otra enzima de importancia nombrada por el mismo autor es la diastasa o amilasa, esta enzima es inestable al calor, por lo cual se utiliza como indicador de calentamiento inapropiado de la miel. Por otra parte, White y colaboradores, en 1964 demostró que la determinación de la actividad de la invertasa es preferible a la de diastasa, dado que pone de manifiesto mayor sensibilidad al calentamiento. Esta enzima es destruida gradualmente por almacenamiento prologado de la miel a cualquier temperatura, por lo tanto también actúa como

indicador de almacenamiento prolongado (Campusano, 1999). Las enzimas otorgan un carácter antiséptico a la miel (Boettcher, 1998). Graham en 1993, señala que la enzima glucosa oxidasa proviene de la glándula faríngea de la abeja y oxida la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, otro autor señala que la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel diluida es la causa de la mayor parte de sus efectos antibacterianos (Bianchi, 1990). En la tabla 2 se presenta un resumen de las principales enzimas presentes en la miel.

La miel contiene diversos minerales, sin embargo su contenido no es muy elevado. Minerales como el calcio y fósforo se encuentran en mayor proporción, seguidos de potasio, sodio, cloruro, magnesio y azufre (Graham., 1993). El contenido de minerales varía de 0,02% a 1%. Este contenido se relaciona con el del néctar y el del polen de las flores ya que es transportado a la colmena adherido al cuerpo de la abeja e incorporado a la miel (Crane, 1990). La miel además presenta un grupo de constituyentes menores como vitaminas A, E, K, C, B1, B2, B6, Niacina, Biotina, Ácido fólico, entre otras; además se ha comprobado que la miel procedente de distintas flores muestra gran variación respecto a su contenido vitamínico y se cree que esto depende sobre todo de la cantidad de polen que contiene la miel (Howes, 1953). La miel contiene también constituyentes del aroma (alcoholes, aldehídos, cetonas, esterres); lípidos (glicéridos, fosfolípidos, ácido palmítico, ácido oléico, ácido láurico, etc.); elementos corpusculares (polen, esporas de hongos, levaduras, etc.) y pigmentos responsables del color (carotenoides, clorofila y xantofila) (Cornejo, 1993).

**Tabla 2:** Principales enzimas presentes en la miel y su función.

<b>Enzima</b>	<b>Función</b>
Invertasa	Convierte la sacarosa a glucosa y fructosa
Diastasa	Hidroliza el almidón a dextrinas y/o azúcar
Glucosa-oxidasa	Convierte glucosa a gluco lactona; éste a su vez produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.
Catalasa	Convierte el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno
Fosfatasa Ácida	Remueve fosfatos inorgánicos de fosfatos orgánicos.

National Honey Board, citado por Aguilar (2001).

Proteínas y aminoácidos también son considerados constituyentes de la miel, se han determinado albúminas, globulinas, peptonas y proteasas (Molina, 1988). Los aminoácidos presentes en la miel derivan de la hidrólisis de las proteínas y del polen, siendo este último la fuente más importante de este componente. La miel sólo contiene nitrógeno en aminoácidos y proteínas en rango de 0,0 – 0,13%, con un promedio de 0,04%, es decir, su aporte nutricional es casi insignificante (Crane, 1990). Dentro de los constituyentes de la miel también se encuentra hidroximetilfurfural, que es un aldehído cíclico ( $C_6H_6O_3$ ) el cual se produce por degradación de los azúcares, principalmente a partir de la deshidratación de la fructosa y de la glucosa en medio ácido, sobre todo a altas temperaturas (Molina, 1988), debido a esto el HMF también se utiliza para determinar el calentamiento excesivo de la miel (Karabournioti *et al.*, 2001). Las diferencias en el contenido de HMF en distintas mieles han sido atribuidas al calentamiento, almacenamiento a temperatura ambiente y adición de azúcares invertidos (Persano *et al.*, 1999). Según Rodgers, citado por Aguilar (2001), la formación de HMF no es específica para la miel sobrecalentada ya que esto ocurre en muchos compuestos y formulaciones que contienen azúcares.

## **2.2 Los carbohidratos.**

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera y a su vez los más diversos. Ciertos glúcidos como el azúcar y el almidón son fundamentales en la dieta humana y la oxidación de éstos es la principal ruta de obtención de energía en las células no fotosintéticas (Binkley, 1988). Las funciones que cumplen en los diversos organismos son energéticas, de ahorro de proteínas, reguladores del metabolismo de las grasas y juegan un importante rol estructural. Desde el punto de vista químico, los carbohidratos son

polihidroxicetonas o polihidroxialdehídos o bien sustancias que dan lugar a estos compuestos después de su hidrólisis (Preis, 1980). En la figura 1 se observan las estructuras químicas de los carbohidratos más comunes. Existen tres clases principales de hidratos de carbono: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos consisten en una sola unidad de polihidroxicetona o polihidroxialdehído; el monosacárido más abundante en la naturaleza es la glucosa. Los oligosacáridos consisten en cadenas cortas de unidades de monosacáridos unidas por enlaces glucosídicos, los más abundantes son los disacáridos siendo el más común de éstos la sacarosa. Los polisacáridos consisten en cadenas largas de cientos o miles de unidades de monosacáridos, como son la celulosa (cadena lineal) o el glucógeno (cadenas ramificadas), los más comunes de este grupo son el almidón y la celulosa fabricados por las plantas (Lehninger, 1995).

### **2.3 Carbohidratos en la miel.**

La fracción de azúcares en la miel generalmente representa niveles que oscilan entre 95 y 99% de los sólidos totales, otorgándole a cada tipo de miel propiedades físicas características, como son el índice de refracción, la actividad de agua, higroscopicidad, tendencia a la granulación, así como su poder rotatorio, refiriéndose éste a la acción de la miel sobre la luz polarizada, la mayoría de las mieles hacen girar a la izquierda el plano de polarización (levógiras) (Jean – Prost, 1995). Los principales azúcares son la glucosa y fructosa (monosacáridos), que componen más del 70% del producto, lo que indica la riqueza de carbohidratos de la miel. Su contenido de azúcares reductores es normalmente 72 a 73%, y a él debe la miel su consistencia

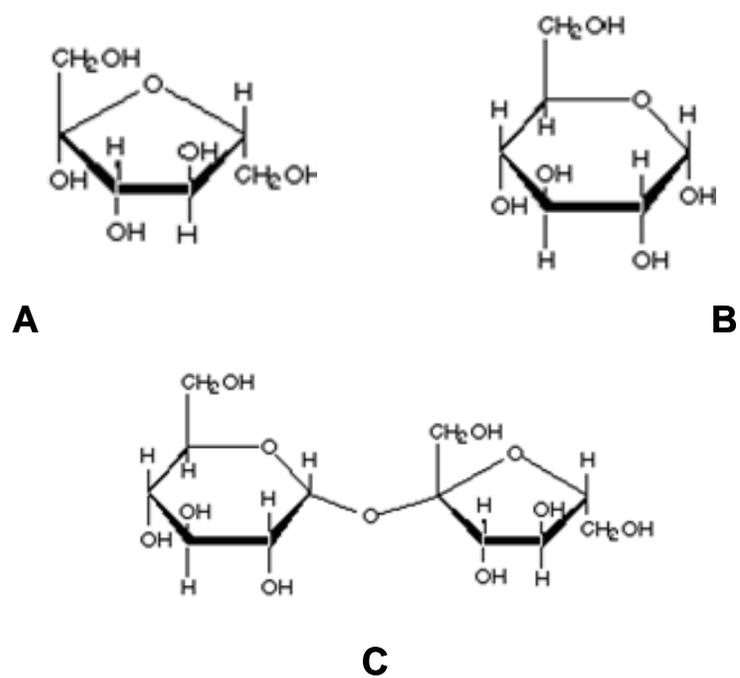


Figura 1: Carbohidratos más abundantes en la naturaleza. Estructura química de los monosacáridos, fructosa (A) y glucosa (B) y del disacárido sacarosa (C).

pegajosa y viscosa, y su alta densidad, (1,3 a 1,4 g/mL), así como también su alto poder edulcorante, 25% más que el azúcar de mesa (Cornejo, 1993).

Los oligosacáridos en la miel son una mezcla compleja de al menos 12 disacáridos, alrededor de 11 trisacáridos, al menos un tetrasacárido y un pentasacárido (Gómez *et al.*, 1999). Persano y colaboradores en 1999, señalan que estos oligosacáridos corresponden a: disacáridos como maltosa, sacarosa, isomaltosa, gentobiosa, maltulosa, trehalosa, turanosa, kojibiosa; trisacáridos y azúcares superiores como, erlosa, isomaltotriosa, maltotriosa, melicitosa, rafinosa, isomaltopentosa. Estos azúcares son derivados de diferentes combinaciones de solo dos monosacáridos, por formación de enlaces, glucosa – glucosa o glucosa – fructosa a través de diferentes átomos de carbono, resultando esto en una alta similitud estructural (Gómez *et al.*, 1999).

Los azúcares son los constituyentes más importantes en la miel, siendo los atributos físicos de la miel determinados por la clase y concentración de éstos. Muchos de los azúcares presentes en la miel no se encuentran en el néctar, si no que se forman durante la maduración y almacenamiento por acción de las enzimas (Bianchi, 1990; White, 1975).

Los carbohidratos de la miel son analizados en muchos casos, para obtener información sobre diferentes aspectos de su calidad, de esta forma se tiene la determinación de azúcares reductores, de sacarosa, azúcar total, y glucosa comercial. Debido a que la glucosa y la fructosa representan más del 90% de todos los azúcares reductores, la proporción fructosa/glucosa y las concentraciones de sacarosa son buenos criterios para diferenciar mieles monoflorales (Bogdanov *et al.*, 1997).

Debido a la importancia de la información nutricional en los alimentos en general, y principalmente la que considera a los carbohidratos por su asociación a patologías como obesidad

y diabetes, resulta primordial contar con métodos adecuados de identificación y cuantificación de los carbohidratos en la miel.

#### **2.4 Técnicas utilizadas para determinar carbohidratos.**

Debido a que los carbohidratos son moléculas hidrosolubles, fuertemente polares y no volátiles, no son separados con facilidad por los métodos de rutina disponibles, ya que no son cromóforos y no logran ser detectados mediante la espectroscopia de absorción. Por lo anterior la derivatización de los carbohidratos se utiliza para favorecer sus características cromatográficas y de absorbancia; sin embargo, este procedimiento puede dar lugar a la formación de múltiples picos para cada analito, como resultado de una derivatización incompleta. Los carbohidratos presentes como mono u oligosacáridos, deben ser derivatizados para poder analizarlos mediante las técnicas de cromatografía de gases. Se han desarrollado diversas técnicas de derivatización que incluyen: la formación de alquil - éteres o alquil - ésteres, así como una trimetil-sililación (Carlson, 1968).

Los métodos de análisis actualmente utilizados para separación, identificación y cuantificación de carbohidratos son: cromatografía de gas (GC), cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y en menor medida, electroforesis capilar (CE). Debido a que son compuestos altamente polares, muy hidrofílicos y muy poco volátiles, antes de ser analizados por métodos de cromatografía de gas, los carbohidratos deben ser convertidos en sus derivados volátiles estables, como derivados trimetilsilil o acetato. Debido a esta razón, se utilizan con mayor frecuencia las técnicas de HPLC (Cheng *et al.* 2006).

Se han utilizado diversos detectores acoplados a los métodos cromatográficos para identificar carbohidratos, como son detector de ionización de llama (FID) y espectrómetro de masa (MS) para GC; detección del índice refractivo (RI), detección de pulsación amperométrica (PAD), detección de la dispersión de luz por evaporación (ELSD) y MS son los detectores más comúnmente usados para HPLC. A pesar de la alta sensibilidad de todos los detectores mencionados, la espectrometría de masa ha sido la más utilizada ya que proporciona los análisis cualitativos y cuantitativos a la vez, debido a su capacidad de identificación molecular y a su alto nivel de sensibilidad (Medeiros & Simoneit, 2007).

Recientemente, la cromatografía líquida (LC) combinada con espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI – MS) ha sido propuesta como un método útil para el análisis de trazas de carbohidratos en medios complejos, como son muestras de aerosol y celulosa modificada por hidrólisis enzimática (Cheng *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2004).

Considerando lo anteriormente expuesto los métodos cromatográficos acoplados a espectrómetro de masa son una buena alternativa para el análisis de carbohidratos, debido a su alta sensibilidad y precisión, por lo tanto se plantea la siguiente hipótesis.

## **2.5 Hipótesis.**

Mediante la técnica de cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa es posible determinar la composición de carbohidratos presentes en miel de abejas.

## **2.6 Objetivo General.**

Evaluar una técnica de cromatografía de gas con detector de masa, para determinar la composición de carbohidratos en miel.

## **2.7 Objetivos Específicos.**

1. Determinar las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de estándares de carbohidratos.
2. Implementar una técnica en cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa para la determinación de carbohidratos en miel de abeja, utilizando una columna capilar altamente polar.
3. Determinar la composición de carbohidratos en muestras de miel.
4. Evaluar la actividad de las enzimas, diastasa, invertasa y glucosa oxidasa en muestras de miel y relacionarlas con su origen botánico.

## MATERIAL Y MÉTODO

### 3.1 Material.

**3.1.1 Muestras de Miel:** Todas las muestras de miel utilizadas tanto para los análisis enzimáticos como para los análisis cromatográficos, fueron muestras centrifugadas provenientes en su mayoría de apiarios de la Región de Los Lagos, y enviadas a análisis polínico correspondiente.

**3.1.2 Reactivos:** En Merck se adquirieron los siguientes reactivos: Piridina, Ácido trifluoroacético, Cloruro de hidroxilamina, Metanol, Tolueno, Hexano, Ácido clorhídrico, Fructosa, Sacarosa, Trehalosa, Cloruro de Sodio, Ácido acético glacial, Fenofaleína, Fosfato hidrógeno disodio dihidratado, Yoduro de potasio, Tris – (hidroximetil) aminometano, acetato de sodio trihidratado; en Sigma se adquirieron: Hexametildisilazano, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido y Melibiosa. Además se utilizó: Fosfato hidrogeno de potasio (Fluka), Almidón anhidro (Riedel De Haën AG), Glucosa (Mallinckrodt Chemical), Maltosa (BDH Chemicals), Celobiosa (Calbiochem), N,O -Bis (Trimetilsilil)Trifluoroacetamida + Trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS) (SUPELCO), Hidróxido de sodio (Winkler Ltda), Filtros de acetato de celulosa (0,45  $\mu$ m) (MFS).

**3.1.3 Soluciones:** Para el análisis cromatográfico de estándares de carbohidratos se utilizó:

Solución de piridina: contiene 12 mg / mL de cloruro de hidroxilamina (reactivo de oxima).

Solución silanizante: solución de BSTFA + TMCS al 5% en tolueno, con la cual se silanizó el material de vidrio utilizado.

Para la determinación de Invertasa en miel se prepararon según protocolo (Bogdanov *et al.*, 1997) las siguientes soluciones:

Solución Tampón (pH 6,0): Se disolvieron 2,332 g de fosfato hidrógeno de potasio y 0,512 g de fosfato hidrógeno disodio en agua destilada hasta un volumen de 200 mL.

Solución de Sustrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido: Se disolvieron 0,15063 g de pNPG en solución tampón hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Para lograr la completa disolución se calentó la solución sin exceder los 60°C.

Solución de término de la reacción: Se disolvieron 9,0855 g de tris - (hidroximetil) aminometano en agua destilada y se diluyó a 25 mL. Se ajustó a pH 9,5 con ácido clorhídrico 3 M.

Para la determinación de Diastasa en miel se prepararon según protocolo (Bogdanov *et al.*, 1997) las siguientes soluciones:

Solución patrón de yodo: Se disolvieron 8,8 g de yodo sublimado y 22 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua destilada, y se diluyó hasta 1 litro.

Solución Tampón de acetato (pH 5,3): Se disolvieron 87 g de acetato de sodio trihidratado y 10,5 g de ácido acético glacial en 500 mL de agua destilada.

Solución de almidón al 2%: Se disolvieron 2 g de almidón anhidro en 100 mL de agua destilada. Se llevó a ebullición por 3 minutos, con agitación constante, y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Solución de cloruro de sodio: Se disolvieron 14,5 g de NaCl en 500 mL de agua destilada hervida (libre de CO<sub>2</sub>).

Solución de yodo 0,0007 N: Se disolvieron 20 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua destilada, se adicionaron 5 mL de solución patrón de yodo y se diluyó hasta 500 mL con agua destilada. Esta solución fue estandarizada de la siguiente manera: 5 mL de la solución de almidón al 2% se diluyó con 10 mL de agua destilada, 1 mL de esta solución diluida se adicionó a matraces que contenían 10 mL de la solución de yodo 0,0007 N y una cantidad de agua destilada necesaria para obtener valores de absorbancia de  $0,760 \pm 0,02$ . El volumen de agua utilizado fue el mismo utilizado para medir la absorbancia en las muestras.

**3.1.4 Equipos e instrumentos:** El desarrollo de la parte experimental fue realizado en el Laboratorio de Fitoquímica, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, en el cual se utilizaron los siguientes equipos e instrumentos:

- Cromatógrafo de gases, modelo CP-3800, columna capilar VF-23ms de longitud: 60 metros; diámetro interno: 0,25 mm; y film: 0,25  $\mu$ m (VARIAN).
- Espectrómetro de masas modelo Saturn 2200 GC/MS/MS, con inyector automático modelo CP-8410, (VARIAN).
- Software, Varian Chromatography Workstation, Star System Control version GC/MS 6.5.
- Software NIST 98 MS Library Database in Saturn Format.

- Espectrofotómetro marca Milton Roy, Spectronic 3000, Array.
- pHmetro marca Cole Palmer modelo DigipHase.
- Micro centrífuga marca Denver Instrument.
- Baño termostático marca VWR internacional.
- Baño ultrasonido Cole Palmer, rango 47 Khz.
- Balanza Analítica Sartorius, Modelo A 200S con grado de precisión de 0,0001g.
- Balanza Sartorius, Modelo PT1200, con grado de precisión de 0,1 g.
- Agitador marca Mixer.

## **3.2 Métodos.**

**3.2.1 Preparación de estándares de carbohidratos:** Se prepararon diluciones de los estándares de carbohidratos de la forma descrita en el método Pierce – Pourtallier (Bogdanov *et al.*, 1997). Los estándares se prepararon en las siguientes concentraciones: Glucosa (5.000 ppm), Fructosa (5.000 ppm), Sacarosa (2.500 ppm), Maltosa, Melibiosa, Trehalosa y Celobiosa (1.500 ppm). Estas diluciones se prepararon con una solución de 25% metanol en agua destilada, posteriormente se filtraron con un filtro de acetato de celulosa.

**3.2.2 Separación cromatográfica de estándares de carbohidratos:** Para el análisis cromatográfico se usó como referencia el protocolo aceptado por la comisión europea de miel (Bogdanov *et al.*, 1997) y se realizaron algunas modificaciones a la metodología de acuerdo a los equipos y condiciones del laboratorio existente.

Un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de carbohidrato se transfirió a un vial de 2 mL. Posteriormente la muestra se secó con una corriente de nitrógeno a 50°C, para eliminar el contenido de agua (aproximadamente 20 minutos). Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de oxima, se mezcló por vórtex y se incubó por 30 minutos a una temperatura de 70 – 75°C. Posteriormente la muestra se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de hexametildisilazano y 10  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado este tiempo se transfirió el contenido a tubos eppendorf y se centrifugó por 3 minutos a 6000 rpm. Luego se extrajo el sobrenadante y se transfirió a viales de 1,5 mL para inyección automática. Un esquema del procedimiento se muestra en la figura 2.

Se inyectaron 0,5  $\mu\text{L}$  de estándar dentro de la columna capilar utilizando el modo split (partición de la muestra, antes de entrar a la columna), con la finalidad de obtener una mejor resolución de los picos. Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 1,0 mL/min, y una temperatura de inyector de 250°C. Las temperaturas del detector fueron: línea de transferencia 250°C, multiplicador 80°C y trampa de iones a 200 °C, respectivamente. Las temperaturas del horno de columna fueron ajustadas como se indica en la tabla 3.

**3.2.3 Determinación de carbohidratos en muestras de miel:** Se prepararon diluciones de la miel de la forma descrita en el método Pierce – Pourtallier (Bogdanov *et al.*, 1997). Las muestras de miel se prepararon, pesando 1,5 g y diluyendo a 250 mL en agua destilada, posteriormente se filtraron con un filtro de acetato de celulosa. Un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de la solución fue sometido al mismo protocolo descrito para los estándares como se describe en el método Pierce – Pourtallier. También se prepararon mieles fortificadas adicionando una concentración conocida de cada carbohidrato.

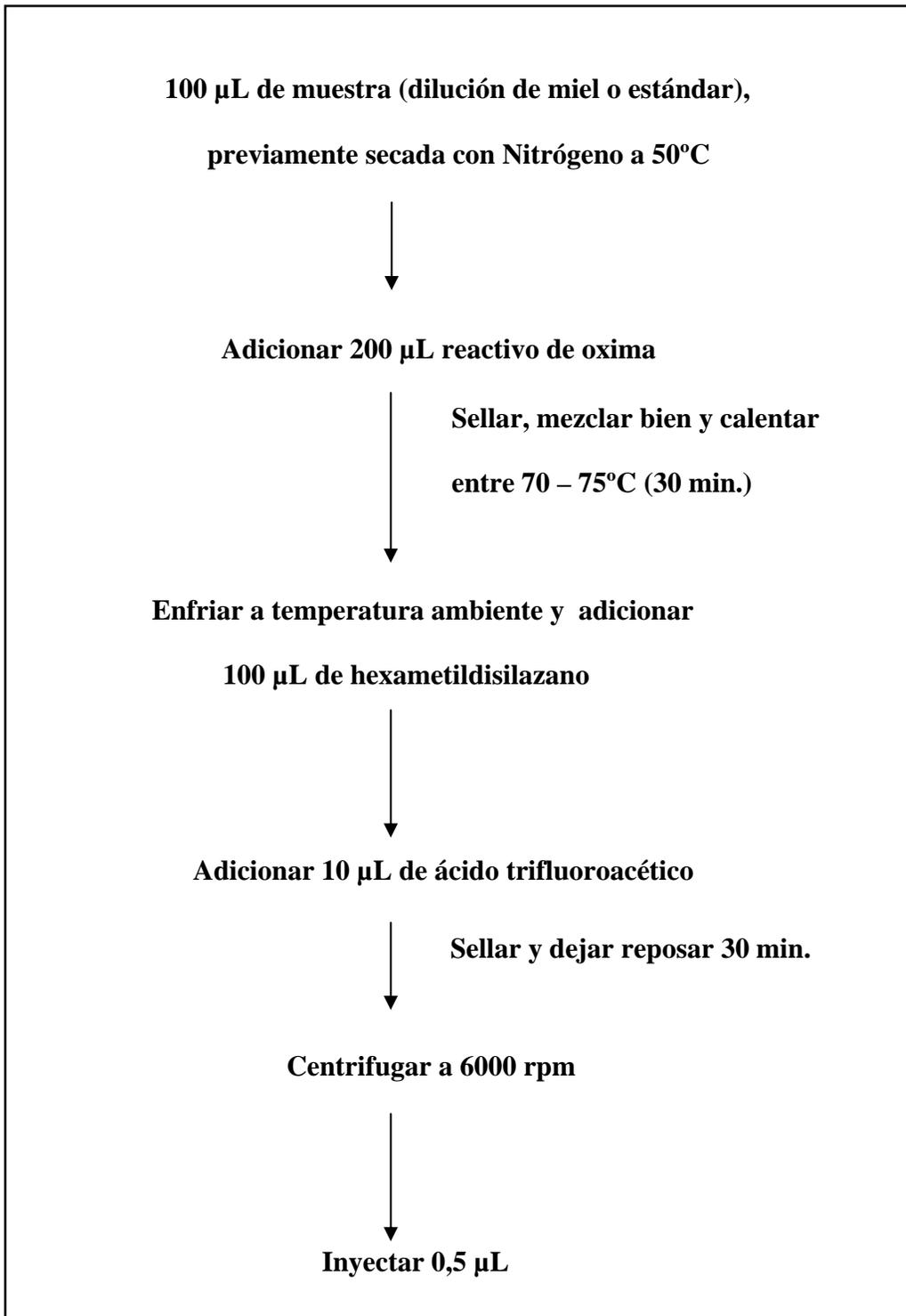


Figura 1: Esquema del método Pierce – Pourtallier. Método utilizado para el análisis cromatográfico de los carbohidratos.

**Tabla 3:** Temperaturas del horno de la columna utilizadas para el análisis de carbohidratos.

Temperatura (°C)	Aumento (°C/min.)	Tiempo de espera (min.)	Total (min.)
120	-	2,00	2,00
170	20,0	0,00	4,50
190	5,0	0,00	8,50
220	20,0	0,00	10,00
250	2,5	3,00	25,00

**3.2.4 Análisis por espectrometría de masa de los estándares de carbohidratos:** El cromatógrafo de gas utilizado en los análisis se encontraba acoplado a un espectrómetro de masa, obteniéndose de esta forma el cromatograma y el espectro de masa simultáneamente. Se utilizó el método de ionización por impacto electrónico ajustándose el encendido del filamento seis minutos después de la inyección de la muestra y el rango de detección de iones entre  $m/z$  70 y 650. Los espectros fueron analizados mediante el Software Varian Chromatography Workstation.

**3.2.5 Determinación de la actividad de diastasa en miel:** La determinación de la enzima diastasa en miel se realizó mediante el protocolo aprobado por la comisión europea de miel (Bogdanov *et al.*, 1997). El principio de la técnica se basa en la unidad de actividad diastásica, °Goethe (°G), que es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar una solución de almidón al 1% hasta un punto final en 1 hora a 40°C. La determinación se realizó utilizando una solución estándar de almidón capaz de generar un complejo coloreado en presencia de yodo. Por la acción de la enzima presente en la muestra de miel bajo condiciones estándar, se produce una disminución del color azul que es medido a intervalos de tiempo a una absorbancia de 660 nm.

Preparación de la muestra: Se pesaron 10 g de miel en un vaso de precipitado de 50 mL y se adicionó 5 mL de la solución tampón de acetato y 20 mL de agua destilada. La miel se disolvió mediante agitación y luego se adicionaron 3 mL de cloruro de sodio y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua destilada.

Determinación: Se transfirieron 10 mL de la solución de miel a un tubo de 50 mL y se incubaron a baño maría (40°C). Después de 15 minutos, se adicionaron 5 mL de la solución de almidón, éste se consideró como el tiempo inicial de la reacción. Luego de 5 minutos, se tomó 1 mL de esta solución y se le adicionó a 10 mL de la solución de yodo diluida (0,0007 N).

Finalmente se adicionó el volumen de agua destilada determinada en la estandarización de almidón y se midió la absorbancia a 660 nm a intervalos de tiempo por una hora hasta obtener una absorbancia menor a 0,235.

La actividad diastásica se calcula como número diastásico (DN), que corresponde al número de la escala Gothe. Este número expresa la cantidad de diastasa como volumen de almidón al 1% hidrolizado por la enzima en 1 gramo de miel en 1 hora a una temperatura de 40°C. Esto se obtiene a través de la siguiente fórmula:

$$\text{DN} = \frac{60 \text{ min}}{t_x} \times \frac{0,1}{0,01} \times \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t_x}$$

$$\text{DN} = \text{mL de sol. de almidón (1\%)} / \text{g miel} / \text{hora a } 40^\circ\text{C}$$

$t_x$  = es el tiempo de reacción en minutos.

$$\text{Factor 300} = \frac{100 \text{ mL}}{2 \text{ g de almidón}} \times \frac{50 \text{ mL}}{10 \text{ g almidón}} \times \frac{60 \text{ min.}}{5 \text{ mL almidón} \times 10 \text{ mL miel}}$$

Para obtener DN se realizó un gráfico de absorbancia vs tiempo en minutos. De la recta resultante se determinó el tiempo en que la mezcla alcanza una absorbancia de 0,235. También se puede utilizar una ecuación de regresión lineal para determinar  $t_x$ . Se divide 300 por el tiempo en minutos requeridos para obtener una absorbancia de 0,235.

**3.2.6 Determinación de la actividad de invertasa en miel:** La determinación de Invertasa en las muestras de miel se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito por Bogdanov y colaboradores en 1997. El método se basa en la degradación del sustrato p - nitrofenil -  $\alpha$  - D - glucopiranosido a glucosa y p - nitrofenol, éste último es transformado a nitrofenolato al adicionar una solución de término (pH 9,5). El nitrofenolato es determinado fotocolorimétricamente a 400 nm, de esta forma se obtiene la cantidad de sustrato convertido por la enzima en un intervalo de tiempo. La actividad de la enzima se expresa en unidades, donde una unidad se define como la cantidad de enzima que permite transformar un micromol de sustrato degradado en un minuto por kilogramo de miel. La actividad también puede ser expresada como número invertásico.

Preparación de la muestra: Se pesaron 5 g de miel y se disolvió con solución tampón hasta un volumen final de 25 mL.

Determinación: Se incubaron 5 mL de la solución de sustrato a 40°C durante 5 minutos, posteriormente se adicionaron 0,5 mL de la solución de miel, este se consideró como el tiempo de partida de la reacción. Se mezcló por algunos segundos y se incubó por 20 minutos a 40°C, pasado este tiempo se adicionó 0,5 mL de la solución de término de la reacción, se mezcló y se enfrió a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 400 nm en espectrofotómetro a intervalos de tiempo durante 1 hora. Con cada muestra y en paralelo se preparó un blanco de muestra. Los blancos se prepararon adicionando la solución de miel (que contiene la enzima) posterior a la solución de término y a la solución sustrato.

La cantidad de p - nitrofenol en  $\mu\text{M}$  producido durante el análisis, corresponde exactamente a la cantidad de sustrato en  $\mu\text{M}$  utilizados. La actividad invertásica de la miel, se

calculó a partir de la absorbancia a 400 nm y los resultados se expresaron en unidades por kilogramo de miel mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{U/kg} &= 6 \times 0,05 \times 0,05298 \times 104 \times \Delta A_{400} \\ &= 158,94 \times \Delta A_{400} \end{aligned}$$

$$1 \text{ U/kg} = \frac{1 \mu\text{mol de p-NPG}}{\text{minutos} \times \text{Kg miel}}$$

Donde:

U : Es una unidad internacional con una utilización definida de 1  $\mu\text{M}$  por minuto.

6 : Es el factor para los mililitros de solución de muestra usada (volumen total).

0,05 : Convierte el tiempo de reacción desde 20 a 1 minuto.

104 : Convierte la cantidad de miel tomada (0,1 g en 0,5 mL) a 1 kg.

0,05298 : Es el factor de conversión para  $\mu\text{g}$  en  $\mu\text{M}$  por mL, donde 7,37 es el factor para p - nitrofenol desde el correspondiente gráfico.

Sin embargo, la actividad de la invertasa es comúnmente expresada como número invertasa (IN); éste indica la cantidad de sacarosa hidrolizada por gramo de miel en 1 hora por las enzimas contenidas en 100 g de miel bajo las condiciones del análisis.

Si la actividad invertásica se determina simultáneamente por el método descrito anteriormente y por el método polarimétrico, la relación mostrada entre IN y  $\Delta A_{400}$  resulta:

$$\text{IN} = 21,64 \times \Delta A_{400}$$

Donde 21,64 es la pendiente de la recta del gráfico de  $\Delta A_{400}$  v/s IN.

**3.2.7 Determinación de actividad glucosa-oxidasa en miel:** La glucosa-oxidasa es una enzima secretada por las glándulas hipofaríngeas de la abeja para oxidar la glucosa a glucolactona y luego a ácido glucónico (principal ácido orgánico de la miel) más peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El método para medir la actividad de glucosa-oxidasa en miel se basa en la neutralización con hidróxido de sodio 0,1 N del ácido glucónico generado después de 48 horas, en una muestra de miel previamente neutralizada.

El procedimiento se llevó a cabo en dos etapas:

1. Neutralización de la acidez de la miel: Se pesaron 10 g de miel y se disolvieron en 75 mL de agua destilada libre de  $CO_2$ , se adicionaron 3 gotas de fenoftaleína y esta solución se tituló con hidróxido de sodio 0,1 N.
2. Medición de la actividad enzimática: La solución neutralizada se dejó a temperatura ambiente por 48 horas, pasado este período se midió la actividad de la glucosa-oxidasa, para lo cual se realizó una nueva titulación con hidróxido de sodio 0,1 N. El volumen gastado indica los miliequivalentes de ácido glucónico producido por la acción de la glucosa-oxidasa de la miel. Si el cambio de color se produce con la primera gota de hidróxido de sodio añadido, se puede concluir que la enzima fue destruida por el calor o bien la miel lleva largo tiempo almacenada. Los mL de hidróxido de sodio utilizados en ésta titulación permitieron expresar la actividad de glucosa-oxidasa en miliequivalentes de glucosa oxidasa/ kg de miel, según la siguiente fórmula:

$$\text{meq de glucosa oxidasa / kg} = \frac{V \times N \times 1000}{10}$$

Donde:

V : Volumen de NaOH 0,1N gastado en la titulación.

N : Normalidad del NaOH.

1000 : Factor de conversión a 1 kg de miel.

10 : Peso de la muestra.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Optimización de los parámetros cromatográficos para el análisis de carbohidratos.

Los carbohidratos son moléculas hidrosolubles, fuertemente polares y no volátiles, debido a esto no son separados con facilidad por los métodos de rutina disponibles, por lo cual la derivatización de estas moléculas es necesaria de manera de favorecer sus características cromatográficas, con el inconveniente que este procedimiento puede dar lugar a la formación de múltiples picos para cada analito, como resultado de una derivatización incompleta. Los carbohidratos presentes como mono u oligosacáridos, deben ser derivatizados para poder analizarlos mediante las técnicas de cromatografía de gases. Se han desarrollado diversas técnicas de derivatización que incluyen: la formación de alquil - éteres o alquil - ésteres, así como una trimetil-sililación (Carlson, 1968). Por esta razón el primer paso a seguir en la determinación cromatográfica de los carbohidratos fue someter a una derivatización los estándares, convirtiéndolos a sus oximas y posteriormente a sus derivados trimetil sililados (Figura 3).

Para obtener un método por medio del cual se pudiera lograr una buena separación cromatográfica de los siete estándares analizados se probaron distintas modificaciones de los parámetros de las corridas. Considerando las posibles concentraciones de estos carbohidratos en miel se hicieron pruebas con distintas concentraciones. Así se llegó a determinar las concentraciones de trabajo, así como también tiempos de corrida, encendido del filamento, modo split, rampas de temperaturas, obteniéndose en un principio picos poco definidos de base muy ancha y línea base muy poco regular.

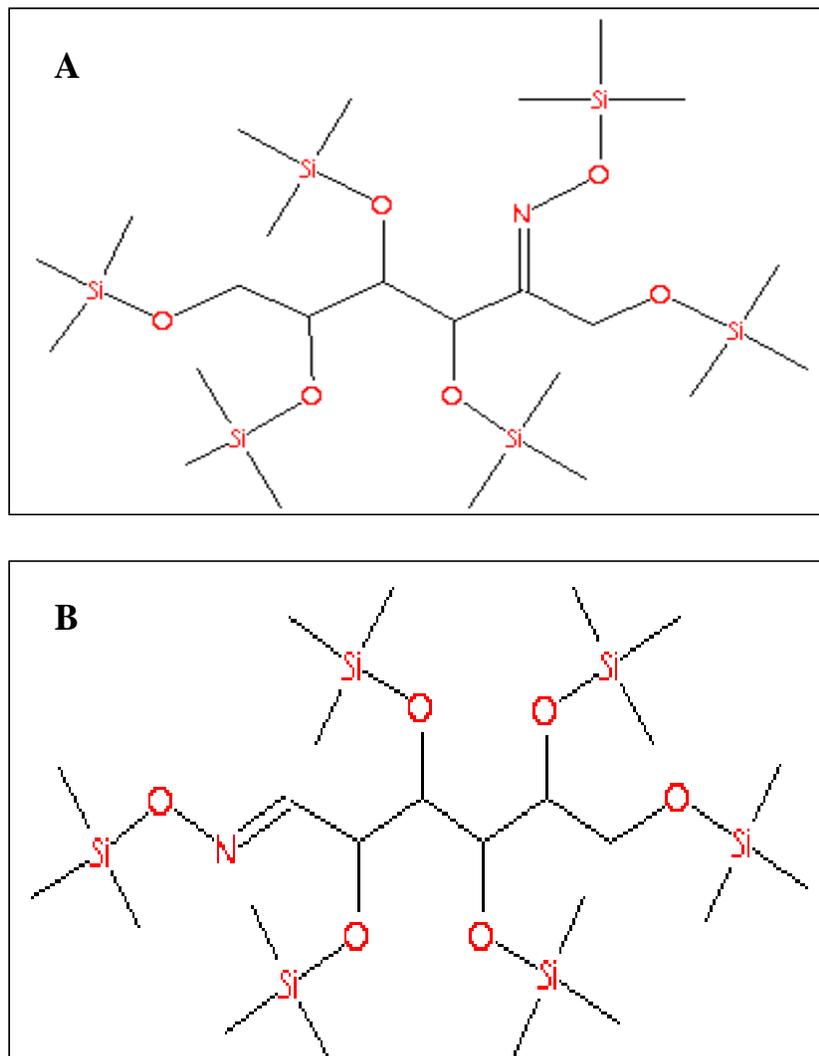


Figura 1: Estructuras químicas de los monosacáridos derivatizados. (A) Fructosa oxima hexaquis trimetil silil; (B) Glucosa oxima hexaquis trimetil silil.

Otro problema encontrado fue la superposición de picos, como en el caso de fructosa y glucosa, los cuales en un comienzo se superponían impidiendo su separación. Finalmente esta separación se logró variando los tiempos y temperaturas en la zona de elución de estos estándares. Casos como el de celobiosa y maltosa no fueron posibles de mejorar debido a que estas dos moléculas son isómeros estructurales.

#### **4.2 Análisis Cromatográfico.**

Al realizar el análisis cromatográfico de los estándares se obtuvieron los perfiles de los siete carbohidratos evaluados y por medio de éstos se determinaron sus tiempos de retención.

La primera etapa del análisis cromatográfico fue encontrar una rampa de temperatura adecuada para obtener una buena separación e identificación de los carbohidratos. Se analizaron inicialmente los estándares por separado, mediante las condiciones de temperatura del horno de columna detallado anteriormente; de esta manera se obtuvieron los tiempos de retención de cada uno, como se pueden apreciar en la tabla 4.

Con la finalidad de evaluar la separación obtenida para los estándares por separado, considerando que en una muestra de miel los carbohidratos estarán en una mezcla, se generó una figura con la superposición de todos los cromatogramas de los carbohidratos analizados (figura 4). Mediante la cual se observó una clara separación de los monosacáridos, fructosa y glucosa, así como también de los disacáridos sacarosa, trehalosa y melibiosa. En el caso de celobiosa y maltosa se observó una superposición de la señal de maltosa sobre el pico de menor intensidad de celobiosa. Con esta primera aproximación se determinó que este método podría ser efectivo para la separación de por lo menos cinco de los carbohidratos analizados.

**Tabla 4:** Tiempo de retención de los estándares de carbohidratos analizados.

<i>Carbohidrato</i>	Tiempo de Retención (min.)
Fructosa	7,876
Glucosa	8,245
Sacarosa	13,389
Trehalosa	14,011
Celobiosa	14,950
Maltosa	15,114
Melibiosa	16,528

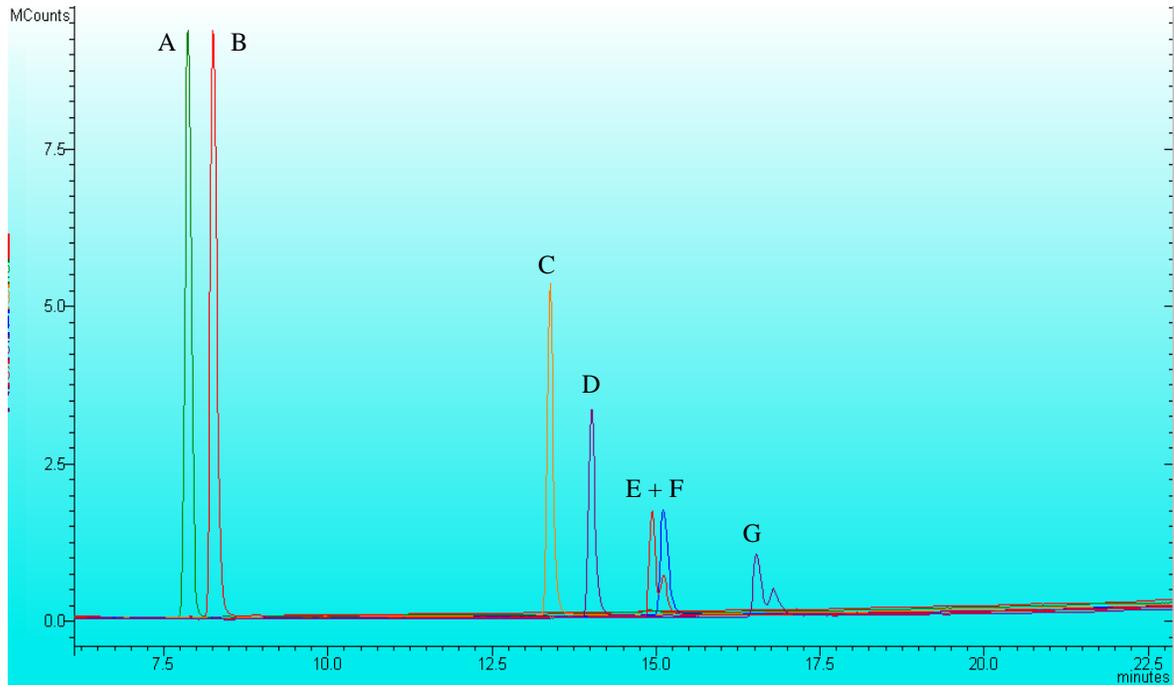


Figura 4: Superposición de los cromatogramas de los estándares. (A) fructosa (5000 ppm); (B) glucosa (5000 ppm); (C) sacarosa (2500 ppm); (D) trehalosa (1500 ppm); (E+F) celobiosa (1500 ppm) y maltosa (1500 ppm) y (G) melibiosa (1500 ppm). Se puede observar la clara separación obtenida para cinco de los estándares, excepto para los disacáridos celobiosa y maltosa. En el eje x se aprecia el tiempo de elución en minutos y en el eje y las megacuentas que corresponden a una medida de intensidad de la señal. Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

Como la miel es una mezcla de monosacáridos y una gran diversidad de oligosacáridos, los cuales se encuentran en distintas concentraciones, fue necesario analizar una mezcla de estándares, simulando en alguna medida la composición de la miel, de esta manera se logró evaluar el funcionamiento del método en presencia de una mezcla de azúcares. De esta forma se obtuvo el perfil cromatográfico de una mezcla de carbohidratos (figura 5) en el cual se utilizaron las mismas concentraciones utilizadas para el análisis de los estándares individuales. En este cromatograma se pudo apreciar claramente la separación lograda de los monosacáridos fructosa y glucosa y de los disacáridos sacarosa, trehalosa y melibiosa. Mediante este análisis se pudo observar la superposición de los disacáridos celobiosa y maltosa. La dificultad de separación de estos disacáridos se podría deber a su gran similitud estructural (figura 6).

#### **4.3 Análisis mediante espectrometría de masa.**

En paralelo a la obtención de los cromatogramas de los carbohidratos analizados se obtuvieron sus espectros de masa, los cuales permitieron determinar los iones característicos para estas moléculas bajo las condiciones de análisis.

Para evaluar estos resultados se contó con datos descritos anteriormente, bajo condiciones experimentales similares (Sanz *et al.*, 2002, Medeiros – Simoneit, 2007), así como también con el Software NIST 98 MS Library Database, donde se obtuvo información acerca de los iones característicos para algunos carbohidratos en sus formas oxima trimetil silil. Con esta información se pudo realizar una comparación de los resultados obtenidos en cuanto a la composición de los iones presentes en los espectrogramas de las muestras analizadas.

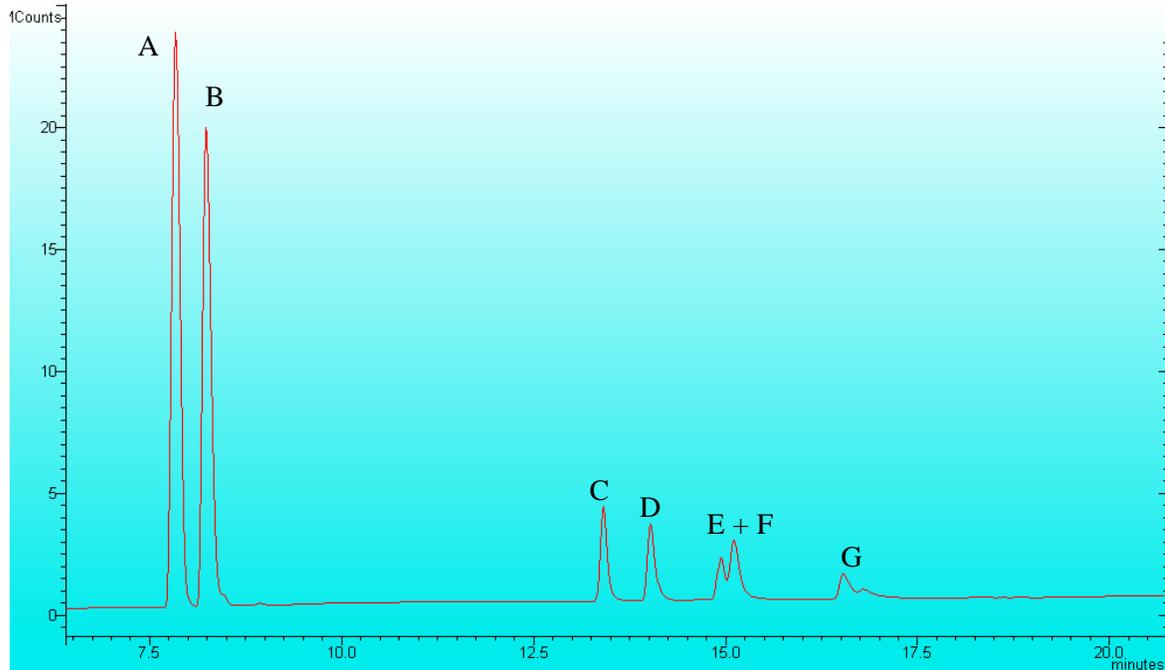


Figura 5: Perfiles cromatográficos de las oximas trimetil sililadas de carbohidratos. Los picos fueron identificados como: (A) fructosa (5000 ppm); (B) glucosa (5000 ppm); (C) sacarosa (2500 ppm); (D) trehalosa (1500 ppm); (E+F) celobiosa (1500 ppm) y maltosa (1500 ppm) y (G) melibiosa (1500 ppm). En el eje x se aprecia el tiempo de elución en minutos y en el eje y las megacuentas que corresponden a una medida de intensidad de la señal. Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

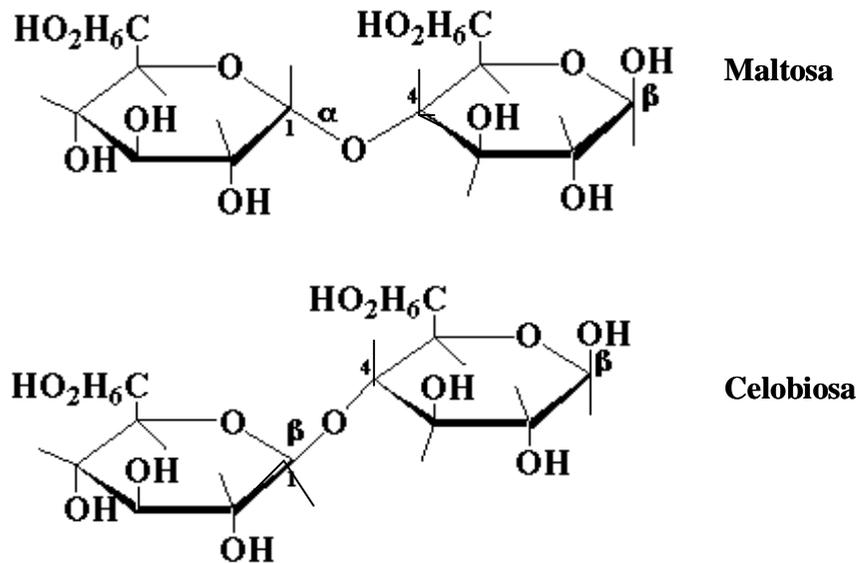


Figura 6: Estructuras moleculares de los disacáridos maltosa y celobiosa. Estos disacáridos están compuestos por dos moléculas de glucosa unidas por el C1 de una de ellas y el C4 de la otra, diferenciándose únicamente en la configuración del enlace glicosídico. La maltosa presenta un enlace  $\alpha$  (1 – 4) glicosídico y la celobiosa un enlace  $\beta$  (1 – 4) glicosídico.

En la figura 7 se presenta el espectro de masa obtenido para fructosa; se observan los iones de mayor abundancia,  $m/z$  217 y 73. En la figura 8 se observa el espectro de masa obtenido para glucosa, apreciándose los iones de mayor abundancia  $m/z$  319; 73; 147; 217 y 320. El espectro de masa obtenido para el disacárido sacarosa permitió determinar los iones de mayor abundancia para este carbohidrato, que fueron:  $m/z$  361, 362 y 73 (figura 9). En la figura 10 se observa el espectro de masa para el disacárido trehalosa, a través del cual se determinan los iones  $m/z$ , 361; 362 y 73, como los de mayor abundancia. En el espectro de masa obtenido para el pico de mayor señal de celobiosa (figura 11), se determinó que los iones de mayor abundancia fueron:  $m/z$  361, 73, 204, 147, 217 y 362. En la figura 12 se observa el espectro de masa obtenido para el estándar de maltosa, apreciándose los iones  $m/z$  361, 73 y 362, como los de mayor abundancia. Finalmente en la figura 13 se observa el espectro de masa obtenido para el pico de mayor señal de melibiosa, desde el cual se determinaron los iones  $m/z$  361, 73, 204, 217, 147, 305, 205 y 362 como los de mayor abundancia.

El análisis de espectrometría de masa de los carbohidratos se utilizó para confirmar la identidad de los picos obtenidos en los cromatogramas, así se podrían utilizar los parámetros de tiempo de retención y composición iónica de los espectros de masa, para la identificación de estas moléculas. En la tabla 5, se presenta un resumen de los iones de mayor abundancia observados para cada uno de los carbohidratos analizados.

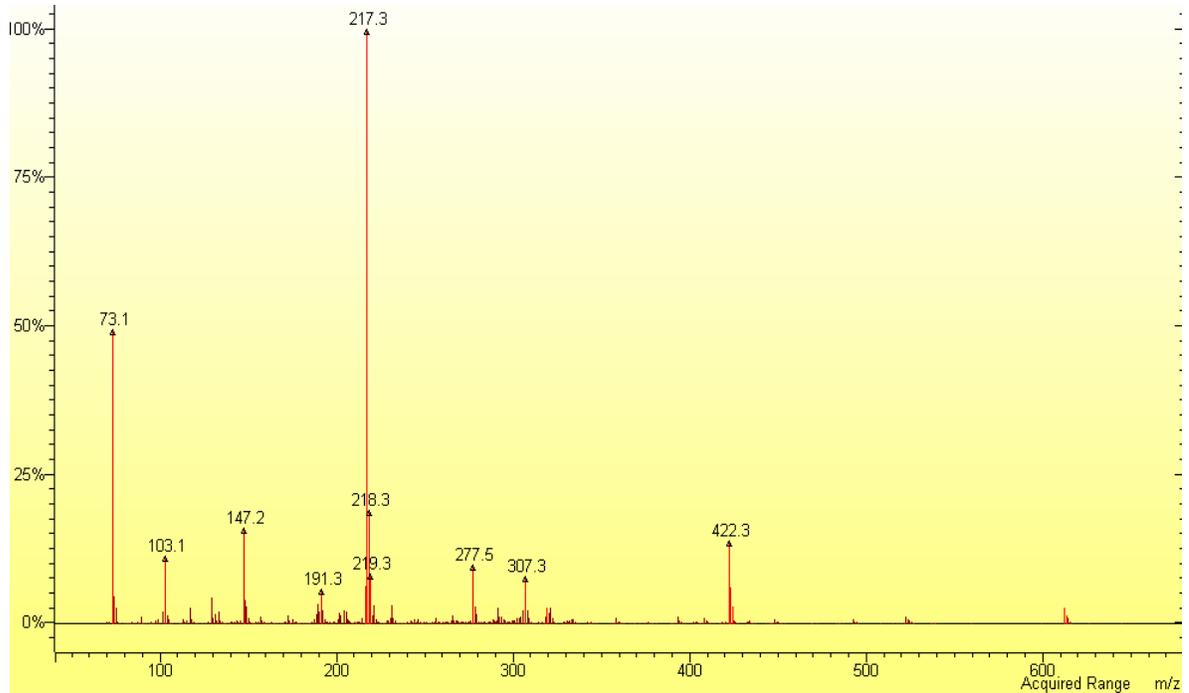


Figura 7: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de fructosa. Se aprecian los iones  $m/z$  217 y 73 de mayor abundancia, acompañados de varios otros de menor abundancia. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

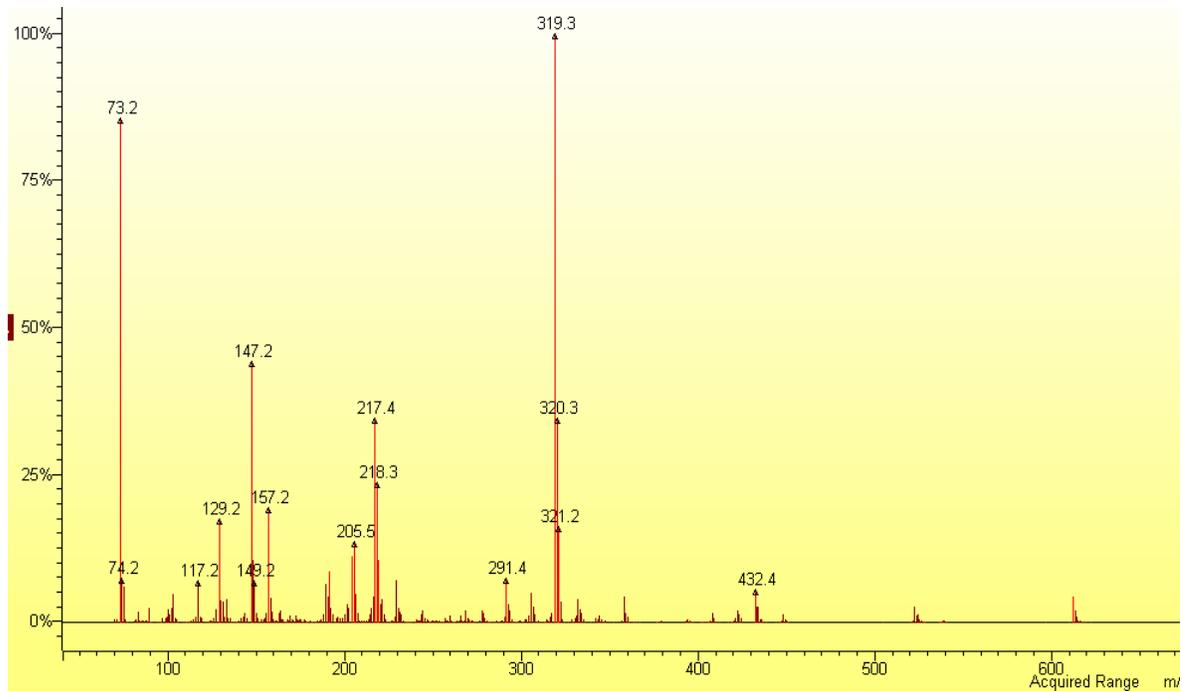


Figura 8: Espectro de masa obtenido en el análisis del monosacárido glucosa. Se observan los iones de mayor abundancia  $m/z$  319, 73, 147, 217 y 320. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

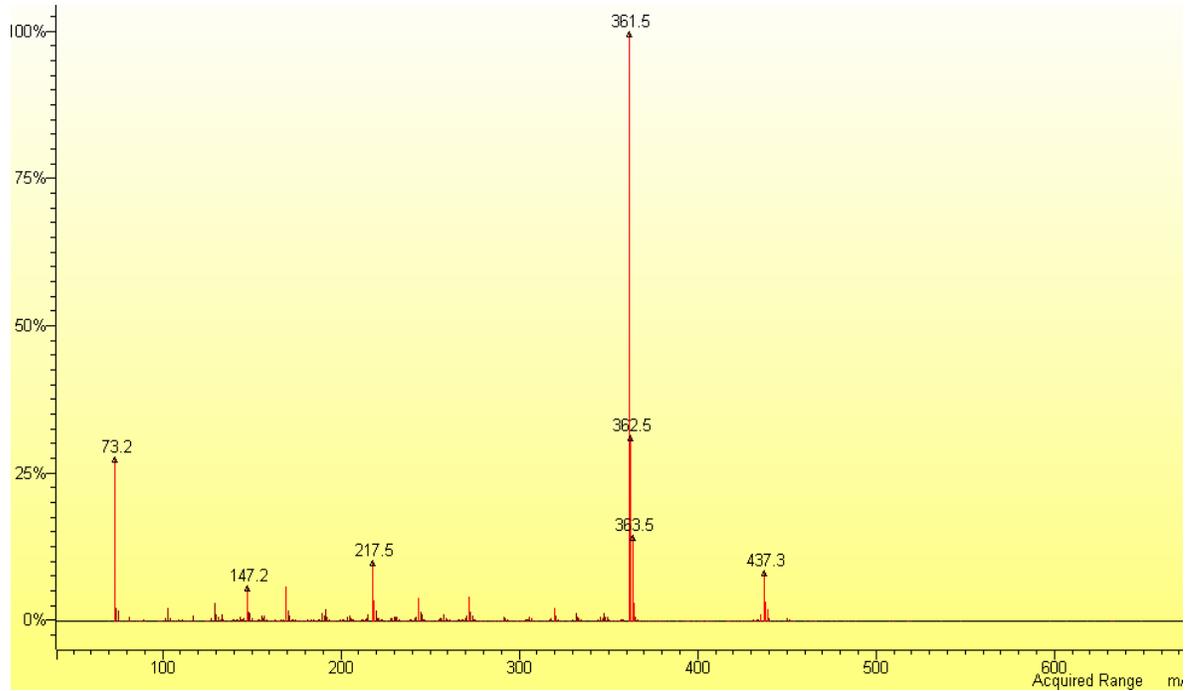


Figura 9: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de sacarosa. Se pueden observar los iones más abundantes  $m/z$  361, 362 y 73. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

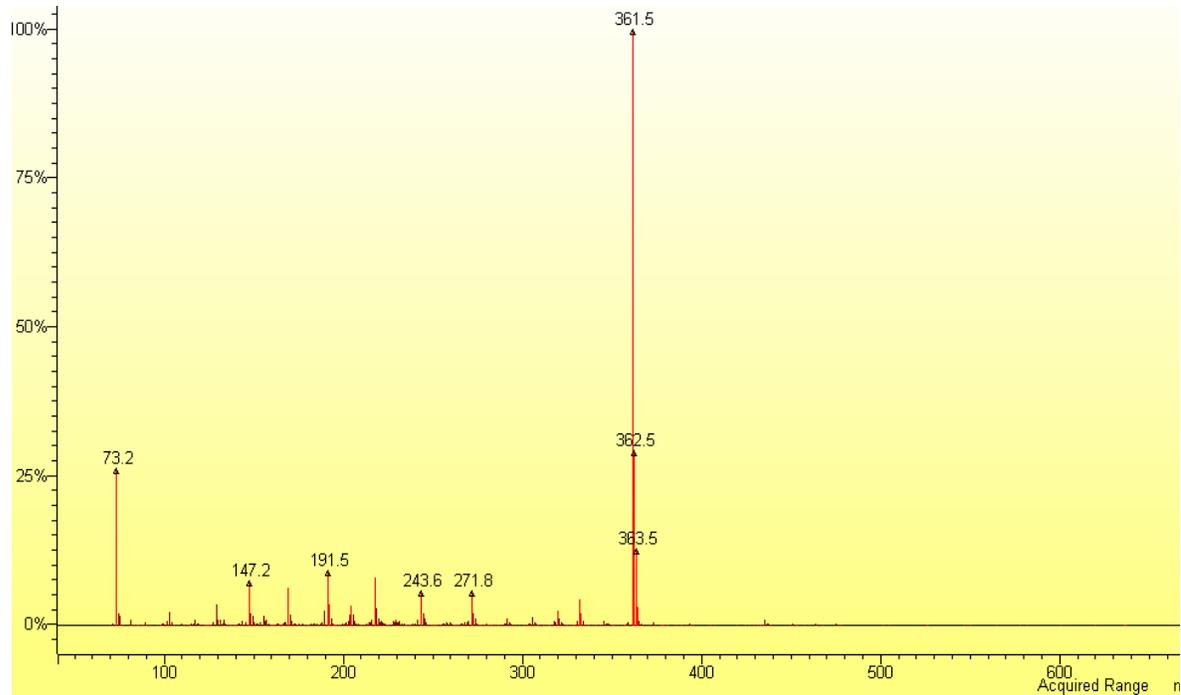


Figura 10: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de trehalosa. Se pueden observar los iones de mayor abundancia  $m/z$  361, 362 y 73. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

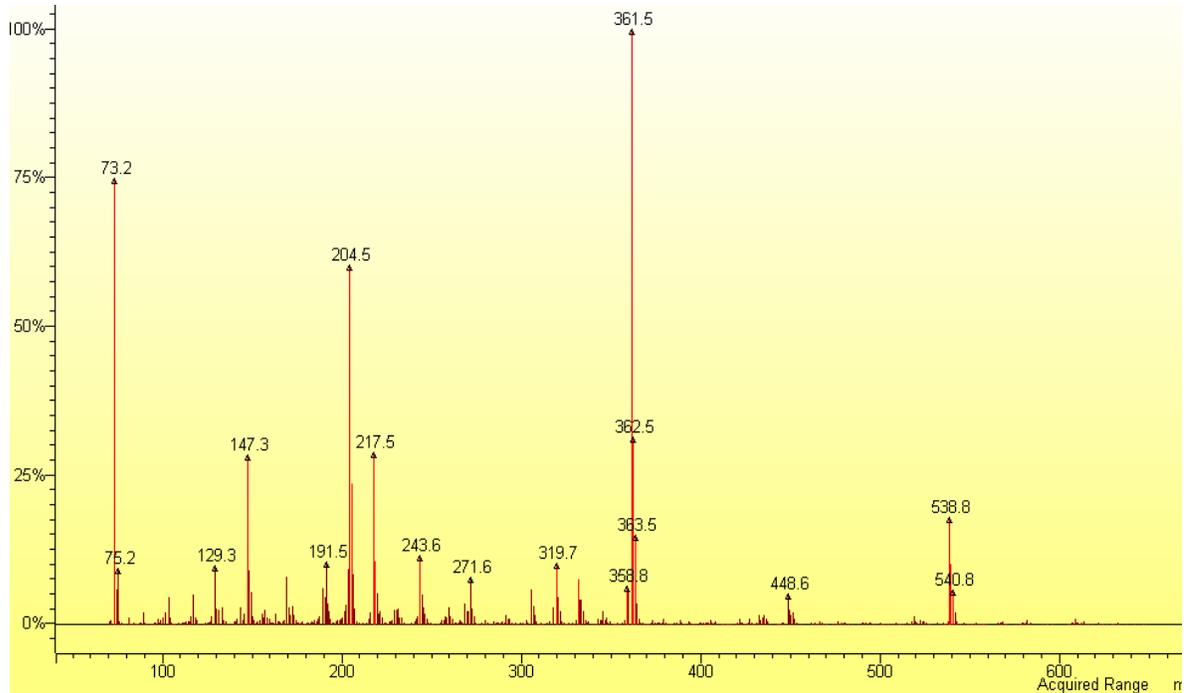


Figura 11: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de celobiosa. Se pueden observar los iones de mayor abundancia  $m/z$  361, 73, 204, 147, 217 y 362. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

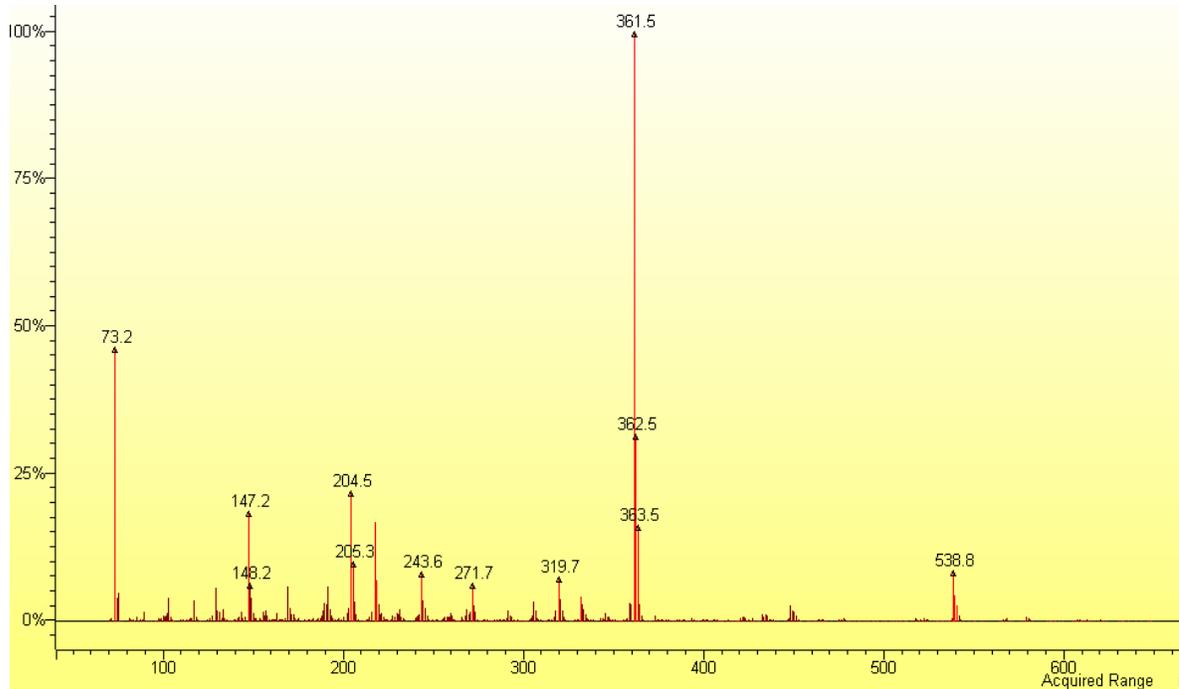


Figura 12: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de maltosa. Se pueden observar los iones de mayor abundancia  $m/z$  361, 73 y 362. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

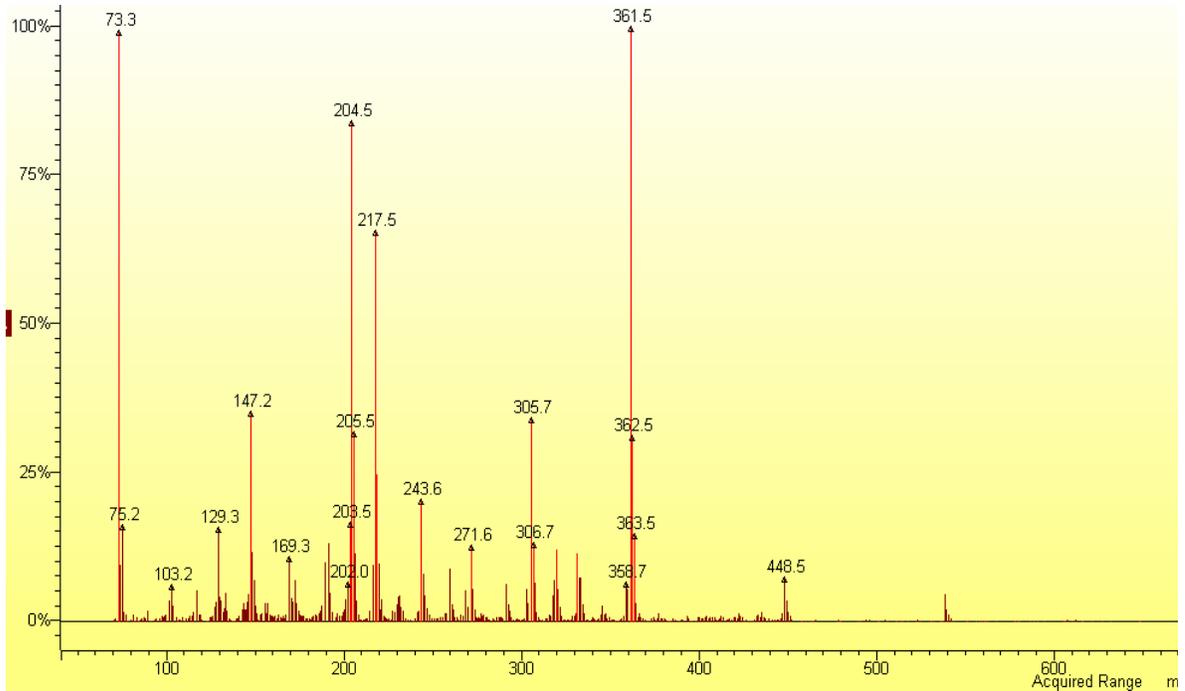


Figura 13: Espectro de masa obtenido en el análisis del estándar de melibiosa. Los iones de mayor abundancia observados son  $m/z$  361, 73, 204, 217, 147, 305, 205 y 362. Eje x: masa/carga ( $m/z$ ); eje y: porcentaje de intensidad.

**Tabla 5:** Iones de mayor abundancia observados en los espectros de masa de los diferentes carbohidratos.

<b>CARBOHIDRATO</b>	<b>IONES (m/z)</b>
<b>Fructosa</b>	217; 73
<b>Glucosa</b>	319; 73; 147; 217; 320
<b>Sacarosa</b>	361; 362; 73
<b>Trehalosa</b>	361; 362; 73
<b>Celobiosa</b>	361; 73; 204; 147; 217; 362
<b>Maltosa</b>	361; 73; 362
<b>Melibiosa</b>	361; 73; 204; 217; 147; 305; 205 y 362

#### 4.4 Análisis cromatográfico de muestras de miel.

Se realizaron pruebas de determinación de carbohidratos en miel utilizando el método probado con los estándares. Se utilizó una muestra de miel monofloral de raps la que se fortificó con los estándares de disacáridos analizados en este estudio. Las fortificaciones se realizaron agregando una concentración conocida de cada estándar a la miel. No fue necesario realizar fortificaciones de glucosa y fructosa, dado que estos monosacáridos se pudieron identificar claramente, debido a que la miel está compuesta mayoritariamente por estos carbohidratos.

En la figura 14 se aprecia el cromatograma de la muestra de miel sin fortificar y los cromatogramas de las muestras fortificadas con sacarosa o con trehalosa. En la figura 15 se observa el cromatograma de la miel sin fortificar y los cromatogramas de las fortificaciones con celobiosa y maltosa, en la figura 16 se observan los cromatogramas de la miel sin fortificar y de la fortificación con melibiosa. Esto se hizo con la finalidad de comparar los picos obtenidos en la miel con los estándares evaluados. Las fortificaciones realizadas con los disacáridos sacarosa y trehalosa permitieron corroborar la presencia de estos disacáridos en la muestra de miel original y la posibilidad de detección de estos carbohidratos en muestras de miel bajo este método, lo mismo ocurrió con melibiosa. Con esta prueba se pudo estimar a cual pico observado en la muestra de miel correspondía el de los estándares. Esto permitió incluso tener una idea de la posición de los picos de los disacáridos maltosa y celobiosa que eluyen en la zona donde hay gran cantidad de picos no identificados, los que podrían corresponder a carbohidratos no considerados en este análisis.

Con la finalidad de evaluar el método obtenido para la determinación de carbohidratos, se analizaron algunas muestras de miel: una miel monofloral de alfalfa chilota (figura 17) y cuatro mieles multiflorales (figuras 18, 19, 20 y 21).

Con este análisis se pudo determinar con claridad la separación de los monosacáridos glucosa y fructosa en las muestras de miel, observándose picos claramente definidos. Con respecto a lo observado en la zona de elución de los disacáridos, considerándose los tiempos de retención y los espectros de masa obtenidos, se pudo identificar sacarosa, trehalosa y en algunos casos melibiosa, carbohidrato encontrado en muy baja concentración en las mieles. La identificación de maltosa y celobiosa fue más difícil debido a la gran similitud estructural de estos carbohidratos. Por otro lado, la miel presenta una gran diversidad de otros oligosacáridos que parecen estar eluyendo cercanos a los tiempos de elución de maltosa y celobiosa.

#### **4.5 Análisis enzimáticos en miel.**

El reglamento sanitario de los alimentos del Ministerio de Salud de Chile, considera como miel fresca y de buena calidad aquellas que presenten un valor no menor a 8 en la escala de Goethe de la enzima diastasa. La enzima glucosa oxidasa no es considerada dentro de los parámetros de evaluación de calidad dentro del reglamento sanitario de los alimentos, sin embargo, varios autores han citado este análisis como un buen complemento para evaluar la calidad de la miel. No se ha descrito un valor determinado como esperado para la actividad de esta enzima, sólo se evalúa la presencia o ausencia de su actividad.

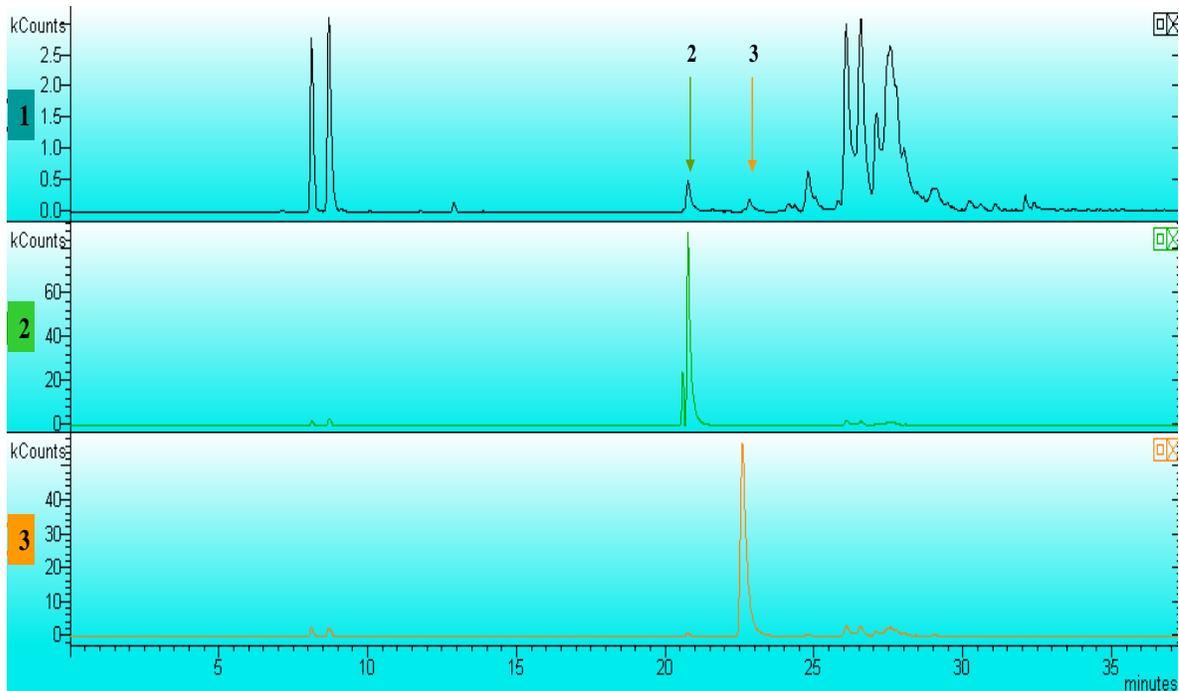


Figura 14: Perfiles cromatográficos obtenidos para miel de raps y las fortificaciones. (1) perfil cromatográfico de miel de Raps, (2) perfil cromatográfico obtenido para miel fortificada con sacarosa en una concentración de 2500 ppm, (3) perfil cromatográfico obtenido para miel fortificada con trehalosa en una concentración de 1500 ppm. Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

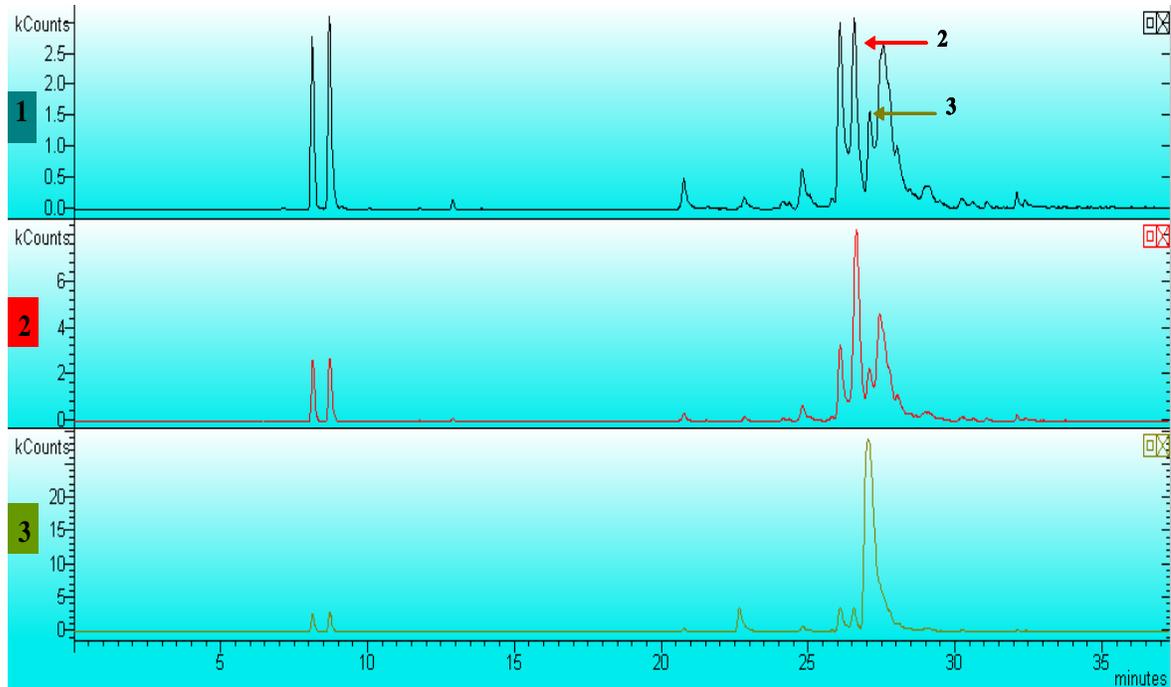


Figura 15: Perfiles cromatográficos obtenidos para miel de raps y las fortificaciones. (1) perfil cromatográfico de miel de Raps, (2) perfil cromatográfico obtenido para miel fortificada con celobiosa en una concentración de 1500 ppm, (3) perfil cromatográfico obtenido para miel fortificada con maltosa en una concentración de 1500 ppm. Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

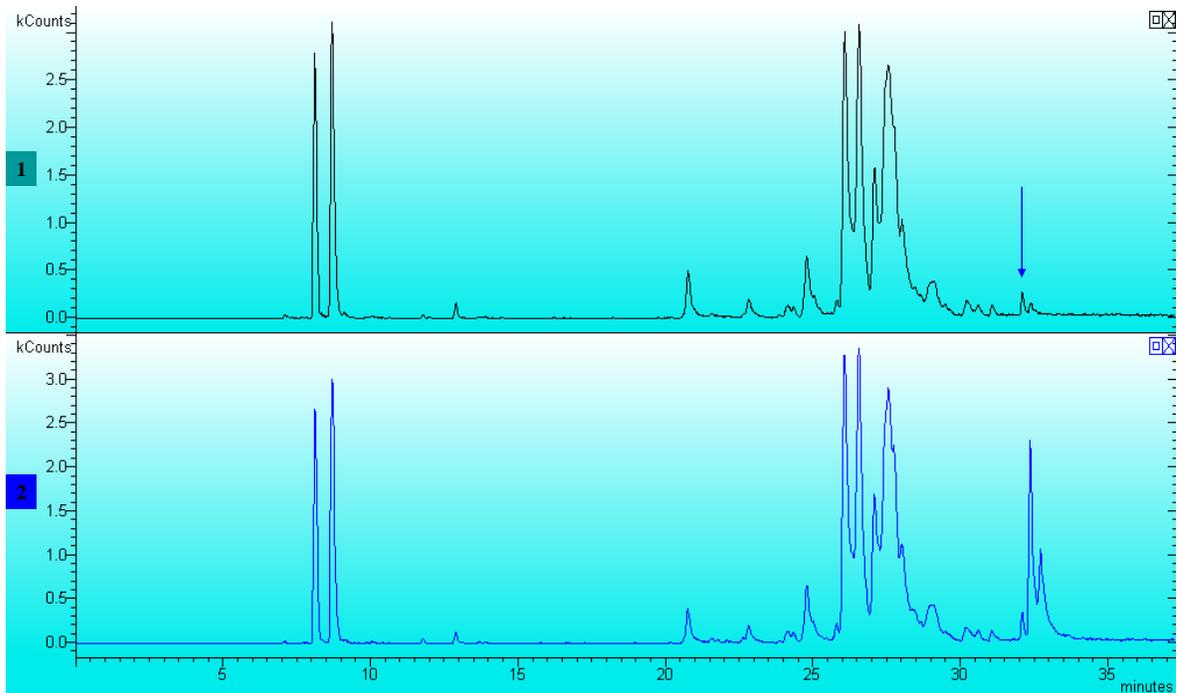


Figura 16: Perfiles cromatográficos obtenidos para miel de raps y para la fortificación con melibiosa. (1) Perfil cromatográfico de miel de Raps, (2) perfil cromatográfico obtenido para miel fortificada con melibiosa en una concentración de 1500 ppm. Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

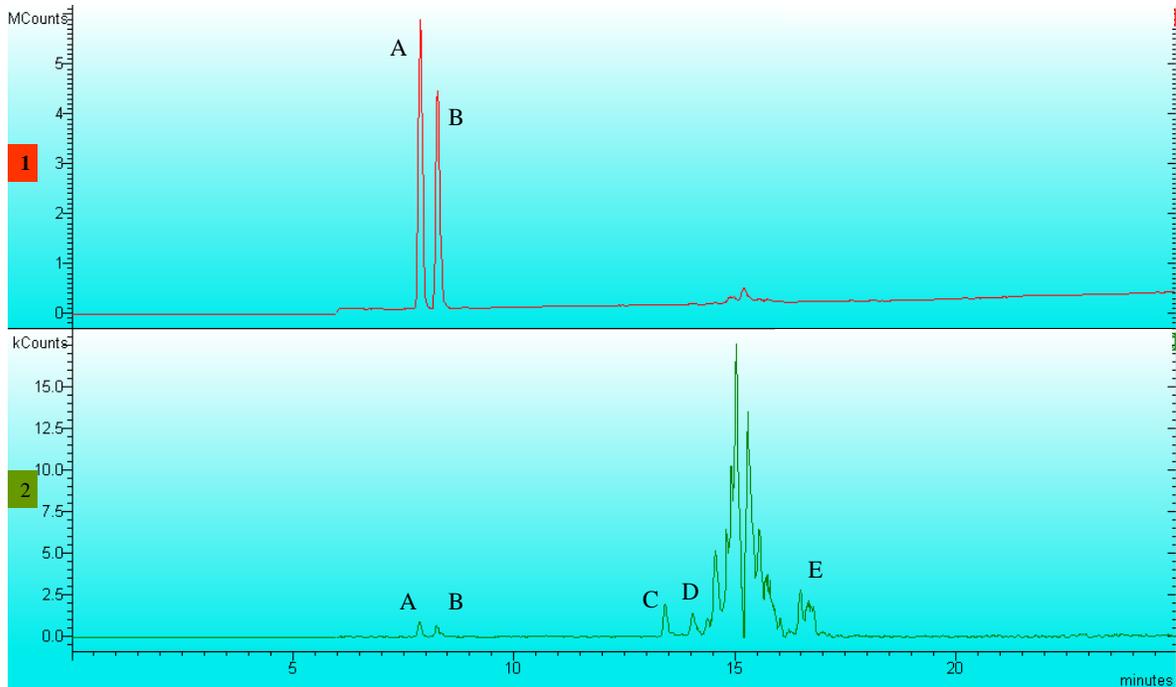


Figura 17: Cromatograma de una muestra de miel monofloral de alfalfa chilota. (1) Cromatograma obtenido en el rango completo de iones (RIC), donde se aprecia claramente los picos de los carbohidratos de mayor concentración (fructosa y glucosa, A y B respectivamente). (2) Cromatograma obtenido al seleccionar el ion más abundante presente en los disacáridos (361 m/z). Se observan los picos de los disacáridos sacarosa (C); trehalosa (D) y posiblemente melibiosa (E). Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

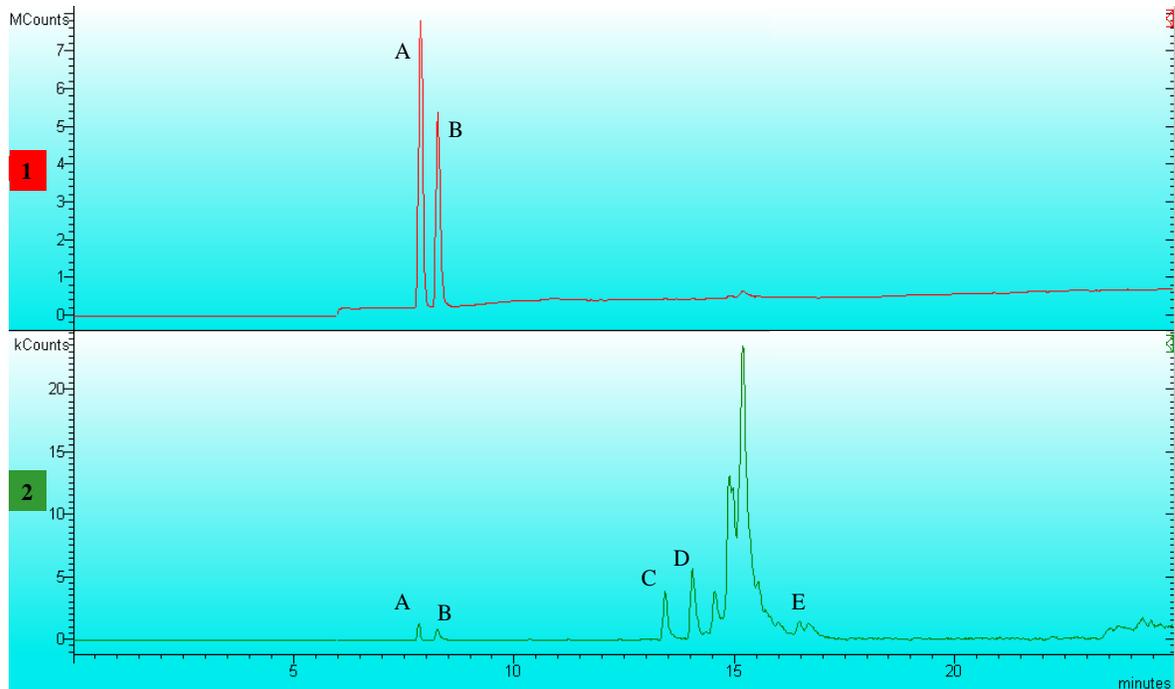


Figura 18: Cromatograma de la muestra de miel multifloral 1. (1) Cromatograma obtenido en el rango completo de iones (RIC), donde se aprecia claramente los picos de los carbohidratos de mayor concentración (monosacáridos A y B). (2) Cromatograma obtenido al seleccionar el ion específico para disacáridos ( $m/z$  361). Se observan los picos de los disacáridos sacarosa (C), trehalosa (D) y posiblemente melibiosa (E). Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

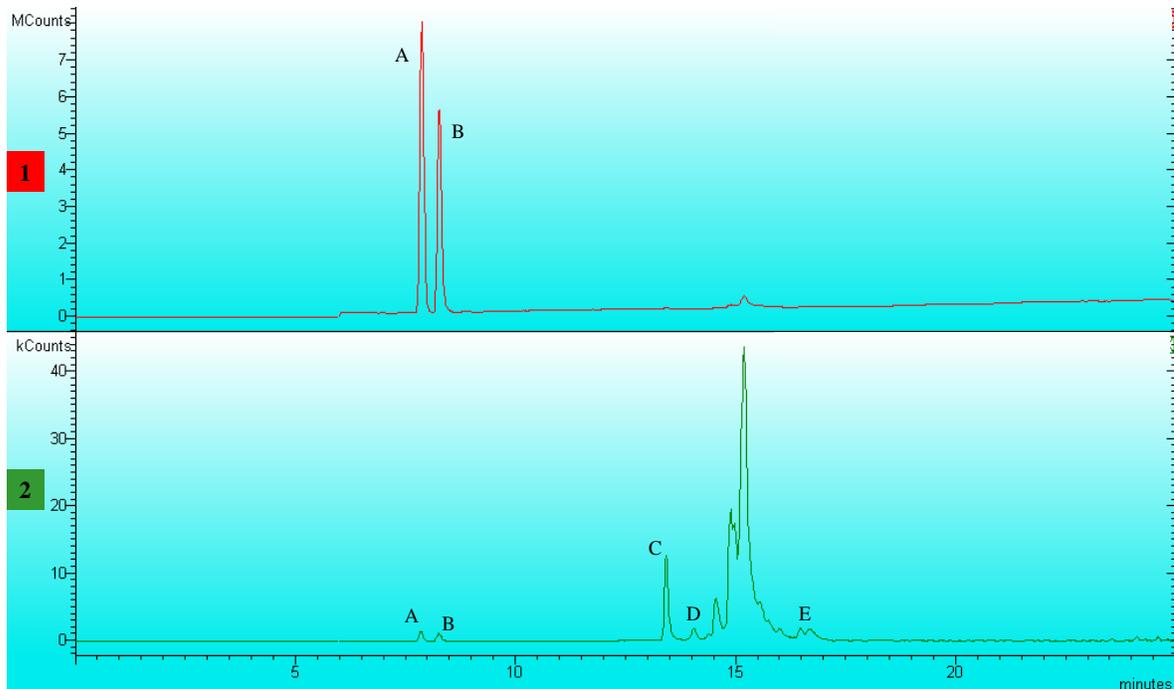


Figura 19: Cromatograma de la muestra de miel multifloral 2. (1) Cromatograma obtenido en el rango completo de iones (RIC), donde se aprecia claramente los picos de los carbohidratos de mayor concentración (monosacáridos A y B). (2) Cromatograma obtenido al seleccionar el ion específico para disacáridos ( $m/z$  361). Se observan los picos de los disacáridos sacarosa (C), trehalosa (D) y posiblemente melibiosa (E). Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

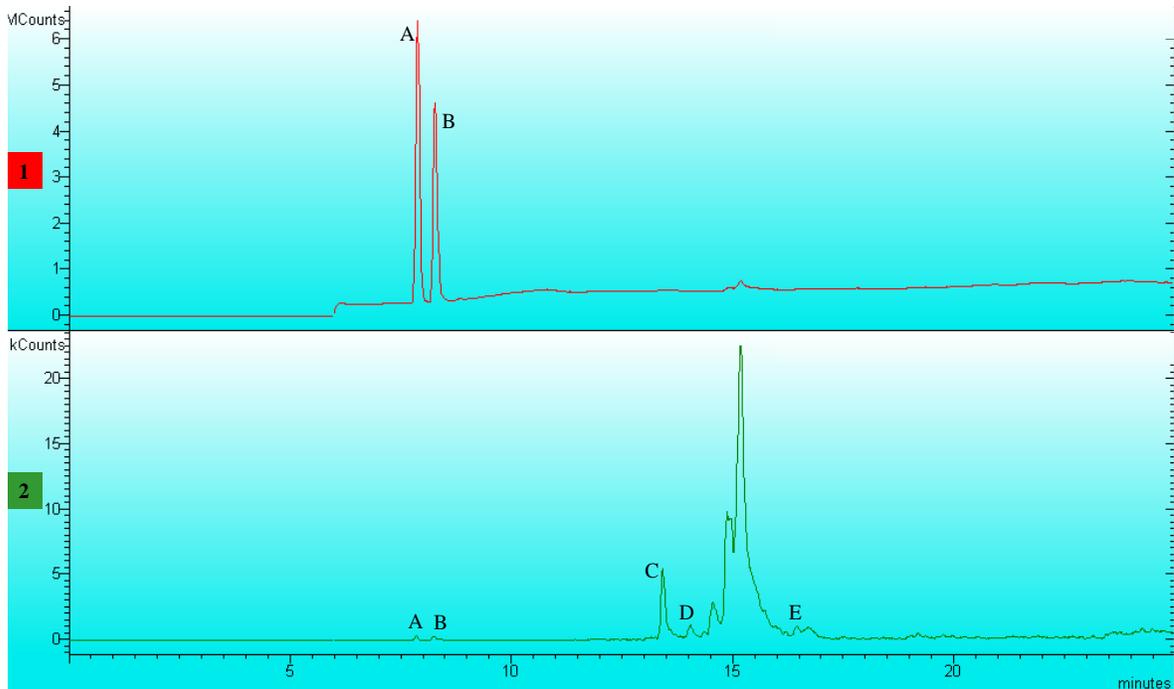


Figura 20: Cromatograma de una muestra de miel multifloral 3. (1) Cromatograma obtenido en el rango completo de iones (RIC), donde se aprecia claramente los picos de los carbohidratos de mayor concentración (monosacáridos). (2) Cromatograma obtenido al seleccionar el ion específico para disacáridos ( $m/z$  361). Se observan los picos de los disacáridos sacarosa (C); trehalosa (D) y posiblemente melibiosa (E). Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

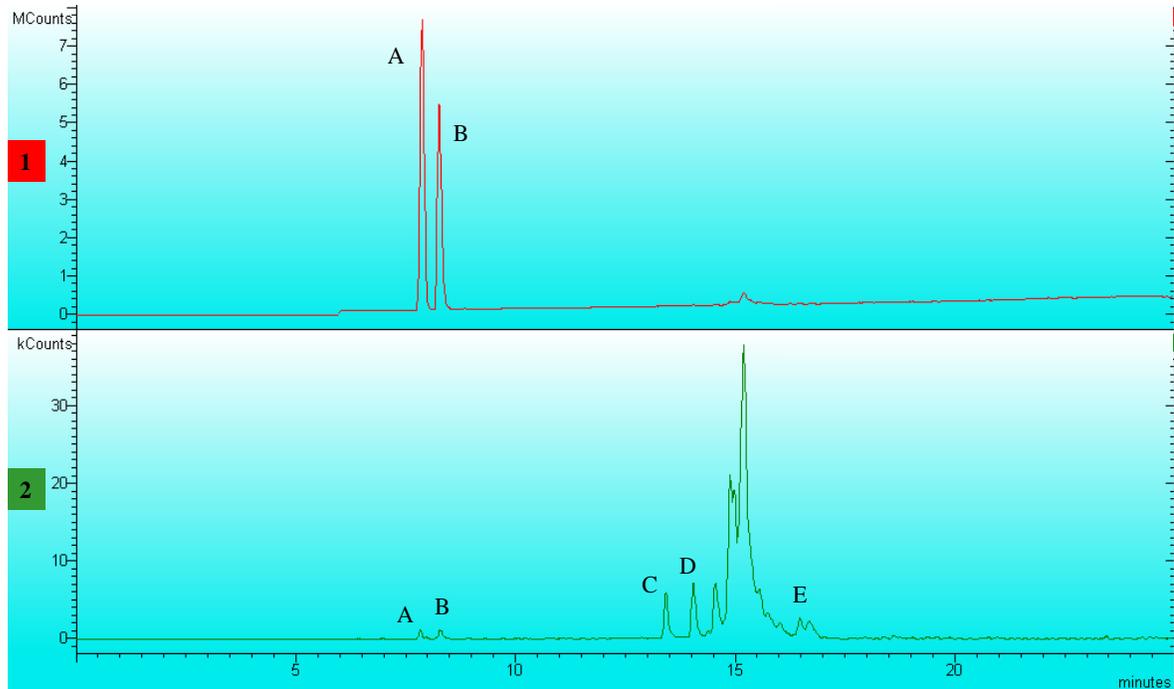


Figura 21: Cromatograma de una muestra de miel multifloral 4. (1) Cromatograma obtenido en el rango completo de iones (RIC), donde se aprecia claramente los picos de los carbohidratos de mayor concentración (monosacáridos). (2) Cromatograma obtenido al seleccionar el ion específico para disacáridos ( $m/z$  361). Se observan los picos de los disacáridos sacarosa (C); trehalosa (D) y posiblemente melibiosa (E). Eje x: tiempo de elución en minutos. Eje y: megacuentas, (medida de intensidad de la señal). Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la sección métodos.

La enzima invertasa es también considerada un parámetro de calidad, indicador de frescura y de tratamientos térmicos, no obstante al igual que la glucosa oxidasa tampoco es considerado como un parámetro de evaluación de calidad de la miel, dentro del reglamento sanitario de los alimentos del Ministerio de Salud de Chile. Sin embargo sí son consideradas en otros países. Varios autores han citado este análisis como complementario a los análisis de rutina de evaluación de calidad de la miel. Los valores esperados para invertasa en miel fresca y no sometida a tratamiento térmico fluctúan entre 50 – 200 U/kg para la mayoría de las mieles, siendo este límite muy permisivo o muy severo en algunos casos (Persano et al., 1999). Según la Comisión Internacional de la Miel, el valor mínimo aceptado para el número invertasa (IN) es 10, si bien al igual que la enzima diastasa la variación natural de esta enzima es grande. Sin embargo su utilidad para el control de calidad de las mieles se ha comprobado y es utilizado para evaluar el estado de frescura de la miel de abeja en Alemania, Bélgica y España.

Para el estudio enzimático se analizaron 24 muestras de miel procedentes de la Región de Los Lagos, de diversos orígenes florales. Uno de los parámetros más importantes que se deben considerar al momento de comparar actividad enzimática es la edad de las mieles. Sin embargo, debido a que no se contaba con la fecha de cosecha de las muestras utilizadas, se consideró la fecha de recepción en el laboratorio como parámetro estimativo de la edad de estas mieles. Los análisis enzimáticos se realizaron durante el año 2006.

Los valores obtenidos para las distintas enzimas se muestran en la tabla 6, donde se puede apreciar gran heterogeneidad en los resultados. En varias muestras de miel se observaron valores bajo lo esperado para diastasa (mínimo 8 en la escala Goethe), evidenciando la disminución en la calidad de estas mieles al momento del análisis. Por ejemplo, en el caso de las mieles que tenían fecha de recepción en el laboratorio del año 2003 se observó una disminución de todas las

**Tabla 6:** Análisis enzimático y sus correspondientes orígenes botánicos.

Muestras de miel	Año de ingreso al laboratorio	Invertasa		Glucosa oxidasa meq / kg	Diastasa DN	Origen botánico
		U / kg	IN			
M – 40 – 05	2005	158,7	21,6	35,6	10,0	Miel monofloral de Ulmo ( <i>Eucryphia cordifolia</i> )
M – 41 – 05	2005	84,1	11,4	28,6	5,0	Miel monofloral de Ulmo ( <i>Eucryphia cordifolia</i> )
M-42-05	2005	79,4	10,8	27,4	5,3	Miel monofloral de Ulmo ( <i>Eucryphia cordifolia</i> )
M-63-05	2005	50,3	6,8	14,8	5,2	Miel monofloral de Ulmo ( <i>Eucryphia cordifolia</i> )
M – 16 – 05	2005	72,9	9,9	25,4	15,7	Miel monofloral de Tineo ( <i>Weinmania trichosperma</i> )
C – 4	2003	5,8	0,7	7,8	3,0	Miel monofloral de Tineo ( <i>Weinmania richosperma</i> )
M – 64 – 05	2005	93,5	12,7	32,9	5,0	Miel monofloral de Tiaca ( <i>Caldcluvia paniculada</i> )
C – 3	2003	48,3	6,5	5,3	4,8	Miel monofloral de Raps ( <i>Brassica sp</i> )
M – 36 – 05	2005	11,8	1,6	11,5	10,2	Miel monofloral de Alfalfa chilota ( <i>Lotus uliginosus</i> )
M – 66 – 05	2005	30,0	4,0	9,4	7,0	Miel monofloral de Alfalfa chilota ( <i>Lotus uliginosus</i> )
M – 116 – 05	2005	31,5	4,2	9,6	5,1	Miel monofloral de Alfalfa chilota ( <i>Lotus uliginosus</i> )
M – 48 – 06	2006	313,4	42,6	26,1	29,9	Miel monofloral de Alfalfa chilota ( <i>Lotus uliginosus</i> )
C – 9	2003	61,0	8,3	38,8	6,0	Miel monofloral de Alfalfa chilota ( <i>Lotus uliginosus</i> )
Hierba azul	2003	4,9	0,6	6,4	1,4	Miel monofloral de Hierba azul ( <i>Echium sp.</i> )

**Tabla 6 (Cont.):** Análisis enzimático y sus correspondientes orígenes botánicos.

Muestras de miel	Año de ingreso al laboratorio	Invertasa		Glucosa oxidasa meq / kg	Diastasa DN	Origen botánico
		U / kg	IN			
M – 73 – 05	2005	131,8	17,9	24,0	13,5	Miel multifloral
M – 78 – 05	2005	76,5	10,4	25,4	6,9	Miel multifloral
M – 117 – 05	2005	33,4	4,5	14,8	10,3	Miel multifloral
M – 118 – 05	2005	125,3	17,0	45,1	13,3	Miel multiflora
M – 49 – 06	2006	266,0	36,2	36,3	27,3	Miel multiflora
M – 50 – 06	2006	169,2	23,0	21,8	17,3	Miel multifloral
M – 52 – 06	2006	195,3	26,6	35,5	17,7	Miel multifloral
M – 53 – 06	2006	129,4	17,6	30,6	11,9	Miel multifloral
M – 54 – 06	2006	135,8	18,4	28,0	14,8	Miel multifloral
M – 55 – 06	2006	129,7	17,6	21,0	13,2	Miel multifloral

actividades enzimáticas evaluadas, así como es el caso de varias mieles con fecha 2005. Esto posiblemente se debe a mieles deterioradas por vejez o almacenamiento inadecuado desde su recolección. En el caso de la enzima invertasa los valores obtenidos fueron bastante dispares, sin embargo, si se consideran las concentraciones establecidas por Persano y colaboradores en 1999 (entre 50 y 200 U/kg) se observa que varias de las mieles analizadas se encuentran dentro del rango aceptado para mieles relativamente frescas y que no han sido sometidas a tratamientos térmicos. Sin embargo, como en nuestro país no existe un registro de las concentraciones esperadas de esta enzima, es difícil realizar una comparación entre las muestras analizadas. En el caso de la actividad de la enzima glucosa oxidasa se observó presencia de actividad en todas las muestras, sin embargo se detectó una notoria disminución en las muestras del año 2003.

## 5. DISCUSIÓN

La composición de la miel depende de muchos factores, tales como especies vegetales cosechadas, naturaleza del suelo, raza de abejas, estado fisiológico de la colonia, entre otros (Jean - Prost, 1995). Su composición varía según la fuente floral del néctar, y aún para una misma especie botánica presenta fluctuaciones dentro de ciertos límites (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), citado por Figueroa, 2003).

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes de la biosfera y a su vez los más diversos. Son fundamentales en la dieta humana y la oxidación de éstos es la principal ruta de obtención de energía en las células no fotosintéticas (Binkley, 1988). Las funciones que cumplen en los organismos son energéticas, de ahorro de proteínas, reguladores del metabolismo de las grasas y juegan un importante rol estructural (Preis, 1980). Los carbohidratos son los constituyentes más importantes en la miel, siendo los atributos físicos de la miel determinados por la clase y concentración de éstos. Muchos de los carbohidratos presentes en la miel no se forman del néctar, pero sí durante la maduración y almacenamiento de ésta, por acción de enzimas (Bianchi, 1990; White, 1975).

La miel es probablemente la mezcla más compleja de oligosacáridos conocida en la naturaleza, lo cual hace muy dificultoso la determinación de éstos. Los carbohidratos de la miel son analizados en muchos casos, para obtener información sobre diferentes aspectos de su calidad, de esta forma se tiene la determinación de azúcares reductores, de sacarosa, azúcar total, y glucosa comercial. Debido a que la glucosa y la fructosa representan más del 90% de todos los azúcares reductores, la proporción fructosa/glucosa y las concentraciones de sacarosa son buenos criterios para diferenciar mieles monoflorales (Bogdanov *et al.*, 1999)

Se han realizado muchos estudios para lograr la separación de los carbohidratos mediante métodos basados en cromatografía de gas con detector de ionización en llama (FID) y HPLC, inclusive el empleo secuencial de éstos, sin embargo, no se han obtenido resultados satisfactorios con éstos métodos y ninguno tiene una clara ventaja sobre el otro. Los métodos de GC – FID son mas sensibles presentando muy bajos limites de detección y capacidad de separar y cuantificar un gran número de oligosacáridos. Sin embargo presentan dos inconvenientes: 1. La necesidad de derivatizar los azúcares para hacerlos volátiles, lo cual emplea gran cantidad de tiempo y 2. La aparición de varios picos para un solo compuesto, debido a la presencia de formas tautoméricas de los azúcares reductores. Los métodos de HPLC ya sea en fase normal o reversa, incluyendo intercambio aniónico, han sido muy utilizados con el propósito de superar estos inconvenientes. Estos métodos no requieren gran preparación de la muestra, pero también presentan dos inconvenientes: 1. Difícil separación de carbohidratos estructuralmente similares y 2. Límites de detección demasiados altos para los detectores de índice de refracción utilizados, (2 ó 3 veces más que en GC). Esto hace que la cuantificación de los oligosacáridos presentes en menor concentración sea imposible (Gómez *et al.*, 1999).

La mayor limitante para la determinación de carbohidratos por GC es la derivatización necesaria de estos compuestos, proceso largo y dificultoso (Mateo *et al.*, 1987). Sin embargo se han obtenido mejores resultados utilizando esta metodología, inclusive se ha llegado a mejorar considerablemente la determinación de carbohidratos realizando modificaciones a las metodologías de derivatización. En un principio la técnica más utilizada era la obtención de derivados trimetil silil éteres (Sweeley *et al.*, 1963); posteriormente se introdujo la utilización de hidroxilamina, la que al reaccionar en condiciones adecuadas con los azúcares genera los derivados oximas de los carbohidratos, proceso que se realiza antes de la trimetil sililación. Ésta

técnica dio mejores resultados en comparación a la utilización de los derivados éteres para la identificación de algunos azúcares, ya que se logró reducir la generación de seis posibles formas tautoméricas a un mínimo de dos; con esto se obtuvo la simplificación de los cromatogramas. Algunos azúcares son mejor reconocidos en la miel por uno de los dos procedimientos. Así para el caso del derivado éter de maltosa trimetil silil se obtienen picos bien resueltos, mientras que el derivado oxima trimetil silil presenta una interferencia con turanosa e isomaltosa. En el caso del disacárido trehalosa el derivado éter trimetil silil no puede ser identificado debido a la superposición de las señales con kojibiosa y nigerosa, pero la detección se logra perfectamente al realizar la reacción de oximación antes de la trimetil sililación para este disacárido (Mateo *et al.*, 1987).

En el presente estudio se utilizó el método Pierce – Pourtallier en el cual se generan los derivados oxima de los carbohidratos previo a la silanización de éstos y se utilizó una columna cromatográfica altamente polar, a diferencia de varios estudios anteriores en los cuales se han utilizado columnas no polares o medianamente polares para la determinación de carbohidratos por cromatografía gaseosa.

## **5.1 Análisis cromatográfico.**

Al implementar un método como el logrado en este estudio se deben llevar a cabo numerosas pruebas, para así establecer los parámetros adecuados en el equipo que se está utilizando y obtener resultados que sean reproducibles en el tiempo. Por otro lado se deben considerar las dificultades particulares de la muestra sometida a estudio, en nuestro caso miel. Desde el punto de vista del análisis de carbohidratos la miel es considerada una de las mezclas

más compleja de estas moléculas en la naturaleza. Teniendo esto en cuenta, para lograr establecer los parámetros adecuados el plan experimental debía incluir necesariamente la utilización de estándares conocidos de los carbohidratos que se pretendía analizar en las muestras de miel. Además se consideró utilizar concentraciones de los estándares aproximadas a las esperadas en una muestra de miel, es decir, mayores concentraciones de monosacáridos, fructosa y glucosa (5000 ppm), y del disacárido sacarosa (2500 ppm), que de los disacáridos trehalosa, maltosa, celobiosa y melibiosa (1500 ppm).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el método desarrollado y las condiciones experimentales utilizadas permitieron una separación eficiente de los estándares de carbohidratos utilizados. Particularmente se lograron señales excelentes para los monosacáridos glucosa y fructosa, en el caso de los disacáridos sacarosa, trehalosa y melibiosa también se obtuvieron buenos resultados reproducibles. Sin embargo, para los disacáridos celobiosa y maltosa se observó superposición de las señales, debido a que celobiosa presentó un pico de dos puntas en la que el de menor intensidad se superpuso con el pico de maltosa (figura 4). Esto se pudo deber a la presencia de formas tautoméricas de estos disacáridos reductores, como fue descrito por Gómez y colaboradores en 1999.

Mediante este método de cromatografía gaseosa se lograron determinar los tiempos de retención para cada uno de los siete estándares evaluados, con cromatogramas de línea base regular y picos bien definidos. Al analizar los tiempos de retención obtenidos de los cromatogramas se determinó que bajo las condiciones experimentales utilizadas el orden de elución de los carbohidratos fue el siguiente: fructosa, glucosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, maltosa y melibiosa (tabla 4 y figura 4). Después de esta primera etapa de análisis individual de los estándares se realizaron pruebas en las que se utilizó una mezcla de los carbohidratos. Esto se

realizó con la finalidad de evaluar el comportamiento del método frente a la presencia simultánea de los azúcares que habían sido separados exitosamente en los análisis previos, y como una forma de obtener una aproximación preliminar a la situación que se debería encontrar al analizar las muestras de miel. Se observó la clara separación de cinco de los siete estándares utilizados en la mezcla, mientras que para celobiosa y maltosa nuevamente se observó una superposición. En este análisis se observaron los mismos tiempos de retención que los obtenidos para los estándares individuales, por lo tanto el orden de elución fue el mismo.

Una vez determinados los tiempos de retención de los estándares de carbohidratos se realizó el mismo tipo de análisis en muestras de miel. Los resultados demostraron que el método utilizado permite la eficiente determinación de monosacáridos en miel. Se observaron picos bien definidos los que presentan tiempos de retención similares a los obtenidos con los estándares. Por lo tanto se comprobó que este método se puede utilizar para determinar fructosa y glucosa en una mezcla compleja como es la miel.

Con respecto a la determinación de disacáridos en miel mediante el método descrito en este trabajo se logró la identificación de sacarosa, trehalosa y melibiosa. Considerando los tiempos de retención para los disacáridos celobiosa y maltosa se determinó su presencia en la zona donde se obtuvo gran cantidad de picos no identificados, imposibilitando su determinación certera. Si se analizan las intensidades de las señales se puede observar que los azúcares presentes en mayor concentración en la miel son los monosacáridos y en mucha menor concentración los disacáridos, lo que se respalda con lo descrito en la literatura.

Como una forma de corroborar que las señales obtenidas en la muestra de miel efectivamente corresponden a los disacáridos analizados, se realizaron pruebas en las cuales se fortificó una muestra de miel monofloral de raps con cada uno de los estándares de disacáridos.

Esto permitió estimar a cual pico observado en la miel podría corresponder el estándar respectivo. Para el caso de los disacáridos sacarosa, trehalosa y melibiosa se logró establecer que los picos observados en la muestra de miel con tiempos de retención similares a los obtenidos en los análisis individuales de estos estándares, efectivamente correspondían a estos carbohidratos (figura 14 y 16). Para los disacáridos celobiosa y maltosa no se pudo discriminar con exactitud a cual pico presente en la miel correspondía cada estándar, debido a que éstos azúcares eluyen en la zona donde hay una gran cantidad de picos no identificados. Sin embargo, se hizo una aproximación a cual de estos picos podrían corresponder (figura 15).

Posteriormente se analizaron muestras de miel de distinto origen floral y se observó (teniendo como parámetro las pruebas de fortificación de la miel), que es posible identificar fructosa, glucosa, sacarosa, trehalosa y melibiosa. Por otro lado se observó que en todas las muestras analizadas la intensidad de los picos de fructosa siempre fue mayor que la de glucosa. Este dato es de gran importancia debido a que la relación fructosa / glucosa y las concentraciones de sacarosa son buenos criterios para diferenciar mieles monoflorales (Bogdanov *et al.*, 1999). Por otro lado también se pudo observar entre las muestras de miel analizadas diferencias en la intensidad de la señal obtenida para trehalosa (figura 18 y 19, letra D), así como para sacarosa (figura 17 y 19, letra C), poniendo de manifiesto la posible utilización de éste método para evaluar diferencias en las concentraciones de disacáridos de diferentes mieles.

## **5.2 Análisis de espectrometría de masa.**

El análisis de los carbohidratos se realizó en un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masa, por lo cual de forma simultánea a la obtención de los cromatogramas se

obtuvieron los espectros de masa de los siete carbohidratos analizados. Se determinaron los iones característicos para cada uno, estableciéndose de esta manera un nuevo parámetro que, en conjunto con los tiempos de retención obtenidos en la cromatografía de gases, permitiría la identificación de los carbohidratos en miel. Los espectros de masa obtenidos en el análisis de los siete carbohidratos utilizados en este estudio fueron muy similares entre sí, sin embargo, después de un minucioso análisis pudieron determinarse algunas diferencias las cuales permitieron establecer los patrones de iones característicos para cada estándar.

Los espectros de masa obtenidos para los monosacáridos, fructosa y glucosa, fueron muy similares. Sin embargo se observó una marcada diferencia en la intensidad relativa del ion  $m/z$  217 este se encuentra presente con una gran intensidad en el espectro de masa obtenido para fructosa pero en muy baja intensidad en el de glucosa. Asimismo, en el caso del ion  $m/z$  319, se encuentra con una gran intensidad en el espectro de masa obtenido para glucosa y con muy baja intensidad en el de fructosa. Esto también se observó en los casos de los iones  $m/z$  73, 205 y 147, presentes en ambos espectros de masa pero en diferentes intensidades. Por lo anterior se propone que estas diferencias entre las intensidades de los iones propios de los monosacáridos podrían considerarse como un parámetro de identificación para estos carbohidratos. Los espectros de masa obtenidos para los disacáridos también fueron muy similares, encontrándose algunas diferencias a nivel de las intensidades relativas de algunos iones. En el caso de los disacáridos no reductores, sacarosa y trehalosa, que presentan espectros de masa muy similares, en acuerdo a como fue descrito en el 2004 por Simoneit y colaboradores. No obstante ellos muestran grandes diferencias en las intensidades relativas de los iones  $m/z$  217, 191 y 437. Por lo anterior también mediante un análisis más minucioso de los espectros de masa de estos carbohidratos podría utilizarse sin problema el patrón de iones para su identificación en conjunto con los tiempos de

retención. En el caso de los espectros de masa de los disacáridos reductores celobiosa, maltosa y melibiosa, (figura 11, 12 y 13), al igual que para los otros carbohidratos analizados se observó gran similitud entre ellos. Pero se detectaron diferencias en las intensidades relativas de los iones  $m/z$  73, 204, 217 y 538, permitiendo en cada caso la identificación individual de cada estándar. En el caso de melibiosa se observó mayor intensidad del ion  $m/z$  305 que en celobiosa y maltosa pudiéndose considerar la presencia de este ion como más específico para melibiosa.

Comparando los espectros de masa obtenidos para los monosacáridos y para los disacáridos, estos últimos presentaron un ion característico que está ausente por completo en el patrón de iones de los monosacáridos. Este se trata del ion  $m/z$  361 haciéndolo un ion específico de disacáridos y por lo tanto un excelente parámetro de identificación para estas moléculas.

Estos resultados se compararon con los antecedentes descritos en la literatura (Simoneit *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2002; Medeiros & Simoneit 2007), con lo que se comprobó que en las condiciones utilizadas en este estudio es posible identificar mediante el espectro de masa los carbohidratos presentes en una muestra de miel.

Según estudios realizados por Simoneit y colaboradores en el 2004, los iones clave para pentosas, hexosas y heptosas como trimetil silil éteres son generalmente los iones  $m/z$  73, 147, 191, 204 y 217; los disacáridos presentan un ion clave adicional que es el ion 361  $m/z$  y los azúcares reductores tienen iones clave adicionales que son 205  $m/z$ , 217  $m/z$ , 307  $m/z$  y 319  $m/z$ .

Sanz y colaboradores en el 2002 obtuvieron el espectro de masa para el disacárido maltosa, analizándolo bajo condiciones experimentales similares a las utilizadas en este estudio. Se puede apreciar que los iones de mayor abundancia observados por estos autores son prácticamente iguales a los detectados en este trabajo (figura 22).

Otra importante información con la cual se contó para evaluar los resultados obtenidos fue la base de datos de la librería NIST 98, desde donde se extrajo información acerca de los iones característicos para algunos carbohidratos en sus formas oxima trimetil silil. Como era de esperar, se observó gran similitud al compararlos con los datos obtenidos en este estudio (figura 23). En la tabla 7 se puede apreciar la gran similitud de los iones característicos de los carbohidratos obtenidos por Medeiros y Simoneit (2007) con los obtenidos en el presente trabajo, aun cuando estos autores evaluaron los derivados trimetil sililados sin su previa transformación a las oximas. A pesar de lo anterior se puede observar un patron similar en los iones obtenidos.

Con estos resultados se puede concluir que el método experimental para análisis de carbohidratos en una mezcla compleja, desarrollado en este estudio, permite identificar siete estándares de carbohidratos, cinco de los cuales fue posible identificar exitosamente en muestras de miel. Por otra parte se logró la identificación de los carbohidratos analizados utilizando una columna cromatográfica altamente polar, lo cual no ha sido descrito anteriormente. El siguiente paso en un estudio de estas características es poder utilizar el método desarrollado en forma rutinaria para la identificación de carbohidratos en muestras de miel. Por lo tanto, se debe avanzar en la validación del método.

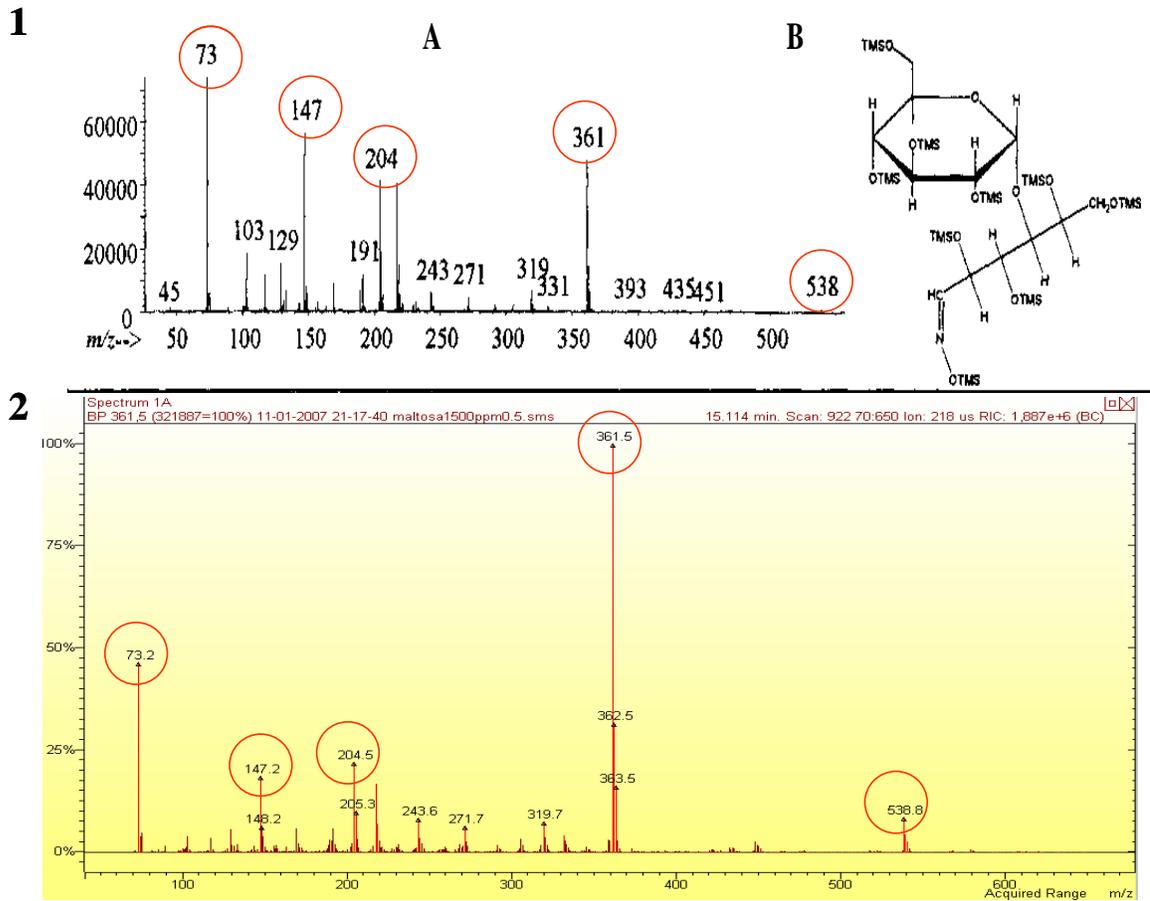


Figura 22: Comparación de los espectros de masa de maltosa oxima octaquis trimetil silil. (1.A) Espectro de masa y (1.B) estructura molecular del disacárido maltosa oxima octaquis trimetil silil. (2) Espectro de masa obtenido para maltosa oxima octaquis trimetil silil bajo el método desarrollado en este estudio. Se puede observar la gran similitud entre los principales iones obtenidos por Sanz y colaboradores en el 2002 con los obtenidos por medio del método desarrollado en este trabajo.

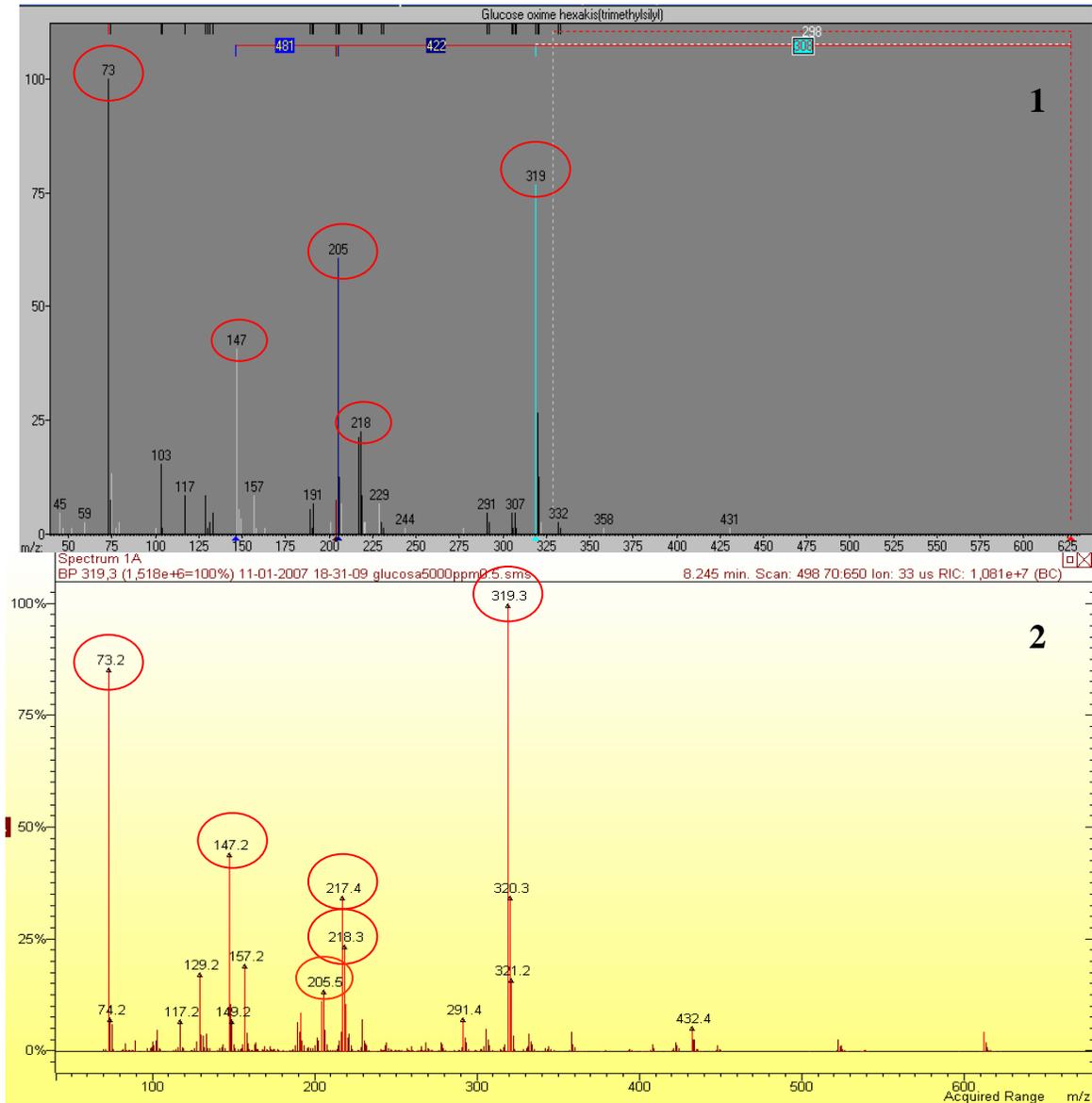


Figura 23: Comparación de espectros de masa obtenidos para glucosa oxima hexaquis trimetil silil. (1) Espectro de masa obtenido de la base de datos de la librería NIST, versión 6.2. (2) Espectro de masa obtenido mediante el método desarrollado en este trabajo. Se puede apreciar los iones característicos de mayor abundancia  $m/z$  73, 147, 205, 217 y 319.

**Tabla 7:** Comparación de los iones obtenidos por Medeiros & Simoneit (2007) con los determinados en el presente estudio. Se puede apreciar gran similitud de los iones característicos de los carbohidratos en ambos estudios, aun cuando se utilizaron distintas condiciones experimentales.

Carbohidrato	Formula Molecular	Iones característicos (m/z), obtenidos en el presente estudio.	Iones característicos (m/z), obtenidos por Medeiros & Simoneit.
Fructosa	$C_6 H_{12} O_6$	217; 73	217; 437; 147
Glucosa	$C_6 H_{12} O_6$	319; 73; 147; 217 y 320	204; 191; 217
Celobiosa	$C_{12} H_{22} O_{11}$	361; 73; 204; 147; 217 y 362	204; 361
Maltosa	$C_{12} H_{22} O_{11}$	361; 73; 362	204; 361; 191
Melibiosa	$C_{12} H_{22} O_{11}$	361; 73; 204; 217; 147; 305; 205 y 362	204; 361
Sacarosa	$C_{12} H_{22} O_{11}$	361; 362; 73	361; 217; 437
Trehalosa	$C_{12} H_{22} O_{11}$	361; 362; 73	361

La validación del método involucra en primer lugar poder contar con un número de muestras de miel cuya trazabilidad permita conocer con exactitud al menos, el origen botánico, estado sanitario de la colmena, fecha de cosecha y condiciones de almacenamiento. De esta manera se podrían determinar todos los parámetros necesarios para la validación del método (exactitud, límite de detección, robustez, estabilidad, límite de cuantificación). Finalmente uno de los parámetros importantes que se puede determinar con este poderoso método analítico es no solo la identificación si no la cuantificación de los carbohidratos presentes en una muestra de miel. Esto es de vital importancia para el posible etiquetado con el valor nutricional de los carbohidratos e identificar posibles fraudes debido a incorporación de azúcares exógenos a las muestras de miel (Cotte et al., 2003). En mercados cada vez más exigentes el poder contar con análisis precisos de estos parámetros es de suma importancia. Por otro lado la cuantificación de carbohidratos podría ser una poderosa herramienta para la identificación de mieles monoflorales, como se ha descrito anteriormente (Cotte *et al.*, 2004; Mateo & Bosch – Reig, 1998).

### **5.3 Análisis enzimáticos en miel de abeja.**

La miel contiene pequeñas cantidades de diferentes enzimas, que son aportadas por las abejas cuando traspasan la miel desde el buche a las celdillas. La cantidad de cada enzima depende de la edad de la abeja, el estado de la colonia, el flujo de néctar, las condiciones del ambiente y las condiciones de práctica de la apicultura. (Karabournioti *et al.*, 2001). La invertasa se ha considerado como la enzima más importante presente en la miel, cataliza la reacción de transformación de la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa. La diastasa es otra enzima de importancia, es inestable al calor, por lo cual se utiliza como indicador de calentamiento de la

miel. Otra enzima de importancia encontrada en la miel es la glucosa oxidasa que oxida la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel diluida es la causa de la mayor parte de sus efectos antibacterianos (Bianchi, 1990).

Los componentes enzimáticos de la miel han sido investigados por años, el principal interés ha sido distinguir entre las mieles naturales y artificiales, sin embargo, enzimas como la diastasa y la invertasa se han utilizado como indicadores de frescura y tratamientos térmicos de la miel, debido a que sus actividades disminuyen con los años, almacenamiento inadecuado y calentamiento (Karabournioti *et al.*, 2001), (White, 1975). Por otra parte, White y colaboradores, (1964) demostraron que la determinación de la actividad de invertasa es preferible a la de diastasa, ya que es más sensible al calentamiento. Debido a lo anterior se considera que éste sería un parámetro más adecuado para la evaluación de mieles etiquetadas como de alta calidad (miel virgen) (Persano *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio para las tres enzimas analizadas presentaron gran heterogeneidad en sus niveles tanto entre mieles de distinto origen floral como de distinto año de ingreso al laboratorio. Sin embargo, al realizar una comparación de algunas de las mieles analizadas en este estudio se pudo observar que las cuatro mieles del año 2003, presentaron valores inferiores de las tres enzimas, si se comparan con las muestras del año 2006. Para el caso de invertasa las muestras del año 2003 presentaron un valor de número invertásico (IN) inferior a 10, que es el valor mínimo aceptado por la Comisión Internacional de Miel. Los valores obtenidos para la enzima diastasa también fueron menores al valor aceptado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos del Ministerio de Salud de Chile. Estos resultados estarían indicando una posible disminución de las actividades enzimáticas por almacenamiento prolongado, sin embargo no se puede descartar que estas mieles hayan sido sometidas a tratamientos térmicos. Si

bien en este estudio no se realizó un análisis estadístico, estos resultados preliminares pueden servir como un indicio de que un análisis más detallado de los niveles de enzimas en muestras de miel a las que se conozca sus condiciones de cosecha y almacenamiento sería de utilidad para evaluar su calidad. Solo de esta forma sería posible determinar los valores estándar de cada una de las tres enzimas analizadas, en el caso particular de las mieles chilenas. Por ejemplo esta aproximación permitiría determinar los valores iniciales de las enzimas desde un tiempo cero, considerándose éste el momento de la cosecha y de esta forma conseguir una tipificación de las mieles a nivel enzimático. También se podrían realizar análisis en el laboratorio de disminución de la actividad enzimática por tratamientos térmicos y por almacenamiento prolongado.

Considerando que las concentraciones enzimáticas encontradas en la miel dependen de varios factores como son: período de recolección de néctar (estado fisiológico de la colmena), condiciones ambientales, flujo de néctar, tratamientos térmicos, modo de almacenamiento, edad de las mieles, entre otros, es difícil interpretar los resultados obtenidos en este estudio en término de frescura, dado que el valor inicial de actividad enzimática se desconoce. Entonces podemos confirmar que las enzimas pueden ser un complemento útil, pero mayormente como un parámetro de caracterización de mieles monoflorales (Persano *et al.*, 1999).

#### **5.4 Conclusiones.**

De cuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que:

- Se logró desarrollar un método de cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masa utilizando una columna cromatográfica altamente polar para determinar eficientemente los monosacáridos, fructosa y glucosa y los disacáridos, sacarosa,

trehalosa y melibiosa en muestras de miel. Sin embargo no se logró una buena separación de los disacáridos maltosa y celobiosa.

- Se logró determinar los tiempos de retención y los espectros de masa para los siete carbohidratos analizados.
- Se lograron cuantificar los niveles de las enzimas invertasa, diastasa y glucosa oxidasa en muestras de miel. Sin embargo la correlación entre los niveles de estas enzimas y el origen botánico de la miel requiere el conocimiento previo de la edad de las mieles, de las condiciones de almacenamiento, así como también de los posibles tratamientos térmicos, a los que pudieran haber sido sometidas las muestras de miel, para obtener resultados confiables.

## **5.5 Proyecciones del trabajo.**

Llevar a cabo un análisis minucioso de los carbohidratos de la miel es de suma importancia si se considera la posibilidad de utilizar este parámetro, en conjunto con el análisis polínico para determinar el origen floral, estimar la calidad y cristalización de las mieles. Este logro permitiría considerar la posibilidad de etiquetar las mieles con su valor nutricional, permitiendo de esta manera poder introducir en el mercado mieles con baja concentración de glucosa y mayor concentración de fructosa.

El hecho de poder validar una técnica analítica de alta resolución como es la cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa, para la determinación de carbohidratos en muestras de miel, sería de gran importancia debido a la creciente demanda de este producto en los mercados internacionales, acorde con las cada vez mayores exigencias del consumidor por

adquirir productos orgánicos 100% naturales y con una detallada descripción de sus constituyentes.

También sería interesante avanzar en estos estudios para lograr una tipificación de las mieles de nuestro país en cuanto a su composición de azúcares y enzimas, como se ha hecho en otros países. Esta información permitiría conocer los niveles basales de las enzimas presentes en las mieles de nuestro país y de esta forma poder definir las concentraciones esperadas para estas enzimas.

La actividad invertasa es particularmente sensible al sobrecalentamiento y almacenamiento prolongado y su utilidad como parámetro de calidad en mieles ha sido comprobado. Esta característica se utiliza para conocer el estado de frescura de la miel de abejas de Alemania, Bélgica y España, debido a lo cual sería muy interesante la posibilidad de implementar en nuestra región la determinación de esta enzima como análisis complementario a la determinación de diastasa para estimar el grado de frescura y posibles tratamientos térmicos.

La enzima glucosa oxidasa oxida la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, la acumulación de peróxido de hidrógeno en la miel es la causa de la mayor parte de sus efectos antibacterianos. Este fenómeno podría ser de gran importancia para la determinación de esta enzima en miel con la finalidad por ejemplo de poder etiquetar mieles con mayor poder antibacteriano, para privilegiar su uso en personas que manifiesten un sistema inmune deprimido.

## 6. REFERENCIAS

Aguilar, M. (2001). Evaluación de parámetros de calidad en miel de abejas, en relación a condiciones de almacenaje. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 141 p.

Bianchi, E. (1990). Control de calidad de la miel y cera. Centro de Investigaciones Apícolas. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina. 69 p.

Binkley, R. (1988). Modern carbohydrate chemistry. Marcel Dekker, San Diego, CA.

Boettcher, J. (1998). Caracterización físico – química y botánica de miel de abejas (*Apis mellifera*.) de la zona de Chiloé. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 146 p.

Bogdanov, S., Martin, P., & Lüllman, C. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, 1 – 59 p.

Campusano, C. (1999). Determinación de proteínas y vitaminas B<sub>2</sub> y C en pólen de frutales menores y miel. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 118 p.

Carlson, D. (1968). Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* 243, 616 – 626.

Cheng, C. Tsai, K. & Chang, J. (2006). On-line cut-off technique and organic modifier addition aided signal enhancement for trace analysis of carbohydrates in cellulase hydrolysate by ion exclusion chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1119, 188 – 196.

Chile, Servicio Nacional de Salud (SNS). (1997). Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial (Chile), 15 de mayo de 1997: 15 p.

Chile, Instituto Nacional de Normalización (INN). (2007). Norma chilena. Miel de abejas: denominaciones y requisitos. NCh616.c2007. Santiago, Chile.

Cohen, A., Schagerlöf, H., Nilsson, C., Melander, C., Tjerneld, F., & Gorton, L. (2004). Liquid chromatography – mass spectrometry analysis of enzyme-hydrolysed carboxymethylcellulose for investigation of enzyme selectivity and substituent pattern. *J. Chromatogr. A.* 1029, 87 – 95.

Cornejo, L. (1993). Apicultura práctica en América Latina. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. Roma, Italia. 167 p.

Cotte, J., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J. & Grenier – Loustalot, M. (2003). Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of chromatography A*. 1021, 145 – 155.

Cotte, J., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J. & Grenier – Loustalot, M. (2004). Chromatographic analysis of sugar applied to the characterization of monofloral honey. *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 698 – 705.

Crane, E. (1990). *Bees and Beekeeping: Practice and world resources*. New York, U.S.A. Cornell University Press. 614 p.

Figuerola, A. (2003). Análisis de residuos de aceite esencial mentol en miel de abeja. Tesis Lic. Ing. en Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 88 p.

García, A., Soto, D., Romo, C. (1986). La miel de abejas: composición química, propiedades y usos industriales. *Revista chilena de nutrición*. 3, 183 – 191.

Gómez, J., García, R. Elvira, S. & González, A.(1999). Optimization of the capillary gas chromatography analysis of mono – and oligosaccharides in honeys. *Chromatographia*. 50, 461 – 469.

González, F. (1990). Agroindustria de la miel. Aspectos técnicos. En: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Santiago, Chile. 5 – 11 p.

Graham., J. (1993). The hive and the honey bee. Hamilton, Illinois. U.S.A. 1324 p.

Howes, F.(1953). Plantas melíferas. Barcelona, España. Reverté. 326 p.

Jean – Prost, P. (1995). Apicultura. Mundi – Prensa. Madrid, España. 741 p.

Karabournioti, S. & Zervalaki, P. (2001). Efecto del calentamiento en el HMF y la Invertasa de la Miel. *Apiacta*. 36, 177 – 181.

Lehninger, A. L. (1995). Principios de Bioquímica. 2ª Ed. Omega, Barcelona .1013 p.

Mateo, R., Bosch – Reig, F. & Pastor, A. (1987). Capillary column gas chromatographic identification of sugars in honey as trimethylsilyl derivates. *Journal of Chromatography*. 410, 319 – 328.

Mateo, R. & Bosch – Reig, F. (1996). Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*. 60, 33 – 41.

Mateo, R. & Bosch – Reig, F. (1998). Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *J. Agric.Food Chem*. 46, 393 – 400.

Medeiros, P. & Simoneit, B. (2007). Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1141, 271 – 278.

Molina, L. (1988). Análisis de calidad de miel. En: Neira, M y Seeman, P. Tecnología de la producción apícola. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. 124 – 144.

Persano, L., Gioia, M. & Pulcini, P. (1999). Invertase activity in honey. *Apidologie*. 30: 57 – 65.

Preis, J. (1980). Carbohydrates: structure and function. En: The Biochemistry of plants: comprehensive treatise. (Ed). Academic Press. New York. 705 p.

Sanz, M., Sanz, J. & Martínez, I. (2002). Characterization of *o* – trimetilsilil oximes of disaccharides by gas chromatography – mass spectrometry. *Cromatographia*. 56, 617 – 622.

Simoneit, B., Elias, V., Kobayashi, M., Kawamura, K, Rushdi, A., Medeiros, P., Rogge, W. & Didyk, B. (2004). Sugars – dominant water – soluble organic compounds in soils and characterization as traces in atmospheric particulate matter. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5939 – 5949.

Sweeley, C., Bentley, R., Makita, M. & Wells, W. (1963). Gas - Liquid Chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2497 – 2507.

Wan, E & Yu, J. (2006). Determination of sugar compounds in atmospheric aerosols by liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1029, 175 – 181.

White, J., Kushnir, I. & Subers, M H. (1964). Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technology.* 18, 153 – 156.

White, J. (1975). Composition of honey. In Crane, E., *Honey: A Comprehensive Survey*, Heinemann, London, England. 180 – 194 p.