



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura

---

Tesis presentada por la Licenciada en Ciencias Químicas

**Diana Corina Fechner**

Para optar al grado académico  
Doctor de la Universidad Nacional  
del Nordeste en Química

Título:

**“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE POTENCIALES  
MARCADORES QUIMICOS DE TRAZABILIDAD EN  
MIELES PRODUCIDAS EN LA REGION NORDESTE DE  
ARGENTINA”**

---

Director: Dr. Roberto Gerardo Pellerano

2018

---

*Lic. Diana Corina Fechner*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional del Nordeste por brindarme la posibilidad de realizar mi formación de grado y posgrado.*

*A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE), por permitirme realizar esta tesis en su casa de estudios.*

*Al Instituto de Química San Luis (UNSL-CONICET) por permitirme realizar las determinaciones minerales de mis muestras.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el financiamiento de este trabajo.*

*A los evaluadores, y a la comisión de posgrado por cumplir con las tareas de evaluación y seguimiento de la tesis.*

*A mi director de tesis por los conocimientos y el apoyo que me brindó durante estos años.*

*A todas aquellas personas que colaboraron en forma directa o indirecta a que este trabajo sea posible.*

*A mi Esposo y Familia, por su apoyo y cariño incondicional.*



## RESUMEN

Según el Código Alimentario Argentino, se entiende por miel el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena.

En la Argentina, la apicultura se remonta a los pobladores originarios, quienes otorgaban un gran valor a los recursos representados por la miel y la cera, por lo que desarrollaron habilidades para localizar los refugios naturales de las abejas y para cosechar sus productos. Con la introducción de las primeras colmenas de la abeja europea –*apis mellifera*– en Mendoza y Buenos Aires, a mediados del siglo XIX, se comenzó el desarrollo de la apicultura como actividad complementaria o doméstica, extendiéndose rápidamente a otras provincias del país, como ser San Juan, San Luis, La Rioja, Santa Fe, Córdoba. En la actualidad, la producción de miel y otros productos de la abeja se realiza en casi todo el territorio nacional, debido a la evolución de la industria apícola durante el siglo XX.

La producción y las exportaciones de miel argentina se intensificaron en las décadas de 1970 y 1980, debido a un proceso general de crecimiento del mercado mundial de la miel. La apicultura argentina es en la actualidad uno de los principales protagonistas del mercado mundial, ya que cuenta con singulares ventajas, como ser una oferta floral importante, amplitud de climas para la producción, y ventajas competitivas debido al fuerte trabajo que realiza el sector productivo en materia de mejora continua de la calidad y del sistema de rastreabilidad o trazabilidad vigente (Resolución N° 186/2003), reconocido hoy por los

principales compradores de miel del mundo. Así, en la Argentina se obtienen diferentes tipos de mieles, a las cuales es posible incorporar valor agregado a través de distintos mecanismos de diferenciación, los cuales no están aún muy desarrollados. Estos pueden ser el fraccionamiento, la tipificación por origen geográfico, la tipificación por origen botánico, la certificación de calidad por protocolos, o la producción orgánica, por ejemplo.

El 98% de la miel producida en la Argentina es destinado al mercado externo, enviándose como producto a granel no diferenciado, mientras que solamente el 2% restante se exporta fraccionado (diferenciación de producto). De esta manera se observa una reducida diferenciación por calidad, denominación de origen (DO), región geográfica, origen botánico, etc. Para ello valor a este producto, entre las estrategias de diferenciación que representan las mejores maneras de alcanzarlo, están las denominaciones de origen, los protocolos basados en atributos particulares, el origen botánico y geográfico. Es por eso que a los ya implementados programas de trazabilidad registral oficiales y privados, cabría establecer y agregar un sistema de trazabilidad químico que certifique el origen geográfico de una muestra de miel en cualquier instancia de su producción, de forma de garantizar al comprador el origen, y al vendedor el pago correspondiente por ese producto con valor agregado. Por esta razón, esta tesis propuso estudiar la presencia de marcadores químicos de trazabilidad en mieles producidas en la región del noreste de Argentina (Formosa, Chaco, Corrientes y Misiones), contribuyendo también en la determinación de la composición multielemental de estos alimentos. El plan propuso también utilizar métodos de análisis de datos (quimiométricos) en función de extraer información química relevante para la propuesta de modelos predictivos con el fin de resolver problemas de autenticación o confirmación de identidad de mieles provenientes de la región en estudio.

Se estudiaron entonces en este trabajo de tesis, muestras de miel provenientes de las provincias de Formosa, Chaco, Corrientes y Misiones, evaluando la calidad física y química

de las muestras, para con la información generada realizar análisis multivariados a fin de hallar modelos predictivos de autenticidad de origen de las mieles estudiadas. El plan se ejecutó en dos etapas:

1- Campañas 2011-2012: se obtuvieron 141 muestras provenientes de cuatro cuencas productoras de la provincia de Corrientes. Todas las muestras fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico mediante la determinación de nueve parámetros: Humedad, Color, Acidez, Hidroximetilfurfural, Conductividad eléctrica, Prolina, Diastasa, Azúcares reductores y Sacarosa aparente. Los resultados obtenidos fueron analizados por técnicas multivariadas de análisis, lográndose una clasificación correcta del 66% de las muestras estudiadas. Sin embargo, este porcentaje se vio fuertemente aumentado (97%) al considerar muestras de otra provincia (Formosa). Esta primera etapa del trabajo de tesis permitió demostrar que, si bien la información fisicoquímica resulta útil para evaluar la calidad y aptitud de las mieles, esta información solo permite obtener modelos predictivos subóptimos, haciendo necesario incorporar nueva información complementaria a partir de técnicas de naturaleza diferente a las consideradas.

Campañas 2015-2016: se obtuvieron 50 muestras provenientes de diferentes cuencas productoras de las cuatro provincias que forman parte del NEA. Todas las muestras fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico mediante la determinación de cinco parámetros: Humedad, Color, pH, Conductividad eléctrica e Hidroximetilfurfural. Adicionalmente se determinaron las concentraciones de tres elementos minoritarios por AAS (K, Na y Mg) y 37 elementos a nivel de vestigios por ICP-MS. Todas las metodologías analíticas fueron validadas, y los resultados analizados por técnicas de análisis multivariado. Si bien en un inicio se consideraron las cuatro provincias de origen como variable a ser modelada, el análisis exploratorio de la matriz de resultados indicó una gran similitud entre las muestras provenientes de las provincias de Chaco y Formosa, resultando conveniente modelar la información para predecir en solo tres grupos de origen geográfico, agrupando

en una sola región las muestras provenientes de estas dos provincias. Al utilizar solo la información contenida en las variables multielementales se alcanzó un modelo predictivo por ALD con un 100% de acierto en las muestras que fueron modeladas, pero que disminuye fuertemente al ser sometido al método de validación cruzada (76% de acierto). Se hizo necesario entonces utilizar toda la información disponible respecto a las muestras para mejorar el desempeño de los modelos predictivos propuestos. Con este objetivo, se realizó una fusión de datos a bajo nivel de las matrices de datos multielementales y fisicoquímicos. El modelo predictivo por ALD obtenido a partir de la matriz de datos fusionada alcanzó un 100% de acierto de las muestras usadas para entrenamiento y 94% por validación cruzada. Los resultados alcanzados son considerados muy satisfactorios para el cumplimiento de los objetivos propuestos en la tesis, descartándose los resultados de otras técnicas de clasificación analizadas, tales como k-vecino más cercano, máquinas de vectores soporte o árboles aleatorios, que también fueron ensayadas y cuyos resultados obtenidos siempre fueron de menor calidad que aquellos correspondientes al análisis discriminante lineal. En resumen, el abordaje del problema científico para la realización del presente trabajo de tesis permitió a la tesista llevar a la práctica todas las etapas del método científico, desde el análisis de un problema científico, su planteamiento, enunciar hipótesis, proponer posibles soluciones y metodologías de trabajo, validar las herramientas de medición experimental, obtener y analizar resultados, para generar respuestas al problema original planteado. Adicionalmente, se logró alcanzar todos los objetivos particulares planteados y en consecuencia el objetivo general de esta tesis, constituyendo de esta manera un importante aporte al conocimiento de la composición química nutricional de mieles de gran importancia en la región.

## Contenido

Resumen .....	4
Capítulo I: Introducción .....	14
1. Breve historia de la apicultura argentina .....	14
1.1. Prácticas apícolas premodernas y abejas nativas .....	14
1.2. La apicultura moderna: introducción de la abeja europea .....	14
2. Producción actual de miel argentina .....	16
2.1. La expansión productiva .....	17
2.2. La producción en las provincias del Nordeste argentino .....	19
3. El mercado de la miel argentina .....	24
3.1. La cadena productiva de la miel .....	25
3.2. Exportación.....	26
4. Zonas geográficas seleccionadas para este estudio .....	29
4.1. La Provincia de Formosa .....	30
La Provincia de Chaco.....	31
La Provincia de Corrientes.....	31
La Provincia de Misiones .....	32
5. Denominación de origen protegida.....	33
Capítulo II: Espectrometría atómica .....	39
1. Espectrometría de Absorción Atómica por llama y horno de grafito .....	39
1.1. Lámpara de cátodo hueco .....	41
1.2. Llama .....	42
1.3. Horno de grafito .....	43
1.4. Plasma acoplado por inducción .....	45
1.5. Corrección de fondo .....	45
1.6. Interferencias .....	47



1.7.	Detectores .....	48
2.	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente .....	50
2.1.	Generalidades.....	50
2.2.	Componentes del equipo ICP-MS .....	53
2.3.	Introducción de la muestra.....	54
2.4.	Fuente de ionización: Antorcha .....	55
2.5.	Interfase de extracción .....	56
2.6.	Celda de colisión/reacción: Octapolo .....	58
2.7.	Lentes iónicas .....	59
2.8.	Espectrómetro de masas: Cuadrupolo .....	60
2.9.	Detector: Multiplicador de electrones .....	61
	Objetivos Generales .....	65
	Objetivos Particulares .....	65
	Hipótesis .....	66
	Materiales y métodos .....	65
	Capítulo III: Materiales y métodos .....	67
1.	Muestras de miel.....	67
1.1.	Provincia de Formosa .....	68
1.2.	Provincia de Chaco .....	68
1.3.	Provincia de Corrientes .....	68
1.4.	Provincia de Misiones.....	69
2.	Determinaciones fisicoquímicas.....	69
2.1.	Humedad.....	70
2.2.	Color .....	71
2.3.	pH.....	73
2.4.	Conductividad.....	73

2.5. Hidroximetilfurfural.....	74
2.6 Determinaciones fisicoquímicas realizadas en las muestras provenientes de la provincia de Corrientes .....	75
3. Determinación multielemental.....	77
3.1. Digestión de las muestras.....	77
3.2. Análisis mediante AAS .....	77
3.3. Análisis mediante ICP-MS .....	79
4. Análisis multivariado .....	83
4.1. Análisis exploratorio .....	84
4.2. Análisis clasificatorio de datos.....	91
Capítulo IV: Resultados y discusión .....	99
1. Determinaciones fisicoquímicas.....	99
1.1. Humedad .....	100
1.2. Color .....	101
1.1. pH .....	103
1.2. Conductividad eléctrica.....	104
1.3. Contenido de hidroximetilfurfural.....	105
2. Determinación multielemental mediante espectroscopía atómica .....	106
3. Determinación multielemental en las muestras de miel .....	108
3.1. Elementos minoritarios.....	108
3.2. Elementos a nivel de vestigios .....	111
3.3. Tierras raras .....	116
4. Análisis multivariado.....	118
4.1. Muestras de la Provincia de Corrientes (campañas 2011-2012).....	119
4.2. Muestras del Nordeste Argentino (campañas 2015-2016).....	124
4.2.1. Análisis multielemental .....	125

4.2.2. Fusión de datos multielementales y físico-químico .....	133
Capítulo V: Conclusiones .....	145
Producción científica .....	148
1. Publicaciones con referato .....	148
2. Presentaciones en congresos y comunicaciones científicas .....	148
3. Trabajos enviados a publicar en evaluación .....	149
Becas obtenidas: .....	149

# INTRODUCCIÓN



## Capítulo I: Introducción

### 1. Breve historia de la apicultura argentina

#### 1.1. Prácticas apícolas premodernas y abejas nativas

En Argentina, al igual que en el resto de América, la apicultura tiene una larga historia que se remonta desde mucho antes de la llegada de la abeja europea –*apis mellifera*– a mediados del siglo XIX. Los pobladores originarios de estas tierras otorgaban un gran valor a los recursos representados por la miel y la cera, incluso antes de la llegada de los españoles al continente, por lo que desarrollaron habilidades tanto para localizar los refugios naturales de las abejas como para cosechar sus productos. Dicho interés propició, en algunos casos, la clasificación de la miel según el lugar donde se la recolectaba y según el tipo de abeja que la elaboraba.

Hasta la primera mitad del siglo XIX la práctica apícola se desarrolló como actividad complementaria o doméstica, siendo excepcional el caso de Santiago del Estero donde alcanzó magnitudes industriales. Allí funcionó antes de la llegada de la abeja europea un importante centro productor de miel y cera, desde donde se distribuían hacia territorios vecinos [1].

#### 1.2. La apicultura moderna: introducción de la abeja europea

Hacia mediados de siglo XIX se introdujeron exitosamente las primeras colmenas de *apis mellifera*. Este proceso se desarrolló a través de dos experiencias casi simultáneas en Mendoza y Buenos Aires. La primera tuvo lugar en el año 1855 cuando Miguel Pouget propagó en Mendoza, desde Chile, la apicultura por el sistema movilista; y la segunda en 1857, cuando la familia Casares estableció el primer apiario ubicado en la provincia de Buenos Aires, conformado por 14 colmenas. Estas dos locaciones funcionaron en los años siguientes como verdaderos puntos de irradiación de la abeja europea, y de las prácticas utilizadas para su cría,

hacia el interior del país. Las colonias introducidas por Pouget se multiplicaron rápidamente, sobre todo debido a la presencia de alfalfares destinados al engorde de hacienda vacuna, y desde allí se propagaron hacia San Juan, San Luis, La Rioja y a otras provincias del norte argentino. Del mismo modo, ya sea a través de su traslado como también por medio de enjambres naturales, las colmenas ubicadas en Buenos Aires permitieron la propagación de la abeja europea hacia provincias vecinas, siendo significativo el modo en que esta actividad se expandió hacia Santa Fe, donde en 1862 ya existían apicultores que poseían hasta 200 colmenas. Otra provincia que también se mostró receptiva al avance de la apicultura fue Córdoba, donde las abejas europeas llevadas desde Mendoza se adaptaron rápidamente [1].

Cabe mencionar que, a pesar del progreso de la apicultura en algunas ciudades, y de las ventajas productivas que presentaban las abejas *apis mellifera* en comparación con las tradicionales meliponas y trigonas, estas últimas siguieron siendo explotadas, aunque cada vez en menor medida - práctica que en la actualidad es conocida bajo la denominación de meliponicultura.

Hacia 1923 se produjo un aumento considerable en el número total de colmenas, principalmente en Mendoza, Misiones, Entre Ríos, Santa Fe y Río Negro. Y hacia 1927 se desarrolló un importante aumento tanto en el número de colmenas como en la cantidad de miel obtenida, cuadruplicándose la producción total del país con respecto a 1923, registrándose, además, tanto una extensión de la zona apícola tradicional como una persistencia de la importancia relativa de las zonas productivas más significativas (Buenos Aires y Mendoza).

La relevancia de la evolución mostrada por la industria apícola argentina hacia mediados del siglo XX se debió principalmente a los nuevos procedimientos utilizados, donde se destacó la generalización de las colmenas a cuadros. Comenzó, entonces, a utilizarse el modelo Langstroth, patentado en Estados Unidos en 1852. Su característica principal radica en la

utilización de una colmena de tipo vertical (Figura 1.1), que revolucionó la apicultura con sus cuadros y alzas móviles [2].



*Figura 1.1. Colmena de tipo vertical.*

Otro factor de relevancia en la apicultura argentina fue la fundación en 1938 de la Sociedad Argentina de Apicultores (SADA), organización no gubernamental que desde entonces se dedicó al estudio y divulgación de los conocimientos apícolas, dando un importante incentivo a la actividad y a sus industrias derivadas.

## **2. Producción actual de miel argentina**

La producción y las exportaciones se intensificaron en las décadas de 1970 y 1980. A lo largo de estas dos décadas, los principales compradores de miel argentina fueron Alemania Federal, Japón, Estados Unidos, Reino Unido, Italia y España. Es posible ubicar este aumento de las exportaciones dentro de un proceso general de crecimiento del mercado mundial de la miel, que alcanzó las 150 mil toneladas en 1970 y que superó las 260 mil en 1980.

La apicultura argentina es hoy uno de los principales protagonistas del mercado mundial, ya que cuenta con singulares ventajas, como ser una oferta floral importante, amplitud de climas para la producción, y ventajas competitivas debido al fuerte trabajo que realiza el sector productivo en materia de mejora continua de la calidad y del sistema de rastreabilidad o



trazabilidad vigente, reconocido hoy por los principales compradores de miel del mundo. Así, en la Argentina se obtienen diferentes tipos de mieles, a las cuales es posible incorporar valor agregado a través de distintos mecanismos de diferenciación, los cuales no están aún muy desarrollados. Estos pueden ser el fraccionamiento, la tipificación por origen geográfico, la tipificación por origen botánico, la certificación de calidad por protocolos, o la producción orgánica, por ejemplo.

El rendimiento promedio nacional de miel se encuentra entre los más altos del mundo, cercano a los 30 kg/colmena/año. Por otra parte, el principal continente productor de miel es Asia, seguido por América, donde el Mercado Común del Sur (MERCOSUR) exporta el 10% de la producción mundial.

### **2.1. La expansión productiva**

En la década de 1990, una expansión de la demanda internacional de la miel motivó adelantos en las prácticas apícolas. De este modo, se profundizaron los avances en materia de investigación y tecnología introducidos a partir de 1970, y se pusieron en marcha programas de rastreabilidad o trazabilidad registral, referidos al registro sistemático de la obtención de la miel, identificando y registrando la miel desde el momento de la extracción, traslado, fraccionamiento y exportación. Esto último satisfaciendo las crecientes exigencias establecidas por los países compradores, permitió una nueva expansión de la productividad y de la capacidad de comercialización de los productos apícolas nacionales. Así, hacia mediados de 1990, la apicultura argentina experimentó una importante expansión, ubicándose entre los tres primeros productores mundiales de miel por detrás de China y Estados Unidos [3]. En sólo catorce años, entre los Censos Nacionales Agropecuarios correspondientes a 1988 y 2002, el número total de colmenas en el país aumentó de 966.954 a 1.462.460, mostrando un incremento de alrededor del 50% [4]. Diversas publicaciones del Ministerio de Agroindustria de la Nación señalan que esta expansión se debió al incremento

del precio de la miel en el mercado mundial, como consecuencia de la menor producción obtenida en los países tradicionalmente productores por cuestiones sanitarias, climáticas y de africanización de las abejas.

A partir de 2002, la devaluación de la moneda generó una importante entrada de divisas para el sector, situación que se vio acompañada de precios internacionales favorables durante la temporada 2002/2003. Sin embargo, durante los años inmediatamente posteriores a la devaluación, las condiciones climáticas adversas impidieron un aumento considerable de la producción.

A lo largo de la temporada 2005/2006 se produjeron alrededor de 104.000 toneladas de miel a granel y fraccionada, lo que representó el máximo volumen de producción alcanzado hasta la actualidad. Sin embargo, en las temporadas siguientes se puso de manifiesto una visible reducción de la producción, que hacia marzo de 2009 y 2010 alcanzó un volumen cercano a las 60.000 toneladas anuales [4], indicando una merma cercana al 30% con respecto a 2005/2006. Esta disminución puede explicarse no sólo debido a las condiciones climáticas desfavorables que afectaron durante esos años a las principales provincias productoras de miel (Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, La Pampa y Chaco), con considerables bajas en las precipitaciones que generaron una consecuente reducción en el número de flores disponibles, sino también debido a las consecuencias del avance de los procesos de la agricultura, principalmente al cultivo de soja y la intensificación en el uso de agroquímicos. Entre los años 2011 y 2016, la producción anual de miel argentina fluctuó entre 45.000 y 80.000 toneladas.

Según el Ministerio de Agroindustria de Argentina, existen en Argentina alrededor de 20.000 apicultores que poseen 2,5 millones de colmenas [5], siendo Buenos Aires la provincia con mayor número de productores y colmenas [6]. La apicultura argentina puede ser considerada

en su gran mayoría como no profesionalizada debido a que la escala de producción suele ubicarse por debajo de la mínima rentable de 350 colmenas.

## 2.2. La producción en las provincias del Nordeste argentino

Las provincias del Nordeste Argentino, por las características agroecológicas y la gran variedad de flora melífera poseen excelentes condiciones para la producción apícola, evidenciándose un crecimiento significativo en la producción de miel, convirtiéndose ésta en una alternativa productiva para diversificar e implementar pequeñas y medianas empresas.

### *La Provincia de Formosa*

La provincia de Formosa (Figura 1.2) cuenta con características naturales que la hacen inigualable en cuanto a la vegetación de montes nativos.



Figura 1.2. Mapa político de la provincia de Formosa

La mayoría de los apiarios se ubican a orillas de los ríos, en montes xerófilos, bosques en galerías, o en campos alejados de toda actividad humana sobre todo aquella relacionada a la

agricultura (de escaso avance en la provincia), lo que le confiere a la miel características ecológicas u orgánica por naturaleza.

El 96% de las especies utilizadas por las abejas para la elaboración de las mieles corresponden a la flora nativa, en tanto que solamente el 4% corresponde a plantas exóticas.

La provincia de Formosa cuenta con aproximadamente 700 productores apícolas registrados, de los cuales más de la mitad poseen menos de 20 colmenas [7].

### *La Provincia de Chaco*

Actualmente la provincia de Chaco cuenta con aproximadamente 1.200 apicultores, los cuales manejan en su mayoría explotaciones chicas que no superan las 60 colmenas y el total de unidades de la provincia oscila aproximadamente las 85.000, concentrándose mayormente en el norte provincial, en la zona del Impenetrable. En los humedales, por otra parte, se dedican también a la producción orgánica de miel, compensando la menor producción por colmena que presenta dicha zona.

En la actualidad existen doce salas fijas y una sala móvil habilitadas; la provincia se encuentra dividida en siete zonas apícolas, cada una con al menos un técnico apícola asesorando oportunamente ante alguna situación. Cuenta con doce marcas habilitadas e incluso algunas de ellas viajan a Ushuaia como la Cooperativa COPAP que actualmente se identifica por sus procesos de calidad y Buenas Prácticas de Manufactura, certificaciones kosher, orgánica, sin TACC y próximamente Alimentos Argentinos y Halal. A su vez esta cooperativa se alimenta de un Consorcio apícola que nuclea cinco cooperativas de la provincia para asegurar la continuidad y un producto netamente autóctono [8].

La provincia está dividida en siete zonas apícolas, que se muestran en la Figura 1.3.

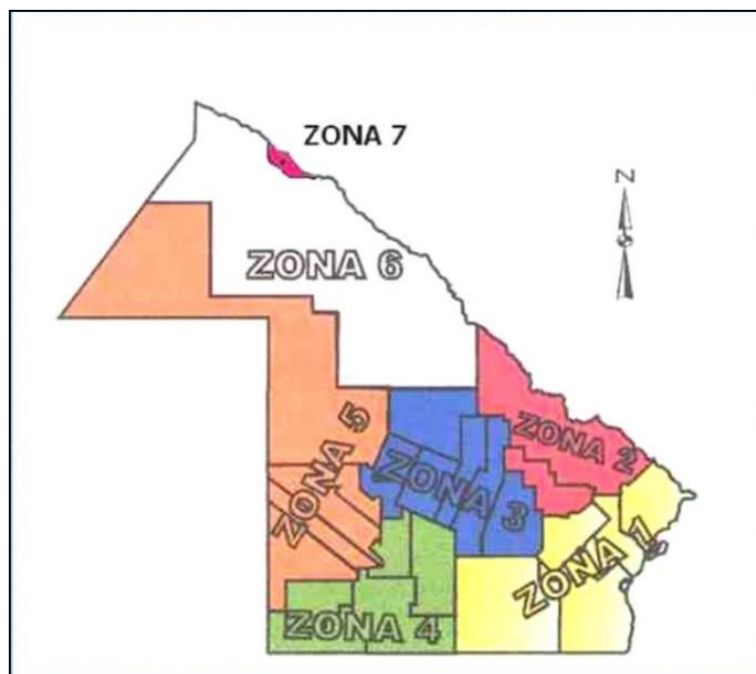


Figura 1.3. Cuencas apícolas de Chaco

La zona 1 (Resistencia, Barranqueras e Islas) es una zona caracterizada por bañados y esteros, recorrida por los ríos Paraná, Bermejo y Negro, cuya floración se inicia en agosto-septiembre y se extiende hasta marzo. La zona 2 (General San Martín) está caracterizada por monte nativo, recorrida por los ríos Bermejo, de Oro, Guaycurú, arroyos y bañados. La floración comienza en el mes de agosto y continúa en noviembre con especies del monte. La zona 3 (Centro) tiene una flora que se caracteriza por iniciar la actividad en el mes de agosto con el cultivo del trébol y el monte natural. La zona 4 (Sudoeste) está compuesta por montes, bañados y campos naturales dedicados a la cría de ganado bovino, con una superficie de más de un millón de hectáreas, cubiertas por flores naturales y escasa población. La zona 5 (Charata-Las Breñas) tiene un paisaje de llanura salpicado de explotaciones agropecuarias, ganaderas y forestales que hacen propicia una actividad que data de más de 70 años. La floración comienza en primavera continuando con la implantación de girasol en el mes de octubre y finaliza con especies naturales en los meses de marzo-abril. La zona 6 (Impenetrable chaqueño) cuenta con más de 4.000 km<sup>2</sup> de monte, es una de las zonas más características

por su variedad de flores naturales del Chaco. El 80% de la floración de esa zona se inicia en agosto-septiembre. Y la zona 7 (El Sauzalito) se trata del Chaco árido, región con muy escasas precipitaciones, las que generan un ambiente xerófilo con especies arbóreas principalmente.

### *La Provincia de Corrientes*

Desde el 2004 se iniciaron actividades que incentivaron paulatinamente el crecimiento de la actividad apícola en la provincia de Corrientes: se dictaron numerosos cursos de capacitación, se financió la instalación de plantas extractoras, se aseguró la comercialización de lo que se iba produciendo a través de la compra con destino a planes alimentarios, se instaló un Laboratorio de Análisis de Productos Apícolas.

Es habitual observar que en las proximidades de cultivos (cítricos, eucaliptos, etc.) se encuentran ubicadas colmenas, lo que evidencia que las abejas, y con ellas los apicultores, participan en medida considerable en la producción agrícola debido a la acción polinizadora de las abejas.

El origen floral de las mieles correntinas es muy variado: mieles de eucalipto, de citrus, de monte nativo y de estero e islas, variación que la hace diferenciada en gustos. Además de contar con recursos naturales que permiten producir mieles de alta calidad, la provincia cuenta con un protocolo unificado de producción de mieles sin antibióticos. “Miel de Corrientes” es un producto de calidad certificada, que se obtiene gracias a un protocolo provincial de manejo de colmenas.

La provincia cuenta con más de 600 apicultores registrados, con un promedio de menos de 50 colmenas cada uno. Son cinco las salas de extracción de miel habilitadas en la provincia que cumplen las normativas nacionales y provinciales, asegurando la calidad para la comercialización. Por conveniencia, la provincia se divide en seis cuencas apícolas, las cuales se muestran en la Figura 1.4.

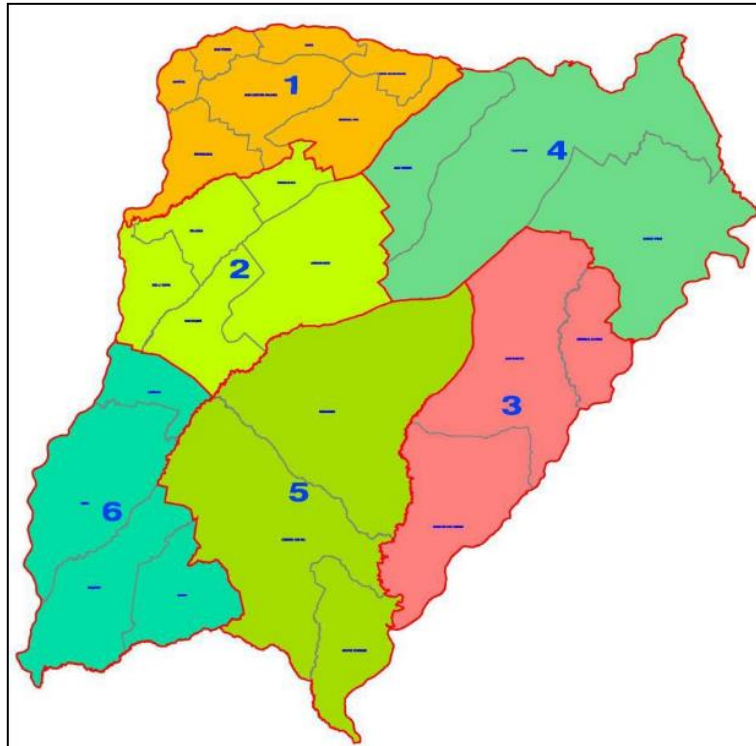


Figura 1.4. Cuencas apícolas de la provincia de Corrientes [9].

En la figura precedente se visualizan los departamentos que pertenecen a cada cuenca:

Cuenca 1: San Cosme, Itatí, Berón de Astrada, San Luis del Palmar, Capital, Empedrado, General Paz; Cuenca 2: Mburucuyá, Saladas, Concepción, San Roque, Bella Vista; Cuenca 3: San Martín, General Alvear, Paso de los Libres; Cuenca 4: Santo Tomé, San Miguel, Ituzaingó; Cuenca 5: Mercedes, Curuzú Cuatiá, Monte Caseros; y Cuenca 6: Lavalle, Goya, Esquina, Sauce.

### ***La Provincia de Misiones***

La provincia de Misiones también muestra un aumento de la actividad apícola, aunque desde hace menos tiempo. Actualmente está conformado un Clúster Apícola, y desde el Plan Apícola de la provincia se busca fortalecer la actividad brindando asistencia técnica, mayores recursos para el productor, material inerte y mejoramiento genético.

Las mieles son casi todas multifloras, siendo las especies nativas las de mayor predilección por las abejas, principalmente de las familias *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Rutaceae* entre otras.

Se estima que la provincia de Misiones (Figura 1.5) cuenta con más de mil productores de miel, mayormente de pequeña dimensión (10 a 20 colmenas) a los cuales se les dificulta adecuarse a las normas sanitarias vigentes en la actualidad.



Figura 1.5. Mapa político de la provincia de Misiones.

### 3. El mercado de la miel argentina

Según el Código Alimentario Argentino [10], se entiende por miel el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena. Se las puede clasificar según su origen botánico (uniflora o multiflora si es obtenida de flores). La miel obtenida primordialmente a partir de secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que se encuentran sobre ellas es lo que se conoce como miel de mielada. Según su presentación de



comercialización la miel puede presentarse en estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas; miel en panales; miel con trozos de panal; o miel cremosa.

### 3.1. La cadena productiva de la miel

La cadena de producción de la miel representa alrededor del 0,2% del Producto Bruto Interno nacional (PBI), por eso puede considerarse que conforma una trama de dimensiones económicas menores para la economía argentina. Además, tanto la naturaleza del producto como las características particulares de sus mercados se traducen en una cadena operativa poco compleja y de baja incorporación de valor agregado. Los eslabones que la componen pueden sistematizarse en: investigación tecnológica, provisión de insumos, materiales y equipamientos, producción primaria, procesamiento post-cosecha, circulación y comercialización [2].

La aplicación de los sistemas de gestión y el control de la cadena productiva y sus respectivas normas de trazabilidad fue una novedad en el país, constituyendo uno de los primeros sectores agroalimentarios en poseer una normativa de trazabilidad en Argentina, con la Resolución N° 186/2003 de rastreabilidad o trazabilidad de la miel [11]. Esta resolución establece cómo se procederá en la identificación y el registro de la miel desde el momento de la extracción, traslado, fraccionamiento y exportación. Tanto el Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA) como el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) participan de este proceso, permitiendo que el productor se encuentre individualizado, que las salas de extracción por donde pasa la miel exportada estén inscriptas y habilitadas, que se lleve un registro sistemático de la miel cosechada. El RENAPA -creado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP) en 2001- registra a los productores del país, quienes una vez inscriptos tienen la obligación de actualizar el registro cada vez que se da una variación en el número de colmenas que poseen; mientras que el SENASA es el responsable de la fiscalización y auditoría de las salas de extracción, siendo una

de sus principales tareas hacer cumplir las denominadas Buenas Prácticas Apícolas y de Manufactura. Cabe destacar que la miel que se destina al mercado interno no cuenta necesariamente con el control de dicho organismo.

El proceso de investigación se encuentra vinculado estrechamente con las exigencias que establecen los compradores extranjeros respecto a la calidad del producto. En respuesta a los estándares que se imponen a las exportaciones, se desarrolla una importante actividad de selección y mejoramiento genético, que tiene además el objetivo de aumentar la productividad y reducir los costos. En este orden, una motivación fundamental radica en la búsqueda del acceso a material vivo de calidad, que posea además alta tolerancia a las enfermedades y bajo comportamiento defensivo que facilite el trabajo en el apiario. Las entidades que llevan adelante el proceso de investigación en el país son principalmente el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que desarrolla proyectos nacionales de investigación apícola, el SENASA, y diversas universidades y centros de investigación públicos y privados que efectúan proyectos regionales. Actualmente hay proyectos concretos que involucran a distintas instituciones, con el objetivo de avanzar en la caracterización de las mieles que se producen en el país. Esto, con la posibilidad de caracterizar una miel particular permite que ésta ocupe un lugar diferencial y, posiblemente alcance un mejor precio, ya que en el mundo hay una gran oferta de miel que a menudo procede de países con gran capacidad productiva, y los precios internacionales de productos a granel a veces no permiten sostener una actividad o no resultan demasiado rentables.

### **3.2. Exportación**

El destino principal de la producción de miel, y de la gran mayoría de los productos elaborados (cera, propóleos y material vivo, entre otros), es la exportación. Argentina ocupa un lugar central en el mercado internacional de la miel debido a la creciente demanda internacional, y al no existir un mercado de consumo interno desarrollado, se exporta alrededor del 95% de

la producción total, principalmente a granel y sin diferenciación, mayoritariamente a Alemania, Estados Unidos de América y Japón. Actualmente, y desde hace varios años, la Argentina es el segundo exportador de miel de calidad y el tercer productor a nivel mundial [11, 12]. Es responsable de producir el 10% de la miel que se consume en el mundo y el 75% del producto apícola de Latinoamérica.

Son 12 las provincias exportadoras de miel de Argentina, donde Buenos Aires lidera en el ranking, siguiéndole en orden de importancia Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos. De las provincias del Nordeste Argentino, la provincia de Chaco es la que más se destaca en exportación [14], si bien Corrientes también incursiona en el mercado internacional [15].

Cabe destacar que Argentina atravesó dos situaciones conflictivas que se vieron reflejadas a su vez en inconvenientes para la colocación de la producción nacional en los mercados extranjeros. Por un lado, el incremento del arancel de exportación de hasta un 60% realizado por Estados Unidos durante el año 2001, que provocó una reducción de las exportaciones a ese país. Y por otro, la detección de nitrofuranos (prohibido en la apicultura) en un embarque a fines del año 2003 en Inglaterra. Esto generó una tendencia negativa en las exportaciones durante el año 2004. Estas situaciones y la clara vocación exportadora de la producción apícola nacional, han llevado a diseñar programas de trazabilidad oficiales y privados, a fin de garantizar la calidad de los productos apícolas y así poder continuar exportándolos a los mercados internacionales más exigentes.

Desde la década de 1990 a la actualidad, el volumen exportado de miel argentina promedia las 60.000 toneladas, con su máximo superando las 100.000 toneladas en los años 2005 y 2006. Entre los años 2011 y 2016 el rango de exportación fue entre 45.000 y 81.000 toneladas.

Según un Informe de la Cadena Apícola [16], los principales destinos del año 2016, según el volumen en toneladas exportadas, fueron Estados Unidos, Alemania, España, Francia, Italia,

y Arabia Saudita. Estos países y algunos otros son los que a lo largo del tiempo han sido los principales destinos de la miel argentina exportada.

En los últimos años Estados Unidos ha pasado a ser el principal importador de miel del mundo, siendo Argentina su principal proveedor (30%); por otro lado, Alemania es el segundo importador de miel del mundo, y Argentina es el principal proveedor de miel a Alemania con una participación de 17%.

El 98% del producto destinado al mercado externo se envía como commodity (producto a granel no diferenciado), mientras que solamente el 2% restante se exporta fraccionado (diferenciación de producto). De esta manera se observa una reducida diferenciación por calidad, denominación de origen (DO), región geográfica, origen botánico, etc. Es necesario por ello promocionar todas aquellas acciones que tengan como objetivo incorporar valor agregado, mejorar la calidad del producto y el desarrollo de nuevos mercados. Argentina debe comprender la nueva realidad y adaptar sus productos a los requerimientos de los consumidores de todo el mundo. Para ello, entre las estrategias de diferenciación que representan la mejor manera de lograr mejores valores agregados, están las denominaciones de origen, los protocolos basados en atributos particulares, el origen botánico y geográfico. Argentina debe trabajar para mejorar el posicionamiento en el mundo de la miel que produce [17].

A los ya implementados programas de trazabilidad registral oficiales y privados, cabría establecer y agregar un sistema de trazabilidad químico que certifique el origen geográfico de una muestra de miel en cualquier instancia de su producción, de forma de garantizar al comprador el origen, y al vendedor el pago correspondiente por ese producto con valor agregado. Por esta razón, esta tesis propone estudiar la presencia de marcadores químicos de trazabilidad en mieles producidas en la región del noreste de Argentina mediante el uso de las denominadas técnicas de huella dactilar, con especial énfasis en la determinación de la

composición multielemental de estos alimentos. El plan propone también utilizar métodos de análisis de datos (quimiométricos) que permitan extraer información relevante para la propuesta de modelos predictivos con el fin de resolver problemas de autenticación o confirmación de identidad de mieles provenientes de la región en estudio, y de esta manera contribuir al desarrollo y establecimiento de sistemas de control de la trazabilidad químicos de estos alimentos.

#### 4. Zonas geográficas seleccionadas para este estudio

Esta tesis de doctorado estudia muestras de miel de las provincias del noreste argentino: Formosa, Chaco, Corrientes y Misiones. La Figura 1.6 muestra un mapa de Argentina donde se hallan resaltadas las mencionadas provincias.



Figura 1.6. Mapa de la República Argentina, indicándose las provincias estudiadas. 1: Formosa; 2: Chaco; 3: Corrientes; 4: Misiones.

#### 4.1. La Provincia de Formosa

La Provincia de Formosa ocupa el Territorio Chaco Central, definido como una sabana - parque integrante del ecosistema de la llanura chaqueña, con una superficie de 72066 Km<sup>2</sup>, dentro de una región subtropical. Las temperaturas máximas se registran en los meses de diciembre y enero y el carácter continental del clima se manifiesta a través de las variaciones térmicas diarias que aumentan de Este a Oeste. En cuanto al régimen pluviométrico, las precipitaciones se sitúan en torno a los 1200 mm anuales en el Este, disminuyendo gradualmente hacia el Oeste hasta alcanzar los 600 mm en el límite con la provincia de Salta. El territorio provincial se encuentra dividido en tres áreas desde el punto de vista agroecológico, donde se distinguen dos tipos climáticos definidos y un tercero de transición:

1. Al Oeste el clima es cálido, con moderadas amplitudes térmicas estacionales y un balance hídrico deficitario. Esta zona comprende los departamentos Ramón Lista, Matacos y Bermejo. El clima es subtropical con estación seca, con marcadas características de región árida.
2. Al Este el clima es cálido subtropical húmedo, con precipitaciones superiores a los 1200 mm anuales. Esta zona comprende los Departamentos de Formosa, Pilcomayo, Pilagás, Pirané y Laishí.
3. Entre las zonas anteriores se ubica una amplia zona en la que se observa, de Este a Oeste, una gradual disminución de las precipitaciones, las que pasan de 1000 mm a 650 mm anuales. Esta zona abarca el Departamento Patiño y una fracción del departamento Bermejo.

En la Provincia hay más de 400 apicultores registrados con Número de Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA) y otros tantos que desarrollan la actividad desde la informalidad, siendo estos últimos en su mayoría los que abastecen el consumo de miel del mercado interno de la provincia. La cantidad de colmenas registradas es de 21700, aunque este valor es muy variable año a año [7].

### La Provincia de Chaco

El Chaco, con una superficie de 99633 km<sup>2</sup>, integra la región chaqueña (junto a la provincia de Formosa, el oeste de Salta, casi todo Santiago del Estero y el norte de Santa Fe).

El clima general de la provincia es de tipo subtropical. La humedad aumenta de oeste a este, siendo el sector oeste de la provincia muy árido, con una estación seca de escasas lluvias, y tan sólo unos 600 milímetros por año. El sector este, por el contrario, es muy húmedo, y las precipitaciones llegan a los 1100 milímetros por año, y no presenta estación seca. La temperatura media anual es de 20 °C. Los vientos predominantes provienen del sur, sudeste, este y noreste.

La provincia del Chaco forma parte de la gran llanura chaco-pampeana que va desde Paraguay hasta la provincia de Buenos Aires. La vegetación predominante en casi toda esta región recibe el nombre de bosque chaqueño, caracterizado por árboles de madera dura. También se encuentran, pero en mucha menor cantidad, algunos pastizales. En las márgenes de los ríos se desarrollan selvas en galería, con vegetación muy abundante. Considerando la extensión de los grupos de plantas, se estudian tres regiones: los bosques occidentales, los bosques orientales y las selvas en galería. Además, se encuentran plantas de gran resistencia a la falta de agua en las zonas más secas. Y en las tierras arenosas hay bosquecillos, mientras en las zonas más húmedas o cercanas a los ríos hay juncales, totorales y pajonales. Por otra parte, en las zonas que tienen depresiones inundables se desarrollan palmares de caranday y pindó [18].

### La Provincia de Corrientes

Corrientes se extiende en una superficie aproximada de 88199 km<sup>2</sup>, se ubica en el centro de la región mesopotámica, en la zona donde confluyen los ríos Paraguay y Paraná. El clima que predomina en Corrientes es subtropical sin estación seca, con precipitaciones medias anuales

de 1300 mm y temperaturas elevadas, con escasas variaciones diarias y estacionales, sobre todo en el noroeste. El sur de la provincia de Corrientes presenta un clima más asociado con el templado pampeano.

Con la presencia y límite que ejerce la Laguna Iberá, la provincia puede ser dividida en dos zonas o regiones: occidental y oriental. La Zona Occidental de Corrientes se caracteriza por su suelo llano con leves ondulaciones de arena rojiza, rodeadas de bañados, esteros y pantanos a lo que concurren el terreno arcilloso y el perfil con escasa pendiente que retienen las aguas pluviales, destinado a la ganadería. El excelente clima ha dado lugar a bosques frondosos, a los que se suman los palmares que siguen los cursos de los ríos. La Zona Oriental de Corrientes ofrece un paisaje rocoso, con formaciones calcáreas y graníticas cubiertas por una capa de humus, surcada por el Aguapey y el Miriñay. En este sector se pueden distinguir dos subzonas: la Costa del Uruguay y la Subzona sur. En la Costa del Uruguay, el suelo es arenoso, con la presencia de ripios, observándose además, ondulaciones de arenas rojizas y extensos malezales. Existen zonas ganaderas, y se han desarrollado importantes cultivos, como el té, la yerba mate, el tung, la soja, y la forestación. La Subzona Sur está formada por una serie de cuchillas, lomas, lomadas, cerros, cerrillos, colinas, predominando el cultivo de plantas cítricas y forestales.

### **La Provincia de Misiones**

Su territorio ocupa una superficie de 29801 km<sup>2</sup>. Geológicamente integra el macizo de Brasilia a través de la meseta misionera. Dos tercios del territorio de Misiones tienen suelos derivados del basalto, de coloración rojiza o marrón-rojiza debido a la descomposición de los basaltos y metalíferos arcillosos; además poseen un alto contenido de óxido de hierro y aluminio. En algunos lugares el suelo es poco profundo y con rocas aflorantes, en otros pedregosos y con pendientes muy inclinadas. El clima en Misiones es subtropical sin estación seca, con precipitaciones que se producen durante todo el año que superan los 1600 mm



anuales. La región central y el Nordeste tienen marcas un poco más elevadas que las del resto de la provincia, lo cual explica la variedad y la exuberancia de la formación selvática propias de esas zonas.

A pesar de que la amplitud térmica no es de importancia entre estación y estación, puede producirse un cambio brusco de temperatura entre el día y la noche, especialmente en los lugares próximos a los cauces de agua.

## 5. Denominación de origen protegida

La producción de alimentos está conectada al ambiente, a los cambios socioeconómicos; y el consumo a la salud, a la seguridad y a los atributos nutricionales [19], además de las preferencias personales y posibilidades. En la actualidad, cada vez más los consumidores buscan alimentos certificados al momento de adquirir sus productos, ya sea en cuanto a nutrientes, origen, especificidad, etc. La Comunidad Europea tiene más trayectoria tanto en tiempo como en reglamentos, siendo el queso Roquefort el primer alimento con denominación de origen, desde el año 1925.

La regulación internacional está dada por la firma de Acuerdos sobre Aspectos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio (ADPIC, 1994) aprobado por ley N° 24425. En la Argentina, la Ley N° 25380 y 25966 constituyen un régimen legal para las indicaciones geográficas y denominaciones de origen de productos agrícolas y alimentarios, exceptuados los vinos y las bebidas espirituosas de origen vínico [13]. En el artículo 2, se define como Indicación geográfica “aquella que identifica un producto como originario del territorio de un país, o de una región o localidad de ese territorio, cuando determinada calidad u otras características del producto sean atribuibles fundamentalmente a su origen geográfico”. Y define como Denominación de Origen “el nombre de una región, provincia, departamento, distrito, localidad o de un área del territorio nacional debidamente registrada que sirve para

designar un producto originario de ellos y cuyas cualidades o características se deban exclusiva o esencialmente al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos”.

Los productores que inicien la propuesta de denominación de origen constituirán un Consejo de Promoción, el que tendrá por objeto redactar un proyecto de reglamento interno de la denominación y la realización de estudios e informes técnicos, entre los cuales se menciona los productos para los cuales se utilizará la Denominación de Origen y los factores y/o elementos que acrediten que el producto es originario de la zona indicada, y delimitarán el área geográfica. La denominación de origen es así una herramienta para el desarrollo sostenible de los territorios.

Por otra parte, la normativa ISO 8402 define la trazabilidad como la habilidad de trazar la historia, aplicación o localización de una entidad mediante la recopilación de datos. Entonces, puede ser considerada como una herramienta útil para asegurar a los consumidores el mantenimiento de la calidad de un producto, así como detectar responsabilidades a lo largo de toda la cadena agroalimentaria. Lo que hace posible trazar el producto es la información que debe acompañar al producto. La cadena apícola fue uno de los primeros sectores que tuvo una normativa de trazabilidad en Argentina debido a que la Unión Europea exigía saber el recorrido del producto hasta llegar a Europa. Es así que el productor se encuentra individualizado y las salas de extracción se encuentran inscriptas y habilitadas. Así, el Registro Nacional de Productores Apícolas, creado en 2001, es donde se inscriben los apicultores para llevar su registro de producción y otros datos. Y el SENASA es el organismo encargado de fiscalizar y auditar las salas de extracción, obligando a cumplir con las buenas prácticas apícolas y de manufactura.

Dentro de la normativa de trazabilidad registral, existen planillas de datos que deben ser llenadas en las salas de extracción, donde se detalla quién es el productor y en qué sala se

procesó la extracción. Los exportadores presentan la planilla en el SENASA. Al momento de que el exportador homogeneiza miel, se pierde parcialmente esa trazabilidad ya que se hace más difícil identificar el origen de la miel.

### Referencias

- [1] A. Bierzychudek, *Historia de la apicultura argentina*, Primera Ed., vol. 1. Buenos Aires, 1979.
- [2] E. Salizzi, "Economic restructuring and changes in the pampa's agriculture: the soybean expansion and its impact on Buenos Aires's beekeeping in the early twenty-first century," *Rev. Geogr.*, vol. 1, no. 16, pp. 13–46, 2014.
- [3] FAO, "Statistics of Food and Agricultural Organization," 2017.
- [4] D. de Agroalimentos, "Análisis FODA de las exportaciones de Miel," 2012.
- [5] P. de la N. Ministerio de Agroindustria, *Resolución 153-E/2017*. Argentina, 2017.
- [6] RENAPA, "Registro Nacional de Productores Apícolas." [Online]. Available: [www.renapa.magyp.gob.ar](http://www.renapa.magyp.gob.ar). [Accessed: 15-Aug-2018].
- [7] G. de la P. Formosa, "Producción y Ambiente," 2017. [Online]. Available: <https://www.formosa.gob.ar/produccion/desarrolloruralterritorial/programaapicola>.
- [8] Api-Cultura, "Portal Apícola." [Online]. Available: <http://api-cultura.com/actividad-apicola-en-chaco/>. [Accessed: 02-Feb-2018].
- [9] M. A. Haberle, Laura; Zarratea, "2° Boletín Semestral- Sector Apícola- Octubre 2013," Corrientes, 2013.
- [10] ANMAT, *Capítulo X: Alimentos Azucarados*. 2010, p. 767 al 818.
- [11] SENASA, *Resolución 186/2003*. 2003.
- [12] E. L. (INTA) Bedascarrasbure, "Documento Base del Programa Nacional Apícola," 2009.
- [13] P. de la N. Ministerio de Agroindustria, "Alimentos Argentinos." [Online]. Available: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar>.
- [14] SENASA, "Dulces mieles chaqueñas de alta calidad para el mundo," 2016. [Online]. Available: <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/infografias/dulces-mieles->

- chaquenas-de-alta-calidad-para-el-mundo. [Accessed: 16-Jan-2018].
- [15] P. INTA, "Miel, exportaciones argentinas por provincia," 2018.
- [16] Ministerio de Agroindustria, "Cadena apícola-Informe de Coyuntura mensual," 2017.
- [17] M. Nimo, "Strategies of honey differentiation," in *XXXI Jornadas Argentinas de Botánica - Melisopalinología*, 2007.
- [18] EcuRed, "Provincia de Chaco." [Online]. Available: [https://www.ecured.cu/Provincia\\_de\\_Chaco\\_\(Argentina\)](https://www.ecured.cu/Provincia_de_Chaco_(Argentina)). [Accessed: 04-Jun-2018].
- [19] F. Marini, *Chemometrics in Food Chemistry*, Elsevier. Amsterdam, 2013.

**ESPECTROMETRIA**

**ATOMICA**



## Capítulo II: Espectrometría atómica

Hay tres grandes tipos de métodos espectrométricos para identificar elementos inorgánicos en la materia y determinar sus concentraciones: la espectrometría óptica, la espectrometría de masas, y la espectrometría de rayos X [1]. En este capítulo se describirán los dos primeros tipos de métodos mencionados, ya que son los que se usarán en la parte experimental de la tesis. Las técnicas de espectroscopía atómica se basan en la descomposición de una muestra en átomos mediante el aporte de energía que puede ser otorgado por una llama, horno de grafito o un plasma [2]. La cantidad de cada elemento se determina por la radiación visible o ultravioleta que absorben o emiten los átomos en estado gaseoso. La sensibilidad analítica y el grado de interferencia dependen de cómo se hace la atomización: en una llama, en un horno calentado eléctricamente o en un plasma de radiofrecuencia.

### 1. Espectrometría de Absorción Atómica por llama y horno de grafito

Los componentes de un espectrómetro de absorción atómica por llama (FAAS) se encuentran esquematizados en la Figura 2.1. Se compone básicamente de:

- i. Una fuente de radiación que emita una línea específica correspondiente a la necesaria para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.
- ii. Un nebulizador que, por aspiración de la muestra líquida, forme pequeñas gotas para una atomización más eficiente.
- iii. Un quemador, en el cual por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión misma, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.
- iv. Un sistema óptico que separe la radiación de longitud de onda de interés, de todas las demás radiaciones que entran a dicho sistema.

- v. Un detector o transductor, que sea capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente.
- vi. Un amplificador o sistema electrónico, que como su nombre lo indica amplía la señal eléctrica producida, para que en el siguiente paso pueda ser procesada con circuitos y sistemas electrónicos comunes.
- vii. Por último, se requiere de un sistema de lectura en el cual la señal de intensidad de corriente sea convertida a una señal que el operario pueda interpretar.

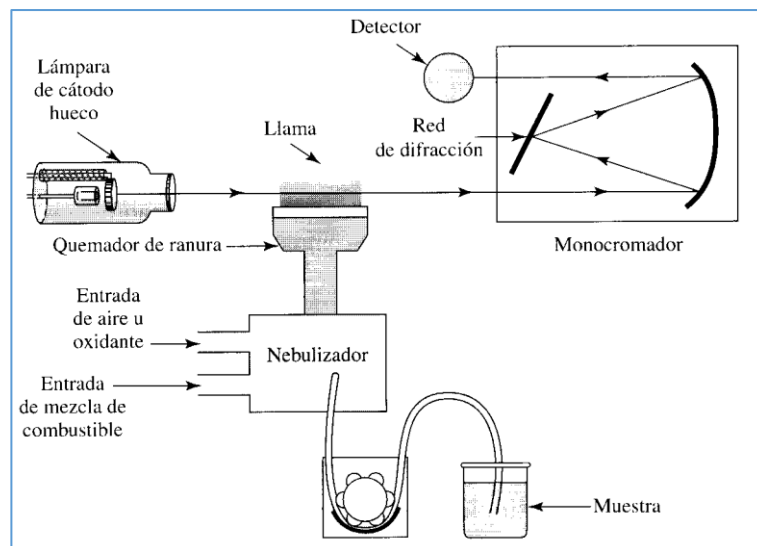


Figura 2.1. Componentes de un espectrómetro de absorción atómica por llama. [3]

En el caso de los espectros de absorción atómica por horno de grafito (GFAAS), la atomización se realiza utilizando un horno de grafito, en lugar del quemador; el horno de grafito no es más que un tubo de grafito calentado eléctricamente, que permite mayor sensibilidad que las llamas y requiere menor cantidad de muestra. Las muestras se inyectan en el horno manualmente o a través de muestreador automático (1 a 100  $\mu\text{L}$  de muestra). Se hace pasar la luz procedente de la lámpara de cátodo hueco a través de las ventanas que se encuentran en los extremos del tubo de grafito. Para evitar la oxidación del grafito, se



pasa gas Ar alrededor del horno, siendo la temperatura máxima recomendada de 2550 °C por no más de 7 segundos.

### 1.1. Lámpara de cátodo hueco

Dado que los monocromadores no son capaces de aislar líneas más estrechas de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  nm, en AAS se utilizan lámparas de cátodo hueco para medir lo que absorbe el analito atomizado. Las lámparas de cátodo hueco contienen vapor del mismo elemento que se desea medir, que emitirá la línea de frecuencia del analito de interés. Una lámpara de cátodo hueco como la que se muestra en la Figura 2.2., está llena de Ne o Ar a una presión entre 130-700 Pascal.

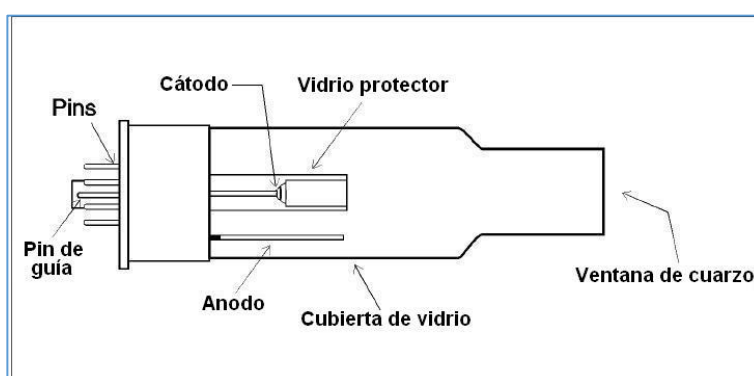


Figura 2.2. Esquema de lámpara de cátodo hueco monoelemental [4].

Cuando se aplica un alto voltaje entre el ánodo y el cátodo, el gas interior se ioniza y los iones positivos se aceleran hacia el cátodo hueco que está cubierto del elemento que se desea medir para dar una corriente de 2-30 mA. Los iones chocan contra el cátodo con suficiente energía para hacer pasar átomos metálicos del cátodo a la fase gaseosa. Los átomos libres se excitan por colisiones con electrones de alta energía, y luego emiten fotones volviendo al estado fundamental. Esta radiación atómica tiene la misma frecuencia que la absorbida por átomos de analito en la llama o en el horno. La anchura de la línea emitida es suficientemente estrecha, en relación con la del analito a alta temperatura, para que sea prácticamente "monocromática". La finalidad de un monocromador en espectroscopía atómica es seleccionar la línea de la lámpara de cátodo hueco y eliminar la

mayor parte de emisión posible procedente de la llama, horno o matriz de la muestra. Se requiere normalmente una lámpara diferente para cada elemento, aunque se fabrican algunas lámparas multielementales.

## 1.2. Llama

La mayor parte de los espectrómetros de llama utilizan un mechero de premezcla, como el que se muestra en la Figura 2.3., en donde el combustible, el oxidante y la muestra se mezclan antes de introducirlos en la llama.

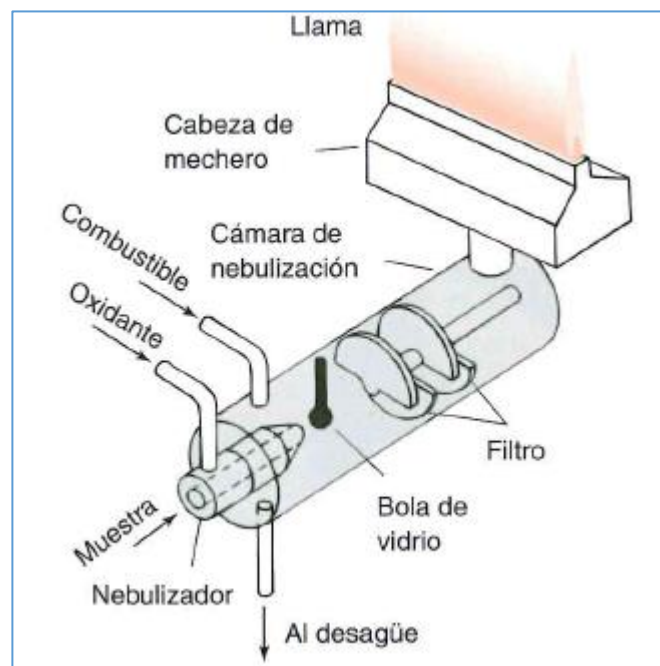


Figura 2.3. Mechero de premezcla

La disolución de la muestra se introduce con un nebulizador neumático haciendo pasar una fuerte corriente de oxidante (normalmente, aire) por el extremo de un capilar, por el que se aspira la muestra. El líquido se rompe en una fina niebla de pequeñas gotas a medida que sale del capilar. El nebulizado se proyecta a gran velocidad contra una esfera de vidrio, donde las gotas se rompen en partículas aún más pequeñas. La formación de estas pequeñas gotitas se llama nebulización. La finalidad del nebulizador es transformar la muestra líquida en un aerosol. La niebla formada, el oxidante y el combustible chocan con pantallas, que aumentan

el grado de mezcla y retienen las gotas más gruesas, que se eliminan por el drenaje. El aerosol que llega a la llama contiene sólo el 15% de la muestra inicial. La combinación más frecuente de combustible-oxidante es acetileno y aire, que produce una llama con una temperatura de 2400-2700 K. Cuando se necesita una llama más caliente para atomizar elementos de alto punto de ebullición (llamados elementos refractarios), se usa de ordinario, acetileno y óxido nitroso. En la llama, la combustión se completa en el cono exterior, donde llega aire arrastrado hacia la llama. Las gotas que llegan a la llama se evaporan; entonces el sólido que queda se vaporiza y se descompone en átomos. Para determinar un elemento en su forma óptima se precisa una llama determinada, rica o pobre en combustible, y de una altura determinada en la cual se observa la máxima emisión o absorción atómica, que a su vez depende de los caudales de muestra, combustible y oxidante.

### 1.3. Horno de grafito

Un horno de grafito es un tubo de grafito calentado eléctricamente, que permite mayor sensibilidad que las llamas, y requiere menos muestra.

A diferencia de la espectroscopía de llama, donde el tiempo de residencia del analito en el camino óptico es sólo de una fracción de un segundo, el horno de grafito confina la muestra atomizada en el camino óptico durante varios segundos, aumentando así la sensibilidad. La precisión alcanzable con un horno de inyección automática es de aproximadamente 1%.

El horno se programa para secar la muestra a una temperatura determinada durante unos segundos y así eliminar el disolvente. Después sigue una calcinación para destruir la materia orgánica (pirólisis). Después de calcinar la muestra, se la atomiza durante unos segundos, pasando los átomos a estado vapor. La absorbancia alcanza un máximo, y después disminuye a medida que se evaporan los átomos del horno. La señal analítica es la absorbancia integrada a lo largo del tiempo de atomización. Después de la atomización, el horno se

calienta a una temperatura mayor durante unos tres segundos, para eliminar cualquier residuo que pueda quedar. El horno se purga con Ar o N<sub>2</sub> durante cada uno de los pasos para eliminar el material volátil, excepto en el momento de atomización. El caudal gaseoso se suspende durante la atomización para evitar que el analito salga del horno.

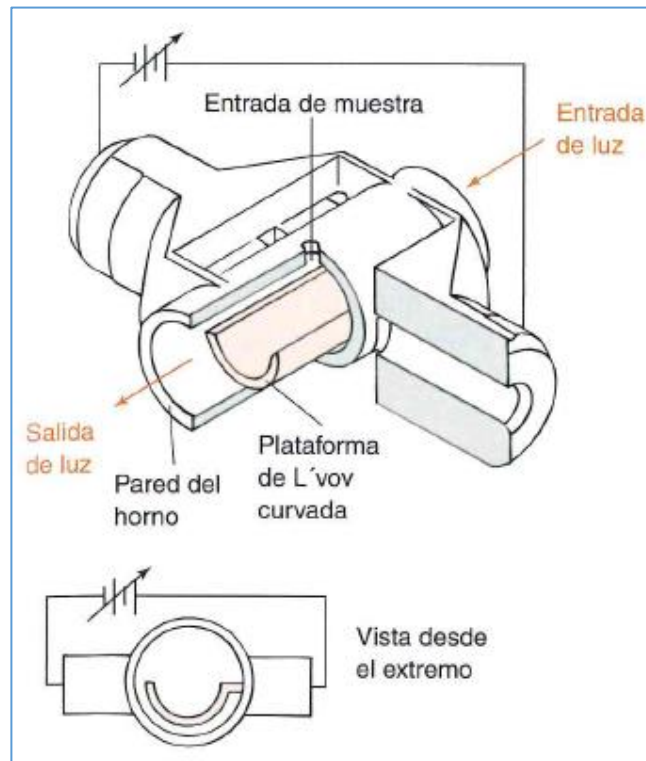


Figura 2.4. Esquema de un horno de grafito con plataforma.

### 1.3.1. Modificadores de matriz

Idealmente, la matriz que contiene el analito se descompone y vaporiza durante el paso de calcinación. Como no siempre es así, a veces se necesita de un modificador de matriz, que se añade a la muestra para reducir las pérdidas de analito durante la calcinación, haciendo más volátil la matriz o menos volátil el analito. Por ejemplo, el modificador de matriz nitrato amónico se puede añadir al agua de mar para reducir la interferencia de NaCl que posee en grandes concentraciones, el cual produce humo durante la calefacción. Al añadir NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> a la muestra se reducen mucho los picos de absorción de la matriz. El NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> reacciona con

NaCl para dar  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NaNO}_3$ , que son más volátiles que NaCl y que se evapora limpiamente sin formar humo.

#### 1.4. Plasma acoplado por inducción

El plasma acoplado por inducción alcanza una temperatura de 8000 K, muy superior al de las llamas ordinarias de combustión, que alcanzan una temperatura de 3000 K. La elevada temperatura, la estabilidad y el entorno químico inerte del Ar eliminan gran parte de las interferencias que se encuentran en las llamas. Sin embargo, entre las principales desventajas de esta técnica se encuentran su elevado costo de instalación y mantenimiento, además de requerir elevados volúmenes de gas Ar de calidad analítica.

#### 1.5. Corrección de fondo

La espectroscopía atómica debe incorporar una corrección de fondo, para distinguir la señal correspondiente al analito de la señal debido a absorción, emisión y dispersión óptica de la matriz, de la llama, del plasma o del horno de grafito. Si no sustrajéramos la absorbancia de fondo, se cometerían errores importantes. La corrección de fondo es, sobre todo, crítica en hornos de grafito, que tienden a llenarse de humo en la fase de calcinación.

En absorción atómica, la corrección se realiza mediante interrupción de haz o modulación eléctrica de la lámpara de cátodo hueco (produciendo e interrumpiendo los impulsos) para distinguir la señal de la llama de la línea atómica de interés a la misma longitud de onda. La señal que llega al detector cuando se bloquea el haz la origina la emisión de la llama. La señal que llega al detector cuando no se bloquea el haz se debe a la lámpara y a la llama. La diferencia entre estas dos señales es la señal analítica neta. La interrupción del haz corrige la emisión de la llama, pero no la dispersión. La mayoría de los espectrómetros poseen otros métodos para corregir la dispersión y la absorción de fondo. Los más utilizados son lámparas de deuterio, y el sistema de corrección Zeeman.

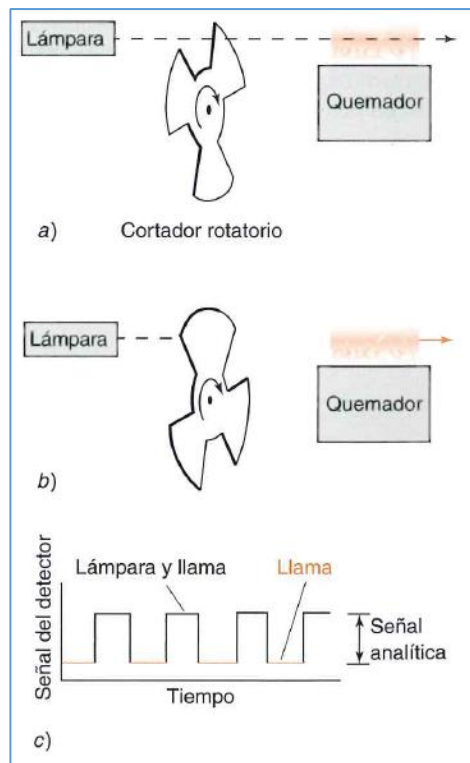


Figura 2.5. Un cortador de haz: a) La emisión de la lámpara y de la llama llegan al detector; b) sólo la emisión de la llama llega al detector; c) señal de onda cuadrada resultante.

La corrección de fondo mediante lámpara de deuterio consiste en pasar la emisión de banda ancha procedente de una lámpara  $D_2$  a través de la llama, alternando con la del cátodo hueco. El ancho de banda del monocromador es tan grande que la línea de absorción atómica del analito sólo absorbe una fracción despreciable de la radiación  $D_2$ . La luz procedente del cátodo hueco es absorbida por el analito, y absorbida y dispersada por el fondo. La luz procedente de la lámpara  $D_2$  sólo es absorbida y dispersada por el fondo, la diferencia entre la absorbancia medida con el cátodo hueco y con la lámpara  $D_2$  es la absorbancia debida al analito.

Una técnica excelente, pero cara, de corrección de fondo para muchos elementos se basa en el efecto Zeeman. Este efecto consiste en el corrimiento de niveles de energía que experimentan átomos y moléculas en un campo magnético. Cuando se aplica un campo paralelo al haz de luz que atraviesa una llama u horno, la línea de absorción (o emisión), de los átomos del analito se desdoblan en tres componentes. Dos se desplazan, uno a

longitudes de onda algo menores, y otro, a algo mayores, mientras que un tercer componente permanece inalterado. El componente que no varía su longitud de onda no tiene la polarización correcta electromagnética para absorber la luz que se propaga paralelamente al campo magnético, y por consiguiente es “invisible”. Para corregir el fondo mediante el efecto Zeeman, se aplica intermitentemente un impulso fuerte de campo magnético. Cuando se interrumpe el campo, se está midiendo la muestra y el fondo, y cuando se aplica el campo se mide sólo el fondo. La diferencia entre las dos señales es la señal corregida. La ventaja de las correcciones de fondo Zeeman es que opera a la misma longitud de onda que la analítica.

### 1.6. Interferencias

Una interferencia es cualquier efecto que cambia la señal aun cuando se mantiene invariable la concentración del analito. Las interferencias son frecuentes en espectroscopia atómica, y es fácil que pasen inadvertidas. Las interferencias se pueden corregir eliminando la causa de la interferencia, o preparando patrones que tengan la misma interferencia.

Uno de los tipos de interferencias en espectrometría atómica son las espectrales, que se presentan cuando la señal del analito se solapa con señales debidas a otros elementos o moléculas que están presentes en la muestra, o con señales debidas a la llama o al horno. Las interferencias debidas a la llama se pueden eliminar usando un corrector D<sub>2</sub>, o de Zeeman. Por otra parte, el mejor medio para tratar solapamiento de líneas de diferentes elementos contenidos en la muestra es seleccionar otra longitud de onda para hacer el análisis.

Otro tipo de interferencias son las interferencias químicas, provocadas por cualquier componente de la muestra que pueda disminuir el grado de atomización del analito. Por ejemplo, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dificultan la atomización del Ca<sup>2+</sup>, probablemente debido a la formación de sales no volátiles. Los agentes liberadores son sustancias químicas que se

añaden a una muestra para disminuir una interferencia química. El EDTA y la 8-hidoxiquinoleína protegen el  $\text{Ca}^{2+}$  de efectos interferentes del  $\text{SO}_4^{2-}$  y del  $\text{PO}_4^{3-}$ . El  $\text{La}^{3+}$  también se puede usar como agente liberador, porque reacciona referentemente con  $\text{PO}_4^{3-}$ , y libera el  $\text{Ca}^{2+}$ . Se recomienda una llama rica en combustible para reducir ciertas especies oxidadas de analito, que de lo contrario podrían impedir la atomización. Temperaturas altas de llama eliminan muchos tipos de interferencia química.

Otro tipo es la interferencia de ionización, que puede ser un problema en el análisis de metales alcalinos a las temperaturas relativamente bajas de la llama y en el análisis de otros elementos a temperaturas mayores. Como los metales alcalinos tienen los potenciales de ionización más bajos, son los que más se ionizan en una llama. A 2450 K y a una presión de 0,1 Pascal, el sodio se ioniza un 5%. En esas mismas condiciones, el potasio se ioniza un 33%. Como los átomos ionizados tienen niveles de energía diferentes de los átomos neutros, la señal buscada disminuye. Indudablemente, si la señal del ion es intensa, se puede usar ésta en vez de la señal atómica. Estas interferencias se resuelven empleando un supresor de ionización, que es un elemento que se añade a la muestra para disminuir el grado de ionización del analito. Por ejemplo, en el análisis del potasio se recomienda que las disoluciones contengan 1000 ppm de CsCl, porque el Cs se ioniza más fácilmente que el K, produciendo una gran concentración de iones en la llama que suprime la ionización del K.

### 1.7. Detectores

Un detector produce una señal eléctrica cuando incide en él un haz de fotones. Por ejemplo, un fototubo emite electrones desde una superficie fotosensible, cargada negativamente, cuando inciden sobre ella radiaciones de luz visible o UV. Los electrones atraviesan el vacío hasta un colector cargado positivamente, cuya corriente es proporcional a la intensidad de la radiación. La respuesta del detector depende de la longitud de onda de los fotones

---



incidentes. Además, la respuesta por debajo de 280 nm o por encima de 800 nm es prácticamente nula.

Un **tubo fotomultiplicador** es un dispositivo muy sensible, donde los electrones emitidos por una superficie fotosensible inciden sobre una segunda, llamada dínodo, que se encuentra a un potencial positivo respecto del emisor fotosensible. Los electrones son acelerados, e inciden contra el dínodo con mayor energía que la energía cinética que tenían al principio. Todo electrón energizado extrae más de un electrón al chocar con el primer dínodo. Estos nuevos electrones son acelerados hacia un segundo dínodo, que se encuentra a un potencial aún más positivo que el primer dínodo. Al incidir en el segundo dínodo, se extraen todavía más electrones, que se aceleran a su vez hacia un tercer dínodo. Este proceso se repite varias veces, de manera que, finalmente, se recogen más de  $10^6$  electrones por cada fotón que incidió en la primera superficie. Intensidades de luz extremadamente bajas se pueden transformar así en señales eléctricas medibles.

Los espectrofotómetros convencionales registran el espectro seleccionando y midiendo sucesivamente una longitud de onda a la vez. Sin embargo, hay instrumentos que registran todo el espectro de una sola vez y en una fracción de segundo. Esto es posible realizarlo con una **línea de fotodiodos**. Un arreglo de silicio de *tipo-p* en línea sobre un sustrato de silicio tipo-n crean una serie de diodos de unión *pn*. Al aplicar a los diodos una polarización negativa, se liberan electrones y se crean huecos en cada unión. Así pues, en todas las uniones se produce una región empobrecida, donde hay huecos y déficit de electrones. La unión actúa como un condensador, con cargas acumuladas a ambos lados de la región empobrecida. Al principio de un ciclo de medida, cada diodo está completamente cargado. Cuando incide una radiación sobre el semiconductor, se crean huecos y electrones, que migran a las regiones de carga opuesta, descargando parcialmente el condensador. Cuanto mayor radiación incide sobre cada diodo, menos carga queda al final de la medida. Cuanto

más tiempo se irradia la fila de fotodiodos entre dos lecturas, más se descarga el condensador. El estado de cada condensador se determina al final del ciclo, midiendo la corriente necesaria para recargarlo.

En un espectrómetro dispersivo, en un momento dado, al detector sólo llega una estrecha banda de longitudes de onda. En un espectrofotómetro de fila de diodos, se registran simultáneamente todas las longitudes de onda, consiguiéndose así una rápida adquisición del espectro, o una mayor relación señal/ruido, o una combinación de ambas. En un espectrofotómetro de fila de fotodiodo, a través de la muestra pasa luz blanca con todas las longitudes de onda. A continuación, la luz entra en un policromador, que dispersa la luz en las longitudes de onda que la componen, y dirige la luz a la fila de diodos. En cada diodo incide una banda diferente de longitudes de onda, y la resolución depende de la proximidad de los diodos y de la dispersión producida por el policromador.

## 2. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

### 2.1. Generalidades

En la década de 1940 aparecen los primeros espectrómetros de masas comercializadas por compañías de Europa y Estados Unidos, los mismos eran del tipo de Espectrómetro de masas de sector magnético. A principios de 1950, los patrones de fragmentación de los iones comenzaron a ser entendidos, aunque los aparatos disponibles estaban limitados en el rango de masas. En 1953 el analizador de masas cuadrupolo fue patentado por Wolfgang Paul de la Universidad de Bonn, el cual consiste en cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua (DC) sobre la que se superpone un potencial de radiofrecuencia (RF). El campo creado en los rodillos actúa a modo de filtro y determina qué iones alcanzarán el detector. Los iones, en esta región de campo variable, oscilarán dependiendo del campo de

---

radiofrecuencia aplicado, así como de su relación  $m/z$ , por lo que solo determinados iones alcanzarán el detector. De este modo, un espectro de masas se conseguirá barriendo (scanning) el campo RF dentro de un rango de frecuencias.

El analizador de cuadruplo es uno de los más extendidos hoy en día debido a su relativa sencillez que se une a una alta tolerancia a vacíos relativamente pobres, rango de masas de hasta 3000 Da que lo hace muy adecuado para ser acoplado a interfases de cualquier tipo, y lo que es más importante, su relativo bajo costo. Su principal desventaja es la imposibilidad de realizar análisis de alta resolución, masas exactas, así como su limitación en cuanto a rango de masas.

En la actualidad hay diferentes diseños de equipos de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) disponibles en el mercado. Pero todos tienen componentes similares, lo que varía significativamente entre ellos es el diseño e implementación de dichos componentes.

En forma general, la muestra, que usualmente debe ser líquida, es bombeada con una bomba peristáltica a 1 mL/min dentro de un nebulizador donde es convertido en un fino aerosol con gas argón a 1 mL/min. Las finas gotas de aerosol, que representan el 1-2% de la muestra, son separadas de las grandes gotas a través de una cámara de pulverización. Luego el fino aerosol es transportado dentro de la antorcha de plasma a través de un inyector de muestra.

El plasma es formado por la interacción de un campo magnético intenso (producido por radiofrecuencia RF pasando a través de un cono de cobre) en un flujo tangencial de gas (normalmente argón) a un flujo de 15 mL/min a través de un tubo de cuarzo concéntrico (antorcha). Esto tiene el efecto de ionizar el gas, el cual, cuando se encuentra con una fuente de electrones de una chispa de alto voltaje, forma un plasma de descarga de muy alta temperatura (10000 K) a la salida abierta del tubo.

La antorcha de plasma, que está posicionada horizontalmente, es usada para generar iones cargados positivamente. Una vez que los iones son producidos en el plasma, son direccionados al espectrómetro de masas a través de una región de interfase, la cual es mantenida a un vacío de 1-2 torr a través de una bomba rotatoria. Esta interfase consiste en dos o tres conos metálicos llamados muestreador y separador, cada uno con un pequeño orificio que permite pasar al "ion optics", donde son guiados dentro del dispositivo separador de masas.

La región de interfase es la más crítica de un espectrofotómetro ICP-MS debido a que los iones deben ser transportados eficientemente y con una integridad eléctrica desde el plasma, que está a presión atmosférica (760 torr), a la región del analizador espectrómetro de masa, que está a aproximadamente  $10^{-6}$  torr. El acoplamiento capacitivo que existe entre el cono de RF y el plasma, produciendo una diferencia de potencial de unos pocos cientos de volts, que si no es eliminado, ocurrirá una descarga entre el plasma y el cono muestreador, llamado descarga secundaria o "pinch effect". Este efecto puede incrementar la formación de especies interferentes y afectar dramáticamente la energía cinética de los iones entrando al espectrómetro de masas, haciendo la optimización de los iones ópticos muy errática e impredecible. Por esta razón, es absolutamente crítico que la descarga secundaria sea eliminada por conexión a tierra del cono RF.

Una vez que los iones han sido exitosamente extraídos de la zona de interfase, ellos son direccionados dentro de la cámara de vacío principal por una serie de lentes electrostáticas (lentes iónicas), mientras se detienen fotones, partículas y especies neutras. El vacío en esta región es mantenido por una bomba turbomolecular a aproximadamente  $10^{-3}$  torr.

El haz de iones contiene todo el analito y matriz de iones existentes en el ion optics y que ahora pasan dentro del corazón del espectrómetro de masas (dispositivo de separación de masas), el cual es mantenido a un vacío de  $10^{-6}$  torr con una segunda bomba turbomolecular.

---

Todos los dispositivos persiguen el mismo objetivo, que es permitir a los iones del analito de una determinada relación masa/carga llegar al detector y filtrar todos los no analitos, interferencias e iones de la matriz. Dependiendo del diseño del espectro de masas, puede ser un proceso de escaneo donde los iones arriban secuencialmente al detector, o un proceso simultáneo donde los iones son detectados al mismo tiempo.

## 2.2. Componentes del equipo ICP-MS

Un ICP-MS se compone básicamente de: 1) Introducción de la muestra: nebulizador y spray chambers; 2) Fuente de ionización: antorcha; 3) Interfase de extracción: cono sampler y cono skimmer; 4) Celda de colisión/reacción: Octapolo; 5) Lentes iónicas; 6) Espectrómetro de masas: Cuadrupolo; y 7) Detector: Multiplicador de electrones. Un esquema del equipo mostrando sus componentes de forma más detallada se presenta en la siguiente Figura 2.6.

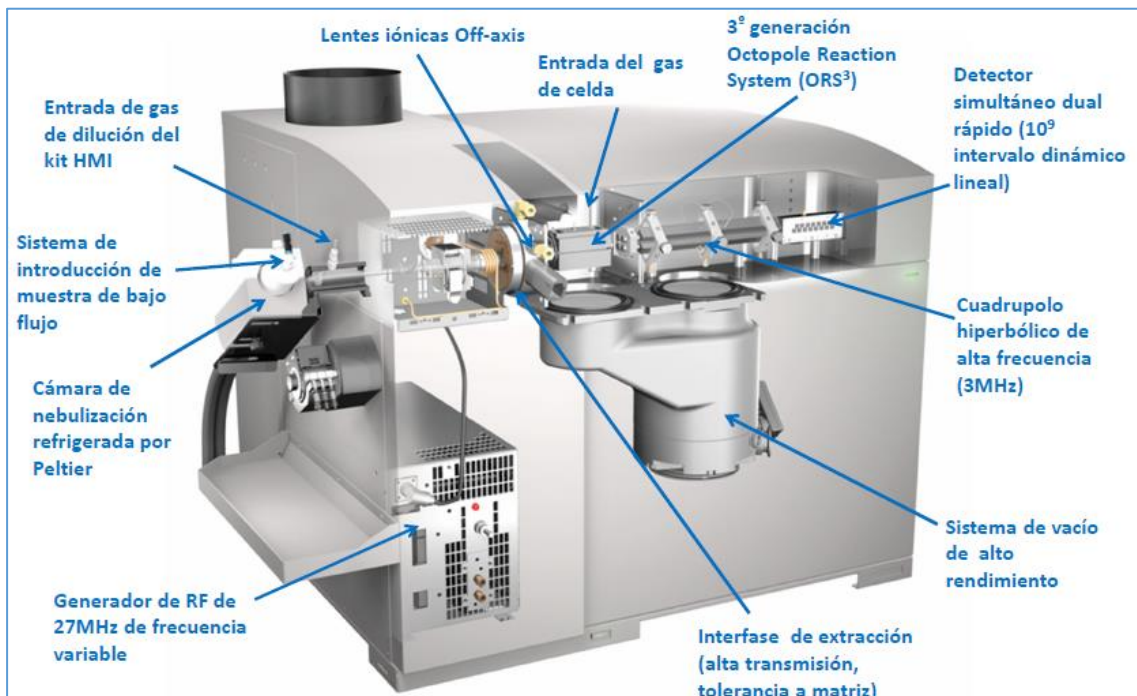


Figura 2.6. Esquema de los componentes de un ICP-MS [5].

## 2.3. Introducción de la muestra

### 2.3.1. *Nebulizador*

La introducción de la muestra en el ICP es un proceso crítico en esta técnica. La gran mayoría de los análisis de ICP-MS se realizan sobre muestras líquidas, siendo necesaria una corriente de gas para que la muestra alcance el plasma. Aunque ICP-MS se ha aplicado a la determinación de más de 60 elementos a diferentes matrices [6]. La forma más fácil de que una muestra líquida sea introducida en la corriente de gas es en forma de aerosol originado en un nebulizador.

Existen diversos tipos de nebulizadores: de flujo cruzado, concéntrico o Meinhard, ultrasónico, microconcéntrico, Babington. Cada uno de ellos posee sus ventajas e inconvenientes. Pero actualmente se tienen dispositivos modernos que convergen ventajas de varios de los anteriores. Así, el equipo ICP-MS Perkin-Elmer SCIEX, ELAN DRC-e utilizado en esta tesis emplea un equipo de nebulización resistente a ácido fluorhídrico, compuesto por perfluoracetato (modelo PFA-ST), acoplado a una cámara cuarzo de nebulización ciclónica, con un deflector interno y una línea de drenaje, refrigerado.

### 2.3.2. *Cámara de Spray (Spray chambers)*

Después del nebulizador existe una cámara de spray, cuya función es la de separar y desechar las gotas grandes de la solución que se hayan formado en el proceso de pulverización. La eficiencia del transporte del aerosol se define por el porcentaje de masa de solución nebulizada que llega al plasma. Para que este porcentaje sea alto es necesario que el nebulizador produzca gotas inferiores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Debido a que la mayoría de los nebulizadores producen aerosoles con gotas de diámetros superiores a 100  $\mu\text{m}$ , el primer objetivo de la cámara de spray es separar las gotas grandes (superiores a 10  $\mu\text{m}$ ) del gas y desecharlas. Cuando el flujo de gas con el aerosol entra en la cámara de spray, sufre cambios profundos en su dirección de modo que las gotas grandes se estrellan sobre las

---

paredes. Estas gotas que chocan con las paredes se desechan mediante drenaje. La cámara de spray asegura que solamente las gotas pequeñas permanezcan en suspensión en el flujo de gas que llega al plasma. Con esto se pierde un 99% de muestra en solución.

Diversos diseños han sido propuestos y evaluados. El formato más habitual es el que emplea vidrio, polietileno, PTFE o Ryton. El desalojo de la solución se hace mediante el bombeo que realiza una bomba peristáltica, la misma que lleva la muestra al nebulizador. Ciertos elementos son problemáticos (sobre todo los volátiles) tales como Br y Hg ya que son retenidos en el vidrio, sobre todo en la punta del inyector de la antorcha, por largo tiempo incluso cuando se introduce en bajos niveles. Sin embargo, la mayoría de los elementos no presentan tales problemas y típicamente se limpian entre 60 a 180 segundos. Durante la ejecución de un análisis es deseable que se monitorice la limpieza eligiendo un elemento concreto y determinando el tiempo donde se produce un decaimiento de la señal hasta valores de fondo aceptables. Esto es importante si un muestreador automático es utilizado y el tiempo se puede programar.

#### 2.4. Fuente de ionización: Antorcha

La antorcha como sistema de confinamiento del plasma es otra de las partes fundamentales del equipo de ICP-MS. Se construyen con un alto grado de exactitud usando cuarzo de gran calidad, siendo una parte principal para la estabilidad y formación del plasma. Las antorchas pueden ser desmontables o no. Los tubos de cuarzo aguantan varios cientos de grados, así como el ataque químico y altos niveles de radiación electromagnética a longitudes de onda que se extienden en la región del ultravioleta. Estas condiciones causan cambios físicos y químicos en el cuarzo, por lo que con el tiempo se degrada, siendo necesaria su sustitución y ya no solamente su limpieza. Por ello quizás es más recomendable utilizar antorchas desmontables. La distancia entre la antorcha y el cono de muestreo está entre 10 y 15 mm. Generalmente la antorcha se monta horizontalmente con el centro del inyector alineado

sobre el eje. Los últimos 25 mm de la antorcha donde pasa el argón de enfriamiento deben estar dentro de la bobina de RF, de forma tal que la distancia entre la espiral y el cono debe ser de unos 3 a 5 mm.

La Figura 2.7 muestra un esquema detallado de la antorcha con un plasma generado en contacto con la interfase de vacío, así como la disposición de la bobina de RF.

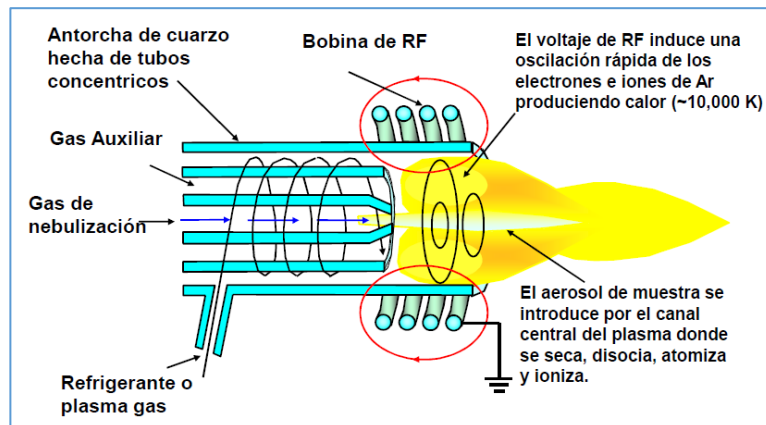


Figura 2.7. Esquema de la antorcha, bobina y plasma generado.

En el esquema se aprecia cómo se genera el plasma: (a) Un flujo tangencial de Ar pasa por la camisa externa de la antorcha. (b) Se aplica potencia de radio frecuencia a la bobina de RF, produciendo un intenso campo electromagnético en su zona de influencia. (c) Una chispa de alto voltaje aplicada sobre el argón produce electrones libres. (d) Los electrones libres son acelerados por el campo de radio frecuencia produciendo colisiones e ionizando el Ar. (e) el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) se ha generado y se confina al final del lado abierto de la antorcha.

## 2.5. Interfase de extracción

La función de la interfase es extraer el gas del plasma que es representativo de la muestra original. La interfase está compuesta por dos conos, el cono sampler y el cono skimmer, que inyectan el flujo del plasma en la zona de vacío por medio de un vacío diferencial: de una



presión atmosférica (760 Torr) donde se encuentra el plasma, hasta unos 2 Torr que existe en la zona entre conos. Este vacío es generado por medio de una bomba rotatoria.

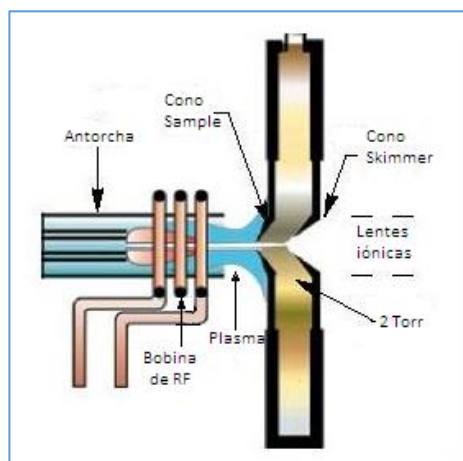


Figura 2.8. Ubicación de los conos, en la interfase de extracción

En el mercado hay diversas formas y estilos de conos, aunque el diseño básico no ha cambiado desde los modelos originales. Se utilizan diversos materiales tales como Al, Cu, Ni y Pt, aunque el Ni es el mejor en la relación calidad/precio. El material sobre el que se construye debe tener una buena conductividad tanto térmica como eléctrica. Si se introducen materiales orgánicos, se debe utilizar conos de Pt ya que es menos susceptible a la degradación que el Ni. En el caso de que se inyecte agua regia no se deben utilizar los conos de Pt ya que esta es la única mezcla ácida que ataca al Pt.

Los conos de muestreo de Ni tienen una vida útil de varios meses, y necesitan una limpieza periódica con ultrasonidos sobre todo si la muestra tiene muchas sales o está muy acidificada. A veces es necesario utilizar un papel con abrasivo de tamaño de grano muy fino. La vida media de este cono se reduce drásticamente cuando se utiliza ácido sulfúrico o soluciones muy ácidas. Si son de Pt pueden llegar a 8000 horas de uso. Este cono se puede bloquear cuando se introducen muestras con partículas sólidas suspendidas.

El cono skimmer es más pequeño y menos robusto que el cono sampler, sobre todo en la punta, la cual es mucho más aguda y regular. Su limpieza es la misma que la del cono

sampler. Los conos skimmer se colocan generalmente entre 6 a 7 mm de distancia del cono de sampler y también se fabrica con Ni o Pt. La punta de este cono tiene repercusión directa sobre la sensibilidad del equipo y sobre el nivel de iones poliatómicos. Generalmente no tiene por qué bloquearse en comparación con el cono sampler.

## 2.6. Celda de colisión/reacción: Octapolo

La celda de reacción, también denominada celda de colisión, fue implementada originalmente en aplicaciones de análisis de espectrometría de masas a nivel orgánico para generar especies hijas para confirmar identificación de la estructura de una molécula parental. Actualmente es empleada en los equipos de ICP-MS para detener la aparición de interferencias espectrales ocasionadas por el argón, principalmente:  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  en la determinación de  $^{56}\text{Fe}$ ;  $^{38}\text{ArH}$  en la determinación de  $^{39}\text{K}$ ;  $^{40}\text{Ar}$  en la determinación de  $^{40}\text{Ca}$ ;  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$  en la determinación de  $^{80}\text{Se}$ ;  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  en la determinación de  $^{75}\text{As}$ ;  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$  en la determinación de  $^{52}\text{Cr}$ ; o  $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$  en la determinación de  $^{51}\text{V}$ .

La celda se localiza antes del cuadrupolo analizador. Los iones salen de la zona de interfase y entran a la celda, un gas de colisión/reacción como el hidrógeno o el helio es inyectado en la celda, la cual consiste de un sistema multipolo (cuadrupolo, hexapolo u octapolo), usualmente operado en el rango de las radiofrecuencias. Este campo de radiofrecuencias (RF) enfoca el haz de iones para que colisionen y reaccionen con el gas inyectado. Estas reacciones ocasionan que las especies interferentes se conviertan en especies no interferentes, o que el analito se convierta en otro ion sin interferencias. Tras esto los iones pasan al cuadrupolo analizador para la separación de masas.

---

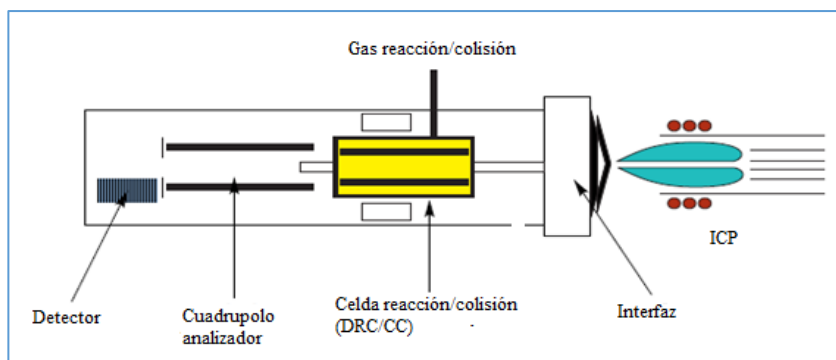


Figura 2.9. Esquema de la configuración ICP-MS-DRC/CC

## 2.7. Lentes Iónicas

Las lentes iónicas son placas electrostáticas (platos, barriles o cilindros metálicos) situadas en la zona intermedia, donde se aplica un voltaje al haz de iones que proviene del skimmer, de forma tal que los iones positivos del plasma sean atraídos y puedan ser manipulados en la trayectoria requerida. Además de dirigir y enfocar los iones, el sistema de lentes iónicas es responsable de separar los iones de las especies neutras y de los fotones debido a los campos electrostáticos creados. Estas últimas partículas se evitan porque pueden causar inestabilidad de la señal e incrementar el ruido de fondo.

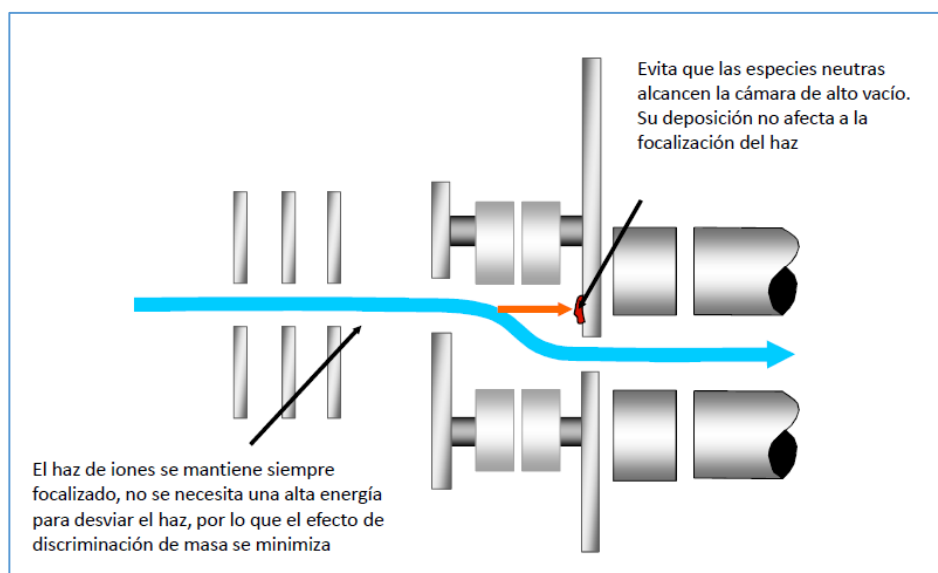


Figura 2.10. Esquema de lentes iónicas y la incidencia de un haz de iones

## 2.8. Espectrómetro de masas: Cuadrupolo

El espectrómetro separa los iones monocargados de cada isótopo de acuerdo a su masa. El más común de los espectrómetros es el cuadrupolo, el cual consiste en cuatro cilindros idénticos de metal, montados de forma paralela y equidistante entre ellos, alrededor de una circunferencia, y sometidos a una combinación de corrientes continuas (DC) y radiofrecuencias RF. Las barras opuestas están unidas. El voltaje DC es positivo para una parte del par y es negativo para el otro. El voltaje RF de cada par tiene la misma amplitud, pero signo opuesto. A cada pareja de polos se le aplica un potencial constante, mediante corriente continua (DC) y simultáneamente un potencial oscilante mediante corriente alterna (AC). De esta forma se consigue crear una distribución de campo en el espacio interior a los 4 polos. Así, los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. De esta manera los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación  $m/z$ . En definitiva, la separación de los iones de diferente relación  $m/z$  se produce por la vibración estable de los iones en un campo eléctrico de alta frecuencia generado entre los polos del cuadrupolo. De forma específica, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación  $m/z$  concreta que es dirigida hacia el detector, descartando aquellas relaciones  $m/z$  mayores o menores a la seleccionada. El cuadrupolo actúa como un filtro de masas, de forma que, de todos los iones provenientes de la fuente, solo los seleccionados se van transfiriendo al detector, perdiéndose el resto por el camino. Una partícula  $i$  sometida a la acción del campo cuadrupolar, describe una trayectoria definida. Estas trayectorias definen los iones que van a ser capaces de atravesar el cuadrupolo y llegar al sistema de detección. De esta forma, variando los potenciales U y V aplicados a los polos, podemos “sintonizar” una determinada masa y medir la señal de ésta en el detector.

---

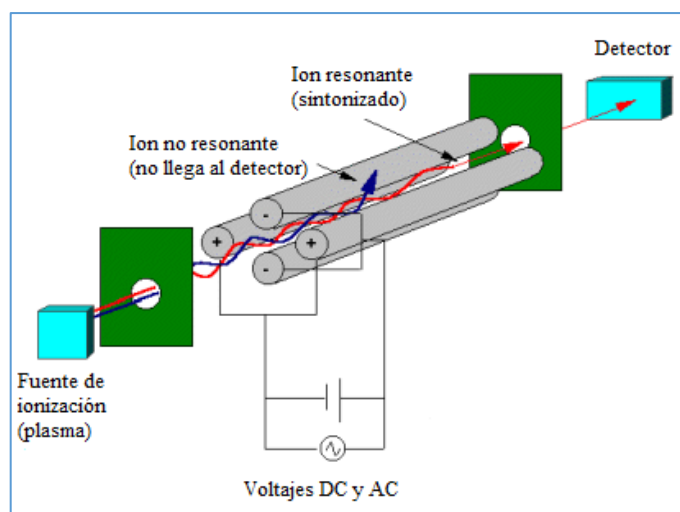


Figura 2.11. Esquema de funcionamiento del analizador cuadrupolar

Así, cuando un voltaje particular de DC/RF es aplicado a las varillas, el potencial atraerá el ion analito de interés a través del cuadrupolo hasta la salida del mismo, donde emergerá y generará una señal eléctrica en el detector. Los iones con relaciones masa/carga diferentes al ion analito serán eyectados a través de los espacios del cuadrupolo.

### 2.9. Detector: Multiplicador de electrones

Los dos tipos de detectores más empleados en los equipos de ICP-MS son los sistemas multiplicadores de electrones, para un bajo número de cuentas, y los colectores de Faraday, para un alto número de cuentas. Los multiplicadores de electrones funcionan generando una cascada de electrones secundarios a partir del impacto de un ion en el detector. Cuando una partícula cargada choca contra una superficie puede provocar que se desprendan electrones asociados con la capa externa de la superficie. La cantidad de electrones secundarios emitidos depende de las características de la partícula primaria, su ángulo de choque, su energía y las características de la superficie de impacto [7]. La Figura 2.12 muestra la ganancia electrónica en cada dínodo sucesivo. Este proceso de cascada de electrones resulta en ganancias de señal de hasta  $10^8$ , que se consiguen con aproximadamente 21 dínodos.

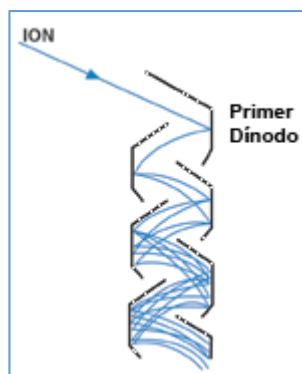


Figura 2.12. Óptica iónica de un multiplicador de electrones tipo dínodo discreto

Se genera entonces una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de impactos de iones del analito al dínodo, la cual es medida y relacionada con la concentración de analito.

Actualmente la mayoría de los equipos de ICP-MS empleados para análisis de elementos ultratrazas emplean sistemas de película activa o dínodos discretos de multiplicadores de electrones. Para algunas aplicaciones donde los límites de detección de ultratrazas no son requeridos, el haz de iones del analizador de masas es dirigido hacia un electrodo metálico simple, o copa de Faraday.

## Referencias

- [1] D. Skoog, J. Holler, and T. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, Quinta Edi. Madrid, España, 2001.
- [2] D. C. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo*, Sexta. Barcelona, España, 2013.
- [3] K. A. Rubinson and J. F. Rubinson, *Análisis Instrumental*. Madrid, España, 2001.
- [4] "Absorción atómica." [Online]. Available: <http://absorcion-atmica.blogspot.com.ar>. [Accessed: 05-Apr-2018].
- [5] J. Á. Rodríguez Castrillón, "Principios básicos de la técnica ICP-MS," *Agilent Technologies*, 2012.
- [6] EPA, *Method 6020*. 2014.
- [7] S. L. Cromlab, "Multiplicadores de electrones." [Online]. Available: [http://www.cromlab.es/ACC\\_INS\\_ETP.htm](http://www.cromlab.es/ACC_INS_ETP.htm). [Accessed: 02-Jul-2018].

# OBJETIVOS





## Objetivos Generales

Estudiar la posible presencia de marcadores químicos de trazabilidad en mieles producidas en la región nordeste Argentina (Chaco, Corrientes y Misiones), mediante el uso de las denominadas técnicas de huella dactilar, con especial énfasis en la determinación de la composición multielemental de este alimento.

Utilizar métodos quimiométricos de análisis de datos de avanzada en función de extraer la información química provechosa para la propuesta de modelos predictivos (matemáticos) que permitan resolver problemas de autenticación o confirmación de identidad de mieles provenientes de la región en estudio, y de esta manera contribuir al desarrollo y establecimiento de sistemas de control de la trazabilidad química de este alimento.

## Objetivos Particulares

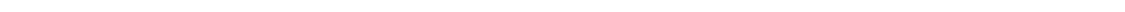
- ✚ Determinar la composición multielemental de las mieles producidas en las provincias de la región nordeste de Argentina utilizando las técnicas de AAS e ICP-MS.
- ✚ Contribuir al conocimiento de la composición química inorgánica de este producto alimenticio, con especial énfasis en los elementos de interés ambiental y/o nutricional.
- ✚ Explorar la presencia de posibles marcadores químicos de identidad en las mieles analizadas para establecer la trazabilidad química de las muestras procedentes de distintas regiones productoras del nordeste argentino.
- ✚ Proponer modelos matemáticos que permitan certificar autenticidad y denominación de origen de futuras muestras.
- ✚ Contribuir al desarrollo y establecimiento de sistemas de control de la trazabilidad de agroalimentos como la miel.

## Hipótesis

Las técnicas analíticas de espectroscopía atómica multielemental, aisladas o fusionadas con la caracterización fisicoquímica, combinadas con técnicas de análisis multivariado permite generar modelos tendientes a establecer la trazabilidad y denominación de origen de agroalimentos.

---

# MATERIALES Y MÉTODOS



## Capítulo III: Materiales y métodos

### 1. Muestras de miel

En esta tesis se presentan, por un lado, los análisis fisicoquímicos realizados en 141 muestras provenientes de diferentes cuencas apícolas de la provincia de Corrientes recolectadas en las campañas 2011-2012, y por otro lado las determinaciones multielementales y fisicoquímicas realizadas en 50 muestras provenientes de las cuatro provincias (Formosa, Chaco, Corrientes y Misiones) de la región nordeste argentina (NEA) recolectadas en las campañas 2015-2016. Todas las muestras fueron obtenidas directamente de 10 salas de extracción habilitadas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) ubicadas en las diferentes provincias. La toma de muestras se realizó de tambores metálicos habilitados para uso alimentario de 300 kg de capacidad cada uno, correspondiendo en promedio a la cantidad de miel obtenida a partir de 10 colmenas. La procedencia de todas las colmenas fue registradas al momento de entrega de las alzas melarias a la sala de extracción, y la miel se obtuvo siguiendo el protocolo [1], por centrifugación a temperatura ambiente. Con la información brindada por las salas de extracción, que lleva el registro siguiendo el protocolo de trazabilidad [2], siempre se aseguró de adquirir muestras compuestas de miel, que consistieron de una mezcla homogénea de miel de la cosecha de al menos 30 colmenas de una misma cuenca apícola. La estrategia de muestreo se realizó con el objeto de cubrir de manera equitativa la mayor diversidad de ambientes correspondiente a la zona geográfica bajo estudio. Las muestras recolectadas fueron conservadas en frascos de polipropileno a temperatura de 8 °C al abrigo de la luz por un plazo no superior a 30 días en el caso de los análisis fisicoquímicos y plazos inferiores a 90 días para los análisis multielementales.

### 1.1. Provincia de Formosa

Si bien todo el territorio de la provincia de Formosa corresponde al dominio fitogeográfico Chaqueño, se pueden diferenciar dos zonas productoras con características diferentes. En este trabajo las muestras se recolectaron de: I) *Zona Oeste* (Ramón Lista y Bermejo), corresponde a una región con clima semiárido con estación seca, caracterizado fundamentalmente por la explotación, a lo largo de la historia, del quebracho colorado chaqueño, II) *Zona Este* (Patiño, Pirané y Formosa), que corresponde a una región más húmeda, con mayor registro de lluvias, caracterizado por disponer de un bosque dominado por especies xerófilas caducifolias o semi-caducifolias, adaptadas a las importantes fluctuaciones de disponibilidad hídrica. Se obtuvieron un total de 10 (diez) muestras compuestas representativas de cada punto geográfico de recolección.

### 1.2. Provincia de Chaco

Corresponde al dominio fitogeográfico Chaqueño que es el de mayor extensión en el territorio nacional, y se presenta con diversas fisonomías tales como la sabana, el bosque xerófilo, matorrales, u otros. El clima es subtropical con inviernos suaves y secos, veranos cálidos y lluvias estivales. Se obtuvieron 11 (once) muestras compuestas de miel que correspondieron a apiarios ubicados en distintas zonas productoras de la provincia de Chaco: Veinticinco de Mayo, General Güemes, Mayor Luis J. Fontana, Libertador General San Martín y San Fernando.

### 1.3. Provincia de Corrientes

La provincia de Corrientes se divide en 6 (seis) cuencas apícolas, debido a estrategias comerciales y de gestión implementadas por parte del Ministerio de producción provincial. En este trabajo se obtuvieron 141 muestras en las campañas 2011-2012 y 16 (dieciséis) muestras compuestas en las campañas 2015-2016, de las cuatro cuencas productoras más

---

importantes: Capital (CT), Bella Vista (BV), Goya (GY), y Monte Caseros (MC), ver en la Figura 3.1.

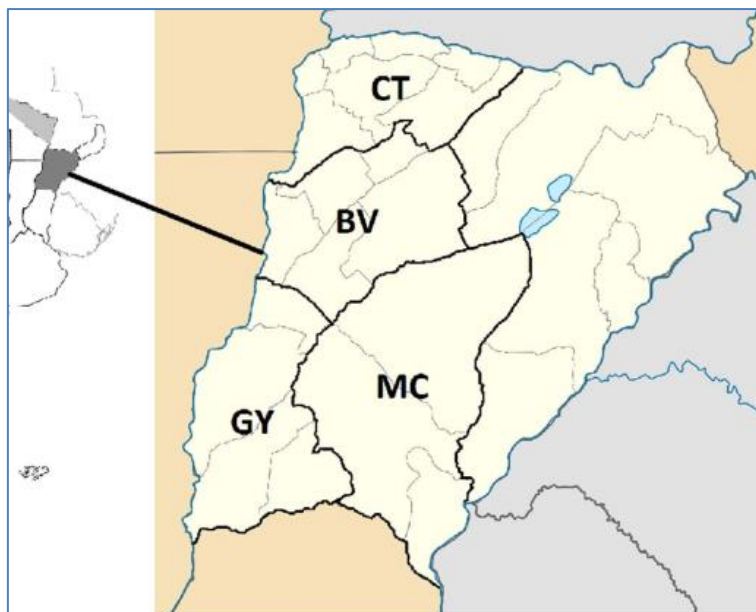


Figura 3.1. Cuencas estudiadas en la provincia de Corrientes

#### 1.4. Provincia de Misiones

Se obtuvieron 13 (trece) muestras de la provincia de Misiones en las campañas 2015-2016 que correspondían a distintos apicultores de la provincia que poseen sus apiarios en cinco puntos productores del territorio provincial: El Dorado, Montecarlo, Oberá, Apóstoles y Posadas. Las muestras correspondieron a mieles multiflorales de diferentes orígenes florales de la provincia.

## 2. Determinaciones fisicoquímicas

Todas las muestras recolectadas fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico incluyendo las determinaciones de Humedad, Color, pH, Conductividad eléctrica e Hidroximetilfurfural (HMF).

## 2.1. Humedad

La determinación de humedad se realizó por medición indirecta [1, 2], empleando un refractómetro tipo Abbe, como el que se muestra en la Figura 3.2. Las muestras de miel líquida transparente se midieron directamente, para lo cual se abrió el recipiente conteniendo la muestra, se mezcló el contenido con una varilla de vidrio limpia y seca, y se colocó una gota de miel entre los prismas limpios y secos del refractómetro. Se realizó la lectura del índice de refracción a 20 °C de acuerdo con las instrucciones del aparato. Las muestras de miel total o parcialmente cristalizadas, previamente a la medición con el refractómetro fueron llevadas a baño de agua a 60 °C. Para ello, se colocaron cantidades de miel llenando un pesasustancias hermético y se calentó en un baño de agua a la temperatura especificada hasta que se produjo la disolución de los cristales. Luego de la disolución se invirtió suavemente el pesasustancias tres o cuatro veces de forma de homogeneizar y que la miel enjuague las superficies libres de las paredes y recoja el agua de condensación que se haya depositado allí, y se dejó enfriar a temperatura ambiente en el recipiente tapado, midiendo entonces el índice de refracción.



Figura 3.2. Refractómetro de mesa tipo Abbe utilizado para medir humedad.



Cuando la determinación del índice de refracción fue a una temperatura distinta de 20 °C, se convirtió a esa temperatura, aplicando la siguiente fórmula:

$$I_{20} = I - 0,00023 \cdot \Delta T$$

Donde: I = índice de refracción medido a una T

$I_{20}$  = índice de refracción a 20 °C

$\Delta T = 20 - T$

Con ese valor corregido se leyó en la tabla de Wedmore, determinándose el contenido de humedad en gramos/100 g.

## 2.2. Color

Las muestras líquidas o cristalizadas sin impurezas se homogeneizaron mediante agitación durante 3 minutos, evitando la incorporación de aire. Las muestras de miel líquida o cristalizada con impurezas luego de la homogenización se las pasó por un tamiz IRAM 500  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente se realizó la determinación del color en un colorímetro marca HANNA (Figura 3.3). Para ello se calibró el colorímetro fijando en 0 (cero) mm Pfund, colocando una cubeta con glicerol de grado analítico. Luego se colocó la cubeta con la muestra a medir, y se leyó en el display digital la intensidad del color de la miel en mm Pfund.



Figura 3.3. Colorímetro HANNA utilizado para medir color en miel

A continuación, en la Tabla 3.1, se muestra la escala internacional que se emplea para nombrar el color medido.

Tabla 3.1. Escala internacional de color  
ESCALA INTERNACIONAL EN mm PFUND

Blanco agua	0-8
Extra blanco	9-17
Blanco	18-34
Ámbar extra claro	35-48
Ámbar claro	49-83
Ámbar	84-114
Ámbar oscuro	Mas de 114

### 2.3. pH

El pH fue determinado siguiendo normas IRAM [5]. Las muestras de miel se homogeneizaron, y las que tenían impurezas se tamizaron en tamiz IRAM 500  $\mu\text{m}$ . Luego se pesaron 10 g de miel en un vaso de precipitados de 250 mL limpio y seco y se disolvieron con porciones de agua. Se trasvasaron cuantitativamente a matraz de 100 mL, completando el volumen con agua destilada.

Para las determinaciones se utilizó un peachímetro HANNA HI 98129. Previo a las mediciones, se calibró el peachímetro utilizando soluciones reguladoras comerciales, una de pH 7 y otra de pH 4. Entonces, se trasvasó una alícuota de la solución preparada de la muestra a un vaso de precipitados, donde se sumergió el electrodo y se leyó el pH una vez estabilizado el valor.

### 2.4. Conductividad

Se procedió según norma IRAM [5], para lo cual las muestras de miel se homogenizaron, y las que tenían impurezas se tamizaron en tamiz IRAM 500  $\mu\text{m}$ . Luego se pesaron 20 g de miel en un vaso de precipitados de 250 mL limpio y seco y se disolvieron con porciones de agua. Se trasvasaron cuantitativamente a matraz de 100 mL, completando el volumen con agua destilada.

Para las mediciones se utilizó un conductímetro ORION 3 STAR. Se calibró el conductímetro antes de su empleo, con la ayuda de solución comercial de KCl 0,01 M (conductividad 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Luego de enjuagar cuidadosamente los electrodos con solución de la muestra correspondiente, se determinó la conductividad introduciendo el electrodo en un vaso de precipitados conteniendo la solución preparada de la muestra, leyendo el valor de conductividad una vez estabilizado el valor.

## 2.5. Hidroximetilfurfural

En la cuantificación del contenido de hidroximetilfurfural (HMF) [3] se empleó agua para análisis, que consistió en agua destilada hervida durante 10 minutos y enfriada.

Para preparar la solución de trabajo de cada muestra, se pesó asegurando al 0,1 mg, 5 g de miel, en un vaso de precipitados de 50 mL limpio y seco. Se disolvió con aproximadamente 25 mL de agua para análisis y se trasvasó esta solución cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL. Se le añadió 0,5 mL del agente clarificante Carrez I (hexacianoferrato de potasio trihidratado al 15%), se agitó, y se añadió 0,5 mL del agente clarificante Carrez II (acetato de cinc dihidratado al 30%), agitando nuevamente. Se enrasó con agua para análisis. Luego se trasvasó a tubos para centrífuga y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, utilizando una centrífuga de mesa marca Rolco modelo 35XXX (Buenos Aires, Argentina), empleando el sobrenadante inmediatamente.

Se prepararon dos tubos de ensayos: muestra (M) y referencia (R). Se pipeteó 5 mL de la solución de la miel clarificada, en sendos tubos de ensayo y se añadió 5 mL de agua para análisis en M y 5 mL de solución de hidrogeno sulfito de sodio (0,2%) en el tubo R. Se agitó cada tubo.

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Metrolab 1700: se midieron las absorbancias de M y de R con respecto al blanco de agua para análisis en cubetas de cuarzo de 10 mm a 284 nm y 336 nm, diluyendo si la muestra presentaba absorbancia mayor a 0,6.

Para calcular el contenido de HMF en mg/kg de miel se empleó la siguiente fórmula:

$$HMF = \frac{748,5 \cdot (A_{284} - A_{336}) \cdot V}{m}$$

Siendo:

---

$A_{284}$  = Diferencia de absorbancia entre los tubos M y R a 284 nm, medida con respecto al blanco

$A_{336}$  = Diferencia de absorbancia de fondo entre los tubos M y R a 336 nm, medida con respecto al blanco

$V$  = Volumen de la solución para la medición en mL.

$m$  = masa de la muestra de miel en gramos.

$748,5$  = es el factor en el que se tiene en cuenta la absorptividad molar del HMF, su peso molecular y la conversión de unidades a mg/kg.

## 2.6 Determinaciones fisicoquímicas realizadas en las muestras provenientes de la provincia de Corrientes

Las muestras recolectadas durante la campaña 2011-2012 provenientes de cuatro cuencas melíferas de la provincia de Corrientes fueron caracterizadas únicamente mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos. Por esta razón, a los parámetros ya descriptos se le adicionó la determinación de prolina, determinación de diastasa, azúcares reductores y sacarosa, que se describen brevemente a continuación.

### 2.6.1. Determinación de prolina

La prolina, el aminoácido libre más importante de la miel, se encuentra en un porcentaje medio del 50-85% con respecto a los demás aminoácidos. Su contenido es un criterio de calidad referido a su maduración y en algunos casos permite detectar adulteraciones, por lo cual el CAA exige un mínimo de 180 mg/kg de miel.

En este trabajo se utilizó el método de la AOAC [3]. La prolina forma con la ninhidrina una combinación compleja coloreada. La ninhidrina es un poderoso agente oxidante que descarboxila y desamina el aminoácido liberando amoníaco a partir del grupo amino, dióxido de carbono, el correspondiente aldehído y ninhidrina en forma reducida. Luego de agregar 2-propanol se determina la absorbancia máxima de la solución de la muestra y de una solución

tipo de prolina en base a la cual se calcula el contenido de prolina de la miel. La interferencia de otros aminoácidos es despreciable.

### *2.6.2. Determinación de diastasa*

La evaluación del contenido enzimático de la miel permite evaluar su calidad, como indicador del estrés sufrido por la miel durante el procesamiento y almacenamiento. El CAA establece un índice de diastasa de 8 (escala Gothe) como mínimo.

La determinación de diastasa se realizó según metodología AOAC [3], que se basa en la decoloración que sufre un sustrato de almidón en presencia de estas enzimas. El sustrato de almidón se inocula con la muestra, produciéndose la hidrólisis enzimática, que se determina por el agregado de solución de yodo, el que produce coloración con el remanente de almidón no hidrolizado. La disminución del color que se produce en los tubos de ensayo después de incubarlos, con respecto a un testigo, dará idea de la medida de la actividad diastásica de la muestra, que se cuantifica y expresa en escala Gothe.

### *2.6.3. Azúcares reductores y sacarosa aparente*

Se realizó el análisis del contenido de azúcares por métodos de reducción, fundados en que la presencia de un grupo aldehídico o cetónico adyacente a un grupo oxhidrilo confiere poder reductor a las moléculas que los contienen. Así, todos los monosacáridos pueden ser oxidados; los disacáridos no lo serán si los grupos aldehídicos o cetónicos de ambos monosacáridos componentes están comprometidos en la unión (caso de la sacarosa). En este trabajo se empleó el método volumétrico de Fehling con modificación de Causse-Bonnans IRAM 15934 [5], el cual emplea el reactivo oxidante FCB, realizándose la reducción del cobre en medio fuertemente alcalino, donde se exalta la propiedad reductora de los azúcares al formarse por ruptura de la molécula una serie de productos más reductores que el azúcar primitivo. Se determina entonces los azúcares reductores por valoración inversa con el

---

reactivo FCB en ebullición. El contenido de sacarosa aparente se realizó por diferencia, luego de realizar una hidrólisis ácida y titular con la misma solución FCB.

El CAA exige un valor mínimo de azúcares invertidos de 65 g/100 g de miel, y un valor máximo de 8 g/100 g de miel para sacarosa aparente.

### 3. Determinación multielemental

#### 3.1. Digestión de las muestras

La digestión de las muestras se realizó por vía húmeda de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 0,25 g de muestra de miel (al 0,1 mg en balanza analítica Ohaus Corporation), en tubos calibrados de polipropileno, y se le adicionó 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  65% Sigma-Aldrich (Alemania). Se dejó tapado en baño de agua ultrasónico Cleanson 1106 (Buenos Aires, Argentina) durante 20 minutos, y luego se lo llevó a baño de agua a 60 °C durante una hora. Luego se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% J.T.Baker (Argentina), llevando a baño de agua a 60 °C durante 15 minutos más. Finalmente, la solución traslúcida se llevó a volumen final de 10 mL con agua ultrapura (resistividad 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

El manipuleo de las muestras y patrones se realizó en campana de flujo laminar horizontal marca LABSA-MOBILAB, de forma de trabajar en atmósfera libre de material particulado (clase 100), evitando contaminaciones ambientales del laboratorio.

#### 3.2. Análisis mediante AAS

En el capítulo precedente se describieron los fundamentos de la metodología de espectrometría por absorción atómica (AAS), ya sea por llama u horno de grafito. Para las determinaciones llevadas a cabo en este trabajo mediante esa metodología, se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA 6600 con muestreador automático (Figura 3.4). Se determinaron potasio y sodio por emisión atómica en llama de aire-acetileno.

Y se determinó magnesio por absorción atómica atomizando en horno de grafito, puesto que la bibliografía indica que es una técnica adecuada para cuantificar dicho elemento [6], pese a no ser el más asequible. Para eliminar interferencias de ionización se utilizó CsCl (Sigma-Aldrich) como supresor de ionización, a una concentración final de 0,3%. Las condiciones instrumentales utilizadas para cada elemento fueron las sugeridas por el software Wizard, a través del cual se configuran las determinaciones. Para cuantificar cada elemento se realizaron respectivas curvas de calibración, trabajando a 5 niveles de concentración, en medio HNO<sub>3</sub> 1% y por triplicado, a partir de soluciones monoelementales marca PerkinElmer Atomic Spectroscopy Calibration Standard, Norwalk, USA. Simultáneamente con las curvas de calibración se realizaron 11 blancos para determinar los límites de detección de cada elemento, que fueron calculados como tres veces la desviación estándar de los 11 blancos de análisis [7], que consistieron en alícuotas de agua ultrapura sometidas a los mismos procedimientos de preparación de las muestras; estos blancos se prepararon y analizaron de manera no consecutiva.



*Figura 3.4. Espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu 6600.*

Además, se realizaron ensayos de recuperación; para ello se pesaron 10 muestras seleccionadas al azar, y se les agregó 200  $\mu$ L de solución estándar de cada analito previo a la

---



digestión, con el objeto de evaluar la recuperación de los mismos. El método consiste en agregar una concentración conocida de estándar de cada elemento a muestras de composición ya determinada. A continuación, se repite el proceso de medida químico y la señal obtenida se deberá a la cantidad de analito originalmente presente en la muestra sumada a la cantidad agregada. Con los resultados obtenidos se calcula el porcentaje de recuperación.

### 3.3. Análisis mediante ICP-MS

En el Capítulo II se detalla el funcionamiento del instrumental. En este apartado se describe la determinación de elementos a nivel de vestigios y tierras raras realizada mediante ICP-MS. Se utilizó un espectrómetro marca Perkin-Elmer® modelo SCIEX, ELAN DRC-e (Thornhill, Canada), el cual puede observarse en la Figura 3.5.





Figura 3.5. ICP-MS empleado en la determinación de minerales.

La introducción de muestras se realizó mediante un nebulizador resistente a ácido fluorhídrico, compuesto por perfluoracetato (modelo PFA-ST), acoplado a una cámara cuarzo de nebulización ciclónica, con un deflector interno y una línea de drenaje, refrigerado (Peltier®) con un sistema PC3 fabricado por ESI (Omaha - NE, EE.UU.). Los parámetros configurados en el instrumental para la determinación de todas las muestras fueron los que se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Configuración empleada en el ICP-MS

<b>Instrumento</b>	<b>Elan DRC-e (Perkin-Elmer SCIEX. Thornhill. Canadá)</b>
Flujo de muestra	200 $\mu\text{L min}^{-1}$
Introducción de muestra	nebulizador modelo PFA-ST
RF power	1500 W
Flujo de gas	Nebulizador, 0,87 L $\text{min}^{-1}$
Interface	Ni conos (sampler and skimmer)
Método de perfil elemental	Modo estandar
Modo de escaneo	Peak hopping
Tiempo de permanencia	50 ms en modo estandar
Número de réplicas	3
Modo del detector	Dual
Isótopos	$^{107}\text{Ag}$ , $^{27}\text{Al}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{138}\text{Ba}$ , $^9\text{Be}$ , $^{209}\text{Bi}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{52}\text{Cr}$ , $^{133}\text{Cs}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{115}\text{In}$ , $^7\text{Li}$ , $^{55}\text{Mn}$ ,

$^{60}\text{Ni}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{45}\text{Sr}$ ,  $^{205}\text{Tl}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{51}\text{V}$ ,  $^{140}\text{Ce}$ ,  
 $^{164}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Er}$ ,  $^{153}\text{Eu}$ ,  $^{158}\text{Gd}$ ,  $^{165}\text{Ho}$ ,  $^{139}\text{La}$ ,  
 $^{175}\text{Lu}$ ,  $^{142}\text{Nd}$ ,  $^{141}\text{Pr}$ ,  $^{152}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Tb}$ ,  $^{169}\text{Tm}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  
 $^{174}\text{Yb}$ ,  $^{103}\text{Rh}$

---

### 3.3.1. *Cuantificación elemental por calibración externa*

Todas las determinaciones se realizaron mediante calibración externa; para ello se realizaron curvas de calibración para cada elemento a determinar, preparadas a 5 concentraciones distintas en solución de  $\text{HNO}_3$  1%, por triplicado. Cada patrón utilizado se leyó mediante nebulización directa de los mismos, con las condiciones instrumentales indicadas anteriormente. Las diluciones se realizaron a partir de soluciones estándar: I) Solución multielemental estándar 2 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y e Yb en 5%  $\text{HNO}_3$ ) y II) Solución multielemental estándar 3 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, Zn, U y V en 5%  $\text{HNO}_3$ ), ambas marca Perkin-Elmer® Plus.

### 3.3.2. *Control de calidad de los resultados*

Simultáneamente con las curvas de calibración se realizaron 11 blancos de análisis para determinar los límites de detección del método (LOD). Los LOD se definen como 3 veces la desviación estándar de la medida de estos blancos [5], que fueron preparados y analizados de manera no consecutiva. Fueron determinados empíricamente para tenerlos en cuenta al momento de informar el contenido de los distintos analitos debido a que los límites de detección dependen de factores como la sensibilidad del instrumento, el límite de detección instrumental, las interferencias espectrales y/o la contaminación por los reactivos analíticos.

La precisión del método analítico, que representa un parámetro que refleja el grado de concordancia que existe entre un conjunto de valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas e independientes una de otra bajo condiciones específicas, se evaluó

teniendo en cuenta las condiciones en que se realizan las medidas. Se realizó un ensayo de repetibilidad midiendo de forma repetida las concentraciones de elementos correspondientes al estándar 3 en un mismo día y usando los mismos parámetros de ajuste del instrumento. La repetibilidad es una medida de la varianza interna y refleja la precisión máxima que se puede obtener con un determinado método analítico. Los resultados se obtuvieron realizando ensayos independientes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar, en el mismo laboratorio, con el mismo equipamiento y por el mismo operador en un intervalo corto de tiempo (una jornada de trabajo). Adicionalmente, se determinó la reproducibilidad del método. Con este objetivo, se realizaron 10 mediciones en distintos días de trabajo, con nuevas condiciones de puesta a punto del equipo; es esperable que la reproducibilidad genere valores menos precisos que la repetibilidad por someter las mediciones a condiciones más exigentes (distintos días, distintos parámetros de trabajo del equipo, otros).

Finalmente, la exactitud del método se determinó mediante el método de adición de estándar. Este procedimiento de agregado de estándar permite evaluar la calidad de los pretratamientos aplicados a las muestras y posibles pérdidas que pudieran ocurrir durante las etapas de digestión.

*Adición de estándar interno:* Previo a la digestión de 10 muestras seleccionadas al azar, una vez pesadas, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de una solución de Rh (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – Sigma-Aldrich®) en  $\text{HNO}_3$  2%, como estándar interno. La concentración de este elemento se determinó luego de manera simultánea al resto de analitos por ICP-MS, y se calculó el porcentaje de recuperación del mismo. El elemento Rh se seleccionó debido a que en ensayos cualitativos previos practicados en tres muestras problemas seleccionadas al azar, dicho elemento se encontraba a niveles no detectables.

---

*Adición de estándar externo:* previo a la digestión de las muestras se agregó 50  $\mu\text{L}$  de la solución estándar 3, con el objeto de evaluar la recuperación de los elementos agregados. La adición de estándar se realizó a 10 muestras seleccionadas al azar. El método consiste en agregar una concentración conocida de estándar de cada elemento a una muestra problema de composición ya determinada. A continuación, se repite el proceso de medida químico y la señal obtenida se deberá a la cantidad de analito originalmente presente en la muestra sumada a la cantidad agregada. Con los resultados obtenidos se calcula el porcentaje de recuperación. El propósito de este método es corregir la presencia de posibles efectos de interferencias debidas a la matriz de la muestra, u otras causas (espectrales o químicas).

#### **4. Análisis multivariado**

El análisis multivariado es un conjunto de métodos estadísticos y matemáticos destinados a describir e interpretar los datos que provienen de la observación de varias variables estadísticas, estudiadas conjuntamente [8].

Para realizar un análisis multivariado, la gran cantidad de datos, obtenidos generalmente mediante técnicas instrumentales y analíticas actuales, se organizan en forma de una matriz con  $n$  filas, cada fila conteniendo las observaciones registradas sobre un mismo individuo (muestra, caso u observación), y  $p$  columnas, cada una representando una variable [9].

Los métodos y modelos del análisis multivariado permiten explorar, describir e interpretar datos que provienen del registro de variables sobre un mismo caso objeto de estudio (muestra). Como las variables representan atributos de la misma muestra, usualmente están correlacionadas. Además de describir, toma en cuenta la correlación para caracterizar las muestras.

El análisis multivariado provee herramientas para comprender la relación (dependencia) entre las variables medidas simultáneamente sobre la misma para comparar, agrupar y/o

clasificar observaciones multivariadas e incluso para comparar, agrupar y/o clasificar variables.

Tratar todas las filas a la vez proporciona más información que cada una independientemente. En las técnicas multivariantes, se trabaja simultáneamente con la totalidad de los datos de la tabla y por lo tanto requiere la aplicación de álgebra de matrices. Cada técnica multivariante debe elegirse dependiendo de lo que se quiera analizar. Es muy importante formular el problema de manera tal que el objetivo para el análisis sea claro y que los datos sean adecuados para alcanzar los objetivos planteados.

#### **4.1. Análisis exploratorio**

El análisis exploratorio de datos involucra una visualización de la relación entre muestras y entre variables, y no requiere necesariamente una asignación a grupos. Usualmente es un estadio preliminar para un modelado supervisado, como uno de clasificación, y puede responder si existe un agrupamiento en los datos, si existen datos extremos, si las muestras de una fuente similar están relacionadas o incluso si hay tendencias, como ser una tendencia temporal en los datos [5].

Una cuestión en el análisis exploratorio de datos es la influencia que cada variable ejerce. En general se hace necesario aplicar transformaciones previas a los datos de las variables originales cuando tienen diferencias de niveles o si las unidades son distintas, para que se logre dar igualdad de importancia a todas las variables. Uno de los procedimientos más utilizados es el auto-escalado, que consiste en restar a cada valor determinado la media calculada para el total de muestras consideradas y luego a este resultado dividirlo por la desviación estándar de la misma. De esta forma se logran obtener valores sin unidades, lográndose que las variables más intensas no sean las más influyentes solo por el hecho de poseer valores absolutos de mayor magnitud que las señales menos intensas, y, por lo tanto,

---

pueden ser igualmente consideradas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el auto-escalado de datos provoca que los ruidos puedan tener una mayor influencia en los análisis.

En los métodos no supervisados se visualiza un vector para cada observación, pero no está asociado a ninguna respuesta. Se lo llama no supervisado porque no existe respuesta que pueda supervisar el análisis realizado, lo contrario a lo que sucede con los métodos supervisados que se emplean para clasificar.

#### *4.1.1. Descripción de los datos*

Para observar los datos y establecer tendencias previo a un análisis exploratorio más sofisticado y sin establecer hipótesis previas, se puede realizar un análisis descriptivo empleando medidas resumen y gráficos de la estadística básica [10]. Para ello se puede determinar la media, mediana, desviación estándar, correlación, distribución de los datos, detectar datos extremos, etc.

La media es muy sensible a los valores extremos de la variable, por lo cual no es recomendable usar este parámetro como medida central en las distribuciones muy asimétricas [11]. Para estos casos es preferible usar la mediana, que es el primer valor de la variable que deja por debajo de sí al 50% de las observaciones. Tiene la ventaja de no estar afectada por las observaciones extremas, ya que no depende de los valores que toma la variable, sino del orden de las mismas; por ello es adecuado su uso en distribuciones asimétricas.

Otra herramienta de descripción de datos usada en esta tesis es el gráfico de cajas y bigotes, usual para resumir datos, que fue descrito por primera vez por John Tukey en el año 1977.

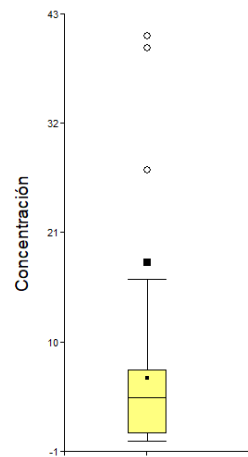


Figura 3.6. Gráfico de cajas y bigotes.

En el gráfico, ejemplificado en la Figura 3.6, los extremos de las cajas se extienden desde el cuartil inferior al cuartil superior de la variable. El 50% central de los valores de datos están cubiertos por esta caja. La línea en el interior de la caja es la localización de la mediana simple; si los datos provienen de una distribución simétrica, esta línea pasa por el centro de la caja. El punto o cuadrado dibujado dentro de la caja representa la media simple. Una diferencia sustancial entre la media y la mediana indica habitualmente la presencia de valores atípicos (datos con valores que no provienen de la misma distribución que el resto) o distribución asimétrica. En este caso de distribución asimétrica, la media se situará en la dirección de la mitad mayor de la caja y existirá asimetría hacia esa dirección. Los bigotes se extienden desde los cuartiles hasta el máximo y el mínimo de las observaciones en la muestra, a no ser que algunos valores estén lo suficientemente lejos de la caja para clasificarse como “valores atípicos”, en cuyo caso los bigotes se extienden hasta el más extremo de los puntos no calificado como “atípico”. Tukey toma dos tipos de valores atípicos: atípicos lejanos y atípicos dudosos. *Atípicos lejanos* son los puntos situados a más de 3 veces el rango intercuartílico por arriba o por debajo de los límites de la caja. Los valores fuera de estos límites se denotan en la Figura 3.6 por un círculo. *Atípicos dudosos* son los puntos situados a más de 1,5 veces el rango intercuartílico por arriba o por debajo de los límites de la caja. Estos valores están



denotados en la figura como cuadrados rellenos, y deben ser considerados simplemente buenos para una investigación posterior [12].

#### 4.1.2. *Análisis de componentes principales*

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una de las técnicas de reducción de dimensión, y como tal, permite examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión al espacio original de las variables. Para ello se construye un número (generalmente reducido) de nuevas variables sintéticas (Componentes Principales, CP) de modo que estas nuevas variables contengan una alta proporción de la información contenida en el conjunto de variables originales. Se realiza una secuencia de proyecciones de los datos, mutuamente incorrelacionados y ordenados en varianza [13]. Tiene la ventaja de ser una aproximación general muy flexible de análisis exploratorio. Pero se resiente cuando hay varios grupos distintos, y a veces el espacio de visualización es ineficiente, además de que en ocasiones se dificulta la elección de los CP para la visualización [14].

Para realizar un ACP de forma exploratoria o descriptiva, no es necesario que los datos sigan distribución normal. Lo único a controlar es que las variables sean cuantitativas. No es necesario asumir ninguna estructura previa al análisis, pues la idea es encontrar combinaciones lineales de las variables originales con máxima varianza y observar posibles agrupamientos. Una combinación lineal es una suma ponderada de las variables, es decir un índice que combina todas las variables, dando a cada una de ellas un peso o ponderador. Así, la técnica incluye la asignación de pesos diferenciales para las distintas variables con la finalidad de hacer algunas de ellas más importantes en la descripción de la variabilidad subyacente (información).

El ACP opera sobre la matriz de varianza-covarianza de los datos y preserva la distancia Euclídea entre observaciones. Los datos podrían o no ser previamente centrados y/o escalados dando lugar a distintos tipos de ACP. El ACP a partir de la matriz de correlación de

los datos (matriz de covarianza de las variables originales centradas y escaladas) es útil cuando las unidades de medidas y/o las varianzas de las variables son diferentes. Cuando las variables son medidas en escalas diferentes, o tienen diferentes magnitudes, o una combinación de éstas, es recomendable la obtención de las componentes a partir de la matriz de correlación, trabajando con los datos estandarizados [15]. Las componentes principales obtenidas usando la matriz de correlación tiene la desventaja de no tener una interpretación directa con respecto a las variables originales, pues primero cada coeficiente deberá ser dividido por la desviación estándar de la variable respectiva. Por otra parte, estas componentes principales pueden ser sustancialmente diferentes a las obtenidas usando la matriz de covarianza; en cada caso habrá que juzgar qué análisis es más conveniente.

Los coeficientes de cada variable original en la componente son proporcionales al coeficiente de correlación entre la componente y la variable. Que las componentes principales sean ortogonales permite analizarlas separada o independientemente del valor de otras componentes. Cabe destacar que los ponderadores (elementos de los autovectores correspondientes a la descomposición espectral de una matriz de varianzas-covarianzas) son tales que las nuevas variables sintéticas (CP) son óptimas para explicar la variabilidad total de la nube de puntos que representa las observaciones en el hiperespacio [10].

El número de CP a seleccionar será especificado por el usuario, por ejemplo, en función del porcentaje de variabilidad que desee o necesite explicar. Por otra parte, si en la representación las componentes prácticamente se estabilizan a partir de un cierto número, entonces aumentar la dimensión apenas aporta más variabilidad explicada [8].

En el ACP, hay dos parámetros importantes a analizar, los autovalores y los autovectores. Los autovalores representan el nivel de variación de la variable original que es explicada por la componente principal asociada. Los autovectores son los vectores de coeficientes para la combinación lineal. Las correlaciones (o loadings) entre las componentes principales y las

---

variables originales representan un indicador de cuán importante es una variable particular en la construcción de la componente. Tiene en cuenta diferencias en las varianzas de las variables originales y consecuentemente elimina el sesgo de interpretaciones causadas por diferentes escalas de medición.

Los ACP son también herramientas poderosas de visualización de los resultados. Los mismos son mostrados en gráficos bidimensionales o tridimensionales, conocidos como gráficos de scores, en los que las muestras son proyectadas en los nuevos ejes, siendo posible verificar la agrupación de las que son semejantes entre sí y aún la discriminación en clases. En un gráfico de scores de la primera componente principal versus la segunda, por ejemplo, todas las muestras son alojadas en el gráfico en la forma de puntos de acuerdo con sus coordenadas en esas componentes. Además de eso, el análisis de los gráficos construidos por las primeras componentes principales es suficiente para extraer información sobre el sistema en estudio. Esto se debe al hecho de que las primeras componentes concentran el mayor porcentaje de información relevante.

Además, se puede representar un “biplot” o “bigráfico”, que es una representación más completa, en un mismo gráfico, a las filas (muestras) y a las columnas (variables) de una matriz de datos [8]. Los gráficos de dispersión “biplots” son usados para visualizar las observaciones y las variables en el mismo gráfico, de forma tal que se pueden hacer interpretaciones sobre las relaciones conjuntas.

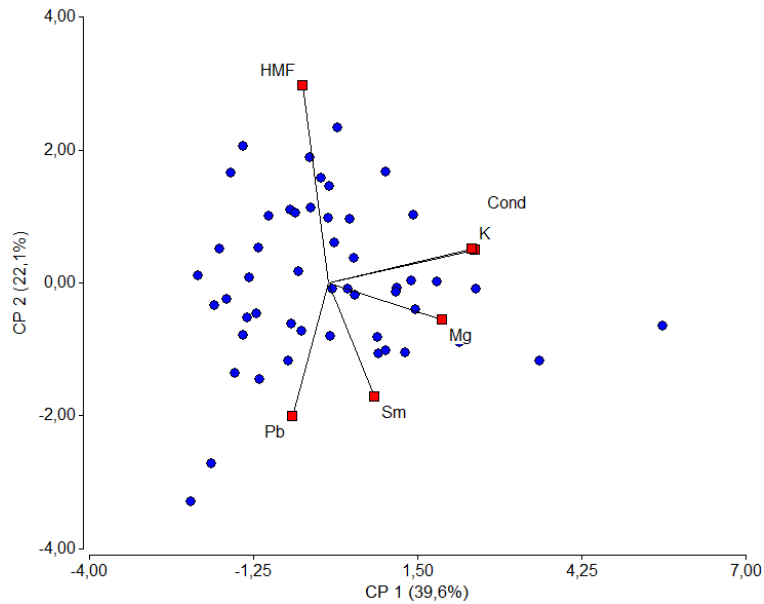


Figura 3.7. Gráfico de dispersión "biplot".

Las observaciones son generalmente graficadas como puntos (azules en la Figura 3.7), obtenidos a partir de combinaciones lineales de las variables originales. Las variables son graficadas como vectores desde el origen. Los ángulos entre las variables representan la correlación que existe entre ellas, para el ejemplo graficado en la Figura 3.7, K y Cond están muy correlacionadas (los vectores de ambas variables están superpuestos). Y las longitudes de esos vectores pueden hacerse proporcionales a las desviaciones estándar. Cuando las longitudes de los vectores son similares, el gráfico sugiere contribuciones similares de cada variable en la representación realizada.

En los gráficos biplots, la distancia entre símbolos representando observaciones y símbolos representando variables no tiene interpretación, pero las direcciones de los símbolos desde el origen si pueden ser interpretadas. Las observaciones (puntos filas) que se grafican en una misma dirección que una variable (punto columna) podría tener valores relativamente altos para esa variable y valores bajos en variables o puntos columnas que se grafican en dirección opuesta.

## 4.2. Análisis clasificatorio de datos

Una vez realizado el análisis exploratorio, los resultados obtenidos se pueden utilizar (o no) para la construcción de modelos de clasificación, los que permitirán predecir y/o clasificar muestras de origen desconocido. A diferencia de los análisis exploratorios, en el análisis clasificatorio se emplean los llamados métodos supervisados, porque cada observación medida está asociada a una respuesta. Entonces, lo que se pretende es ajustar un modelo para poder predecir las respuestas de futuras observaciones, o mejor, encontrar relaciones entre las respuestas y los predictores [6]. Cuando la respuesta que se predice es cualitativa, se habla de un proceso de clasificación ya que corresponde asignar una categoría o clase a una observación.

Desde un punto de vista geométrico, el análisis de clasificación corresponde a la identificación de regiones en el hiperespacio de las variables correspondientes a diferentes clases. Entonces, cada clase indica una serie de observaciones que comparten características similares, y es importante resaltar que la definición de estas características es dependiente del planteo del problema. Existen varias técnicas posibles de clasificación, algunas de ellas son la regresión logística, el análisis discriminante lineal, vecino más cercano, árboles de clasificación, bosque aleatorio, máquinas de vectores soporte.

### 4.2.1. Validación del método

Cuando se realizan predicciones, se debe calcular el error del modelo obtenido. Así, el error de la prueba (test error) es el promedio del error que resulta de aplicar el método para predecir una respuesta de una nueva observación (una que no fue usada en el entrenamiento del método). Este cálculo se lleva a cabo fácilmente si se dispone de un número elevado de muestras que permita utilizar una parte para modelar y otro grupo aparte de muestras para evaluar. Sin embargo, si los datos tienen un número limitado de muestras, y se asume que la calidad de los datos es suficiente y que es representativa de toda la población de la muestra,

de forma tal que se pueda usar los datos disponibles para encontrar el mejor modelo predictivo, se calcula el error empleando diversas estrategias.

Tradicionalmente, esto se ha logrado dividiendo los datos existentes en conjuntos de entrenamiento y de prueba. El conjunto de entrenamiento se usa para construir y ajustar el modelo, y el conjunto de prueba se usa para estimar el rendimiento predictivo del modelo. Esta metodología presenta ciertas desventajas, dado que, al realizar una única división de datos, el resultado obtenido de la clasificación se verá fuertemente influenciado por las muestras seleccionadas al azar en el conjunto de entrenamiento y prueba. Una forma de subsanar esta desventaja es repetir la selección de subgrupos y determinar el nivel de error que se comete para cada submuestra, finalmente se promedian los resultados obtenidos informando de esta manera un valor probable de porcentaje de aciertos y su intervalo de confianza.

Otra manera de realizar la división en subgrupos es dividir la matriz de datos en  $n$  subgrupos iguales. Se repite el entrenamiento del modelo en los  $n-1$  subgrupos y luego se evalúa el desempeño en el subgrupo dejado fuera del entrenamiento. Este procedimiento se repite hasta que todos los subgrupos hayan sido evaluados al menos una vez. Generalmente la selección del  $n$  se realiza mediante la aplicación de métodos iterativos que permiten encontrar valores óptimos para la evaluación. Los valores más comúnmente utilizados son 10, 5 y en casos con matrices con muy pocas muestras ( $< 60$  muestras)  $n$  vale 1 [14, 15].

Muchas técnicas son capaces de aprender la estructura de un conjunto de datos de forma pormenorizada, tal que cuando el modelo se aplica a datos en los que se construyó el modelo, predice correctamente cada muestra. Esto sugiere que además de aprender los patrones generales de los datos, el modelo también ha aprendido las características del ruido único de cada muestra. Se dice que este tipo de modelo se encuentra sobreajustado y generalmente tendrá una precisión pobre al predecir futuras muestras problema.

---

La validación cruzada dejando uno afuera (*leave-one-out*, *LOO*), es uno de los diversos métodos que divide los datos en conjuntos de entrenamiento y de prueba. La matriz de datos es dividida en  $N$  subconjuntos, siendo  $N$  el número total de muestras. El modelo se estima con los datos de todas las muestras excepto una, y la predicción se hace con ese punto excluido, repitiéndose el procedimiento  $N$  veces. Posteriormente se calcula el error promedio de todas las pruebas, y con ese error promedio se evalúa el modelo. Si bien este método tiende a generar resultados optimistas respecto al desempeño de un determinado modelo, si la matriz de dato posee menos de 60 muestras, el LOO es el método de elección para evaluar su desempeño, evitando los problemas del sobreajuste.

#### 4.2.2. *Análisis discriminante lineal*

El Análisis Discriminante Lineal (ADL) permite describir algebraicamente las relaciones entre dos o más poblaciones (o grupos de observaciones multivariadas) de manera tal que las diferencias entre ellas se maximicen o se hagan más evidente, siendo el objetivo encontrar el subespacio de características que optimiza la separabilidad de clase [18]. Requiere del conocimiento previo de cómo las muestras están estructuradas en grupos. Este conocimiento es anterior al análisis estadístico y proviene del conocimiento teórico del investigador o también podría ser del conocimiento empírico, pero en este último caso realizado a partir de otras variables distintas a las que se usarán en la discriminación. Este análisis se realiza frecuentemente con fines predictivos: utilizar los valores previamente conocidos de las variables independientes para predecir en qué categoría (grupo) ya establecida asignar a nuevos individuos. Es común en problemas de clasificación, cuando se tienen suficientes datos, realizar una validación cruzada. Esto implica particionar el conjunto de datos original en dos subconjuntos, uno utilizado para hallar la función discriminante y otro usado para la validación de la misma, estimando el error del discriminante hallado [10].

El análisis discriminante es una técnica de análisis multivariante que es capaz de aprovechar las relaciones existentes entre una gran cantidad de variables independientes para maximizar la capacidad de discriminación. Busca la combinación lineal de las variables independientes que mejor diferencie a los grupos. Es por eso que a diferencia del ACP, los ponderadores de las variables originales en el análisis discriminante son tales que la nueva variable sintética es óptima para explicar la variabilidad entre grupos. Además, permite identificar cuáles de las variables son necesarias para diferenciar a los grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible, sin emplear la totalidad de ellas. El ADL propuesto por Fisher (1936) es uno de los métodos más sencillos y conocidos de clasificación [19]; básicamente divide el espacio muestral en subespacios mediante hiperplanos que permiten separar lo mejor posible los grupos en estudio. Desde el punto de vista estadístico, los límites que separan las diferentes clases en el espacio multidimensional se definen sobre la base de un criterio llamado regla de Bayes, que establece que "una muestra debe ser asignada a la clase a la que tiene la mayor probabilidad de pertenecer". Los supuestos para la utilización de ADL son normalidad multivariada e igualdad de matrices de covarianzas entre los grupos.

## Referencias

- [1] INTI, SADA, CONASA, and SENASA, *Protocolo Nacional de Calidad de miel*. Argentina, 2005.
  - [2] SENASA, *Resolución 186/2003*. 2003.
  - [3] AOAC, *AOAC Official methods of analysis*, 16th ed. Washington D.C., 1996.
  - [4] IRAM, *Instituto de Racionalización Argentino de Materiales (IRAM)*. Argentina, 1996.
  - [5] IRAM, *Instituto de Racionalización Argentino de Materiales (IRAM)*. Argentina, 1997.
  - [6] T. Agilent, "Fundamentos de Espectroscopia Atómica." 2016.
  - [7] B. Magnusson and U. Örnemark, "A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics," *Eurachem*, 2014.
-



- [8] C. M. Cuadras, *Nuevos métodos de análisis multivariante*, CMC Editio. Barcelona, Sapin, 2014.
- [9] L. Massart, L. M. C. Vandeginste, B. G. M. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Science, 1998.
- [10] M. Balzarini and C. Bruno, “Aplicaciones del Análisis Multivariado.” Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2014.
- [11] F. Ruiz Díaz, E. Barón Lopez, Francisco Javier Sánchez Font, and L. Parras Guijosa, *Bioestadística: métodos y aplicaciones*. Málaga, 2008.
- [12] I. StatPoint, “Statgraphics Centurion.” 2005.
- [13] T. Hastie, R. Tibsharani, and J. Friedman, *The Elements of Statistical Learning*, Second Edi. California, 2009.
- [14] R. Brereton, *Chemometrics for Pattern Recognition*. Wiley, 2009.
- [15] A. Jamilah Masnan, Maz Zakaria, A. Yeon Md. Shakaff, N. Idayu Mahat, H. Hamid, N. Subari, and J. Mohamad Saleh, *Principal Component Analysis - Engineering Applications*. Rijeka, Croatia, 2012.
- [16] M. Kuhn and K. Johnson, *Applied Predictive Modeling*. New York, Estados Unidos: Springer Science+Business Media, 2013.
- [17] G. James, D. Witten, T. Hastie, and R. Tibshirani, *An Introduction to Statistical Learning - with Applications in R*. New York: Springer Texts in Statistics, 2013.
- [18] S. Raschka, *Python Machine Learning*. Birmingham, Reino Unido: Packt Publishing Ltd., 2015.
- [19] A. J. Izenman, *Modern Multivariate Statistical Techniques: Regression, Classification, and Manifold Learning*. New York, Estados Unidos: Springer Texts in Statistics, 2009.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## Capítulo IV: Resultados y discusión

Las muestras obtenidas durante la campaña 2015-2016 correspondiente a las cuatro provincias del NEA fueron caracterizadas mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos y determinación de la composición multielemental por espectroscopía atómica. Toda la información generada se resumió en tablas (arreglos matriciales) que fueron procesados mediante el uso de técnicas de análisis multivariado con el objeto de explorar relaciones algorítmicas entre las variables y/o muestras, a la vez que se buscó proponer modelos predictivos de identidad de origen geográfico de las muestras.

### 1. Determinaciones fisicoquímicas

En primer término, las muestras fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico. Se cuantificaron los siguientes parámetros: Humedad (Hum), Color, pH, Conductividad (Cond) y Contenido de hidroximetilfurfural (HMF). La tabla 4.1 resume los resultados obtenidos para cada una de estas determinaciones. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos en muestras de miel de provenientes de las provincias del NEA

		Formosa	Chaco	Corrientes	Misiones
Hum (%)	Mediana	17,7	19,0	18,7	18,4
	Min – Máx	17,4 – 18,8	16,4 – 20,5	17,2 – 20,7	16,9 – 20,0
Color (mm Pfund)	Mediana	69	80	80	85
	Min – Máx	16 – >150	35 – 132	47 – 150	42 – 150
pH	Mediana	3,92	4,02	3,85	3,75
	Min – Máx	3,77 – 4,63	3,67 – 4,26	3,52 – 4,87	3,38 – 4,47
Cond (µS/cm)	Mediana	430	482	727	550
	Min – Máx	353 – 748	134 – 658	359 – 1538	190 – 1143
HMF (mg/kg)	Mediana	33	28	11	6
	Min – Máx	3 - 63	1 – 52	2 - 38	1 - 70

Como parámetro estadístico de distribución de la serie de datos se decidió trabajar con los valores de mediana y rango, ya que los valores analizados son de mediciones realizadas a muestras de distintos orígenes geográficos, y presentan una distribución no normal de sus valores de resultados.

### 1.1. Humedad

La humedad es un parámetro físico indicador de la madurez de la miel [1], por lo que permite inferir si determinada miel fue cosechada cuando el alza melaria estaba operculado al menos en un 80%, garantizando una madurez óptima.

La determinación se realizó por refractometría, convirtiendo ese valor a porcentaje de humedad a 20 °C. Con respecto a los resultados obtenidos, la mayoría de las muestras se encontró dentro de los valores exigidos por la legislación del MERCOSUR de identidad y calidad de la miel [1], como de la Comunidad Europea (máximo de 20%) [2]. Estos resultados indicarían que las muestras utilizadas para este estudio fueron cosechadas en su nivel de maduración apropiado y que fueron conservadas adecuadamente.

Por otro lado, cinco muestras del total superaron levemente el valor límite establecido (tres muestras provenientes de la provincia de Corrientes y dos muestras de Chaco). Si bien estos resultados podrían ser indicadores de que las muestras fueron cosechadas o conservadas inapropiadamente, los valores medidos no se apartan lo suficiente para realizar este tipo de afirmaciones.

---

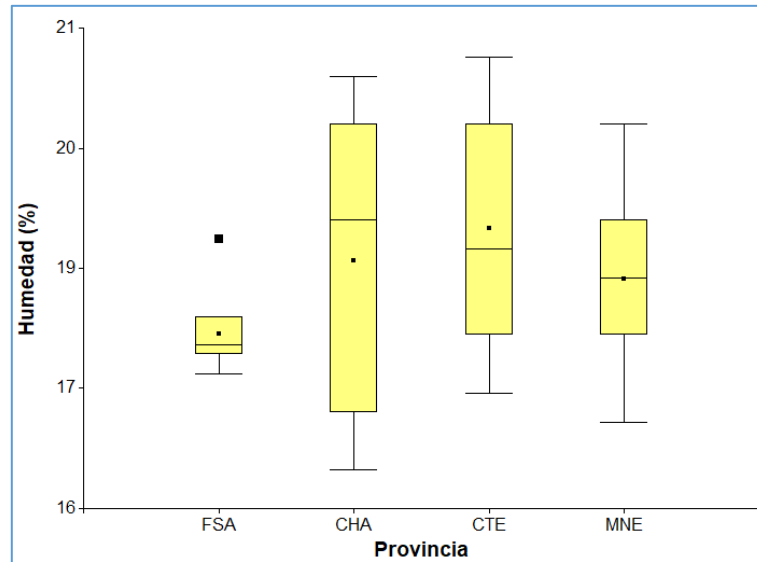


Figura 4.1. Gráfico de cajas y bigotes de Humedad, agrupado por provincia de origen.

En la Figura 4.1 se observa una mayor dispersión de los valores de humedad de la provincia de Chaco, lo opuesto a la provincia de Formosa, la que a su vez presenta valor de mediana inferior a las demás provincias.

## 1.2. Color

El color es un parámetro que no está regulado en ningún reglamento. Pero es el primero (y muchas veces el único parámetro) que tiene en cuenta el potencial comprador, al observar la miel visualmente. Es sabido que hay mercados donde prefieren las mieles de colores claros y sabores sutiles (Alemania), mientras que otros pueden preferir las de color oscuro y sabores más intensos.

La medición del color de las muestras [3] se realizó en un colorímetro HANNA, leyendo directamente en el display el color en mm Pfund. Se muestra en la Figura 4.2 el gráfico de cajas y bigotes de Color, agrupado por provincia de origen de las mieles.

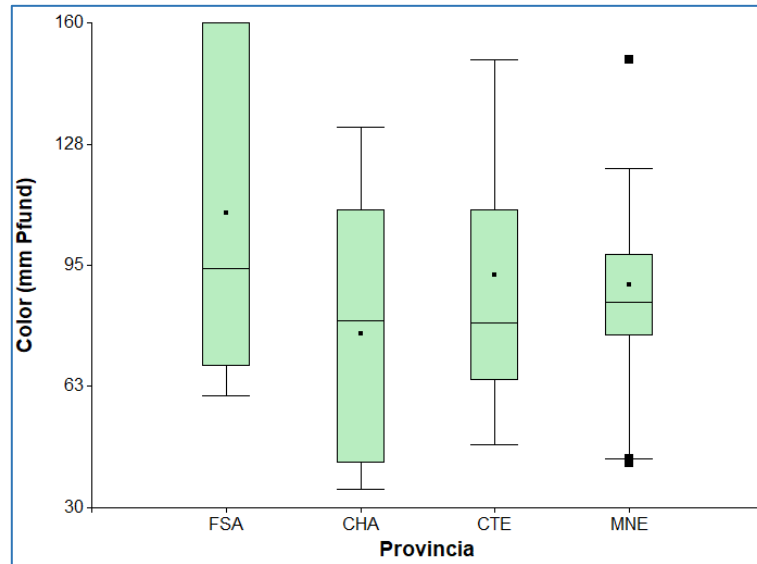


Figura 4.2. Gráfico de cajas y bigotes de Color, agrupado por provincia de origen.

Al observar la Figura 4.2 se puede afirmar que las muestras de la provincia de Formosa presentan una gran dispersión en la escala de mm Pfund, pero que en su mayoría son colores ámbar y ámbar oscuro, lo que está a su vez asociado con sabores intensos y un mayor contenido mineral [4]. Además, las mieles de la provincia de Misiones presentan en su mayoría color ámbar, el cual es aceptado y buscado por el consumo interno de la provincia [5]. Por otra parte, las mieles de Corrientes y Chaco presentan variabilidad de color, en gran parte entre el ámbar claro y el ámbar.



Figura 4.3. Colores según la escala en mm Pfund [6].

En la Figura 4.3 se aprecian visualmente los colores de mieles según su denominación categórica, que se corresponden con la escala en mm Pfund.



### 1.1. pH

El pH es otro de los parámetros que no está regulado en ningún reglamento; aun así, es de importancia como indicio de características propicias a deterioro, sumado a otros factores, como ser la elevada humedad y presencia de microorganismos. Para medir el pH, las muestras se disolvieron y diluyeron según la técnica descrita en el Capítulo III, y se midió con el peachímetro previamente calibrado. Se observa en la Figura 4.4, Gráfico de cajas y bigotes de pH, que los valores de las medianas de pH de las cuatro provincias no presentan grandes diferencias.

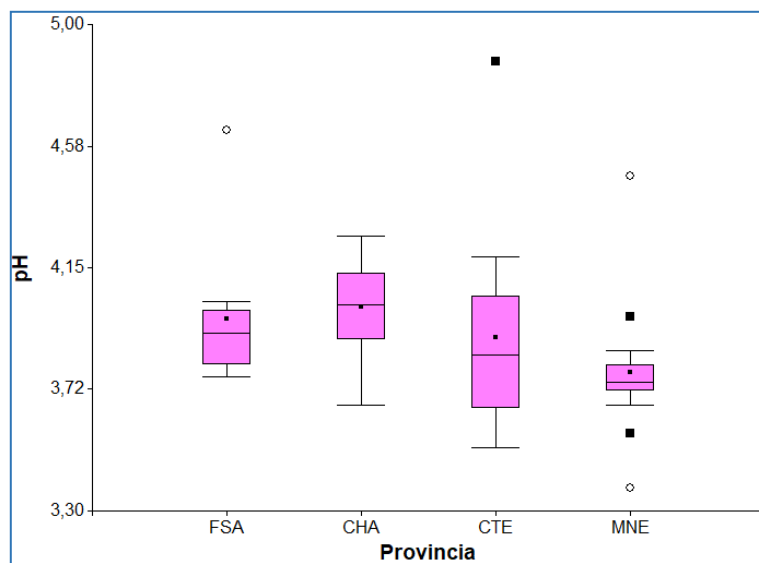


Figura 4.4. Gráfico de cajas y bigotes de pH, agrupado según provincia de origen.

Corrientes es la provincia que presenta mayor dispersión en sus valores, y Misiones la que posee menor dispersión, aunque ambas provincias presentan muestras con valores atípicos, además, Misiones y Formosa presentan valores extremos.

Los valores de pH son similares a los que han encontrado otros autores [7, 8], si se tiene en cuenta la mediana de todas las muestras (3,87) y el rango (3,38 - 4,87). Contrariamente, otros trabajos, que han estudiado mieles de pino y de regiones áridas, encontraron valores de pH mayores que los presentados en esta tesis [9, 10].

## 1.2. Conductividad eléctrica

El valor de conductividad de la miel puede ser útil para diferenciar el origen de una muestra de miel, de néctar o de mielada. En términos generales, las mieles de néctar poseen valores de conductividad inferior a 0,8 mS/cm, mientras que las mieles de mielada presentan valores superiores a dicho número.

Los reglamentos argentino y MERCOSUR no legislan los valores de conductividad en miel. Pero sí lo hace la Comunidad Europea, que exige no más de 0,8 mS/cm para las mieles de flores. En cambio, exige no menos de 0,8 mS/cm para miel de mielada y miel de castaño, y mezclas de las mismas. Están exceptuadas de estas exigencias las mieles de madroño (*Arbutus unedo*), argaña (*Erica*), eucalipto, tilo (*Tilia spp*), brezo (*Calluna vulgaris*), (*Leptospermum*), y árbol del té (*Melaleuca spp*) por ser muy variables los valores que presentan.

La medición de conductividad se realizó en una solución de miel, según la técnica IRAM [3], con un conductímetro previamente calibrado. El gráfico de cajas y bigotes de los resultados obtenidos, agrupados por provincia de origen de las muestras se presenta en la Figura 4.5.

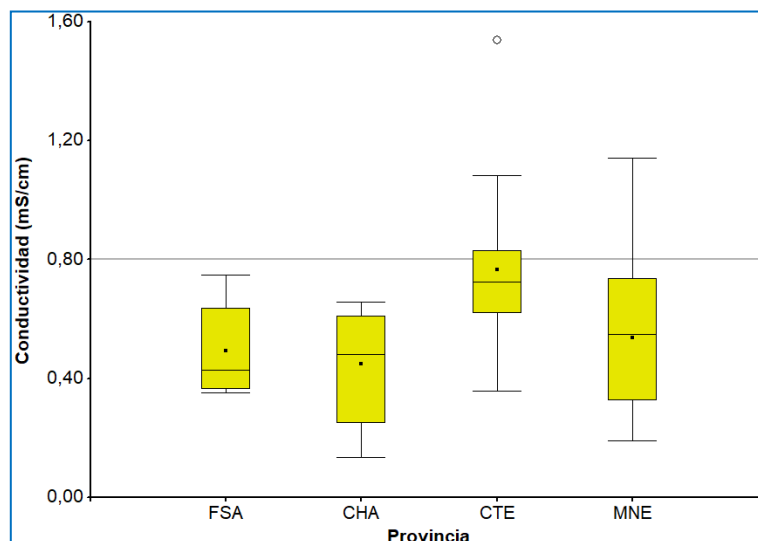


Figura 4.5. Gráfico de cajas y bigotes de Conductividad, agrupadas por provincia de origen.

De la Figura 4.5 se concluye que la mayoría de las mieles estudiadas son mieles de flores, debido a que poseen conductividades inferiores a 0,8 mS/cm. Sólo una minoría, de las

provincias de Misiones y Corrientes, presentan conductividades superiores a 0,8 mS/cm. Esto indicaría que las muestras corresponden a miel de flores de las especies excluidas en el reglamento de la Comunidad Europea, tales como el eucalipto, que es la especie vegetal frecuentemente forestado en ambas provincias.

### 1.3. Contenido de hidroximetilfurfural

El contenido de hidroximetilfurfural (HMF) es un parámetro indicador de frescura de mieles. Valores elevados indicarían sobrecalentamiento del alimento, o almacenamiento inadecuado. Si bien eso no indica inconvenientes para la salud, su valor está regulado tanto en el Código Alimentario Argentino (CAA) [11], como en la Comunidad Europea [2]. Para la comercialización de miel para consumo directo se permite un máximo de 40 mg/kg de miel, por lo cual, las que superen el valor de dicho límite deben ser comercializadas para usos industriales (fabricación de productos alimenticios).

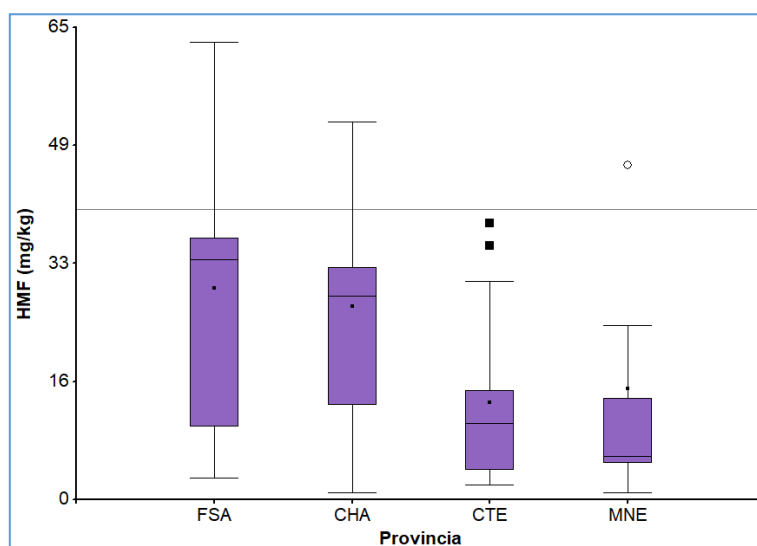


Figura 4.6. Gráfico de cajas y bigotes de HMF, agrupadas por provincia de origen.

En la Figura 4.6 se visualiza que la mayoría de las muestras presentan valores inferiores al límite máximo establecido por las reglamentaciones, y que las cuatro provincias tienen gran variabilidad en los valores de HMF (gran distancia intercuartil).

## 2. Determinación multielemental mediante espectroscopía atómica

La concentración de 40 elementos en muestras de miel fue determinada por dos técnicas de espectroscopía atómicas, seleccionadas de acuerdo a sus prestaciones y rangos de concentraciones de analitos para las que resultan apropiadas. Espectrometría de absorción atómica (para Na, K y Mg), y espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para los demás elementos que se encuentran a niveles de vestigios o ultratraza.

Para la cuantificación de las concentraciones de cada elemento en las muestras, se confeccionaron rectas de calibración externa a partir de soluciones estándar preparadas por triplicado y empleando 5 niveles de concentración. En el caso de las determinaciones por AAS, se realizaron curvas de calibración de 1 a 100 mg/L para K, Na y Mg, utilizando soluciones monoelementales marca Perkin-Elmer Atomic Spectroscopy Calibration Standards. Para las determinaciones por ICP-MS se realizaron curvas de calibración de 1 a 100 µg/L preparando diluciones a partir de soluciones multielementales: I) Solución estándar 2 (10 µg/mL Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Th, Tm, Y e Yb en 5% HNO<sub>3</sub>) y II) Solución multielemental estándar 3 (10 µg/mL de Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, Zn, U y V en 5% HNO<sub>3</sub>), ambas marca PerkinElmer® Plus. Los coeficientes de regresión obtenidos para cada recta de calibración tuvieron un coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$ ) comprendido entre 0,9885 a 0,9979. Estas rectas de calibración fueron luego utilizadas para la cuantificación de estos elementos en las muestras.

Los límites de detección para cada elemento fueron calculados como tres veces la desviación estándar de 11 blancos de análisis [12], que fueron alícuotas de agua ultrapura sometida a los mismos procedimientos de preparación de las muestras, las soluciones blanco se prepararon y analizaron de manera no consecutiva. Los límites de detección calculados para cada elemento por ICP-MS, se resumen en la Tabla 4.2.

---

Tabla 4.2. Límite de detección determinados experimentalmente mediante ICP-MS

Elemento	LD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Tierras raras	LD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Cr	20	Sc	11
Al	12	Y	1,3
Fe	151	La	0,8
Zn	7,1	Ce	0,5
Mn	5,9	Pr	1,1
V	1,9	Nd	1,4
Cu	0,6	Sm	0,4
Ba	3,1	Eu	0,8
Ni	8,8	Gd	1,3
As	5	Tb	0,6
Li	35	Dy	0,5
Be	5	Er	0,9
Co	1,1	Tm	0,8
Tl	1	Yb	0,8
Pb	1,5	Lu	0,6
Ag	0,9	Ho	0,9
Cs	0,5		
Cd	5		
In	7,5		
Bi	1,9		
Se	1,0		

Paralelamente se determinaron los límites de detección de K, Na y Mg por AAS que resultaron en niveles de 1,75, 0,50 y 0,73 mg/kg respectivamente.

Para evaluar la precisión del método para la técnica de ICP-MS, se realizaron lecturas replicadas de la solución multielemental estándar 3 descrita anteriormente. Las mediciones se realizaron en un mismo día de trabajo (repetibilidad) y en distintos días de trabajo con nuevas condiciones de puesta a punto del equipo (reproducibilidad). Se obtuvieron valores inferiores a 5,2% de desviación estándar relativa (RSD) para las mediciones realizadas el mismo día y valores inferiores a 8,5% para la reproducibilidad del método. En el caso de la AAS, se realizó un estudio similar utilizando una solución que contenía los tres elementos estudiados por esta metodología (Na: 15 ppm, K: 15 ppm, Mg: 20 ppm), los resultados

indicaron valores de RSD menores a 6,0% (repetibilidad) y menores a 8,2% (reproducibilidad). En base a estos resultados, se puede afirmar que la precisión de la metodología propuesta resulta adecuada.

Durante todas las determinaciones realizadas por ICP-MS se trabajó con adición de estándar interno a las muestras, se utilizó Rh a una concentración final de 10 µg/L.

Finalmente, la exactitud del método se determinó mediante adición de estándar externo a 10 muestras seleccionadas al azar y analizadas previamente, como se describió en la sección 3.3.2 del capítulo III. La adición de estándar externo obtuvo un valor promedio de recuperación entre 96,5 a 99,8%. En base a estos resultados se puede afirmar que el pretratamiento aplicado a la muestra y los niveles de exactitud de la técnica analítica optimizada resultan adecuados para la cuantificación de elementos en las muestras problema, desde el punto de vista del porcentaje de recuperación de estos. Paralelamente, para la AAS se realizó también el agregado de estándar externo, obteniéndose valores entre 92,3 a 99,8% de recuperación para los tres elementos determinados por este método, que también se consideran adecuados para la realización de este trabajo.

### 3. Determinación multielemental en las muestras de miel

#### 3.1. Elementos minoritarios

La Tabla 4.3 presenta los resultados correspondientes a los análisis de elementos minoritarios (concentraciones > 1 ppm) realizados por AAS (Shimadzu® 6600). Al igual que en los resultados de los parámetros fisicoquímicos se utilizaron estimadores de distribución estadística no paramétricos (mediana y rango) debido a que la serie de resultados no cumple con el supuesto de normalidad. Los elementos determinados (K, Na y Mg) se encontraron a niveles detectables en todas las muestras estudiadas.

---

Tabla 4.3. Concentración de elementos minoritarios determinados en muestras de miel de provenientes de las provincias del NEA

Elemento (mg/kg)		Formosa	Chaco	Corrientes	Misiones
<b>Potasio</b>	Mediana	794	1041	1422	982
	Min – Máx	543 – 1598	463 – 1375	770 – 3241	141 – 2948
<b>Sodio</b>	Mediana	34	11	14	20
	Min – Máx	1 – 170	9 – 16	2 – 138	6 – 58
<b>Magnesio*</b>	Mediana	42	42	84	47
	Min – Máx	24 – 119	34 – 64	26 – 133	11 – 118

\*Determinados mediante GF-AAS

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) considera que son 14 los principales minerales en el cuerpo humano [13]; de los elementos cuantificados en las muestras de miel, potasio, sodio, magnesio, hierro, zinc y manganeso están en ese grupo que menciona la FAO. El sodio y el potasio están presentes como sales en los líquidos corporales, donde tienen la función fisiológica de mantener la presión osmótica (junto con el cloro).

Desde el punto de vista de los elementos minoritarios el potasio resultó ser el elemento más abundante, como era esperable para la miel de origen floral; los niveles determinados en este trabajo resultaron superiores a los valores publicados en otros estudios de mieles argentinas y otros países [14, 17]. Con respecto al sodio, los valores de concentración aquí reportados se encuentran a niveles similares a esos mismos estudios, excepto en mieles reportadas por Chua y colaboradores [16], quienes encontraron mayores concentraciones de sodio en mieles provenientes de Malasia. Respecto de los niveles de Mg, las muestras se encontraron a niveles similares a otras mieles de origen floral de diferentes partes del mundo [18, 20].

El Mg es un mineral esencial que participa en la formación y mantenimiento de huesos, en el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos, y desempeña un papel importante en

las contracciones neuromusculares, y además activa muchas enzimas esenciales. Casi todas las dietas contienen adecuado magnesio alimentario, pero en ciertas circunstancias hay pérdidas excesivas de magnesio corporal, que pueden llevar a debilidad y cambios mentales y en ocasiones a convulsiones. Al consumir 20 g de miel, se estaría incorporando menos del 0,5% de lo que recomienda la FAO (300 mg/día de ingesta diaria) para el Mg, por lo cual su contribución no es significativa para este mineral al consumir este alimento. Finalmente, se presentan en forma gráfica en la Figura 4.7 y 4.8, utilizando gráficos de cajas y bigotes los resultados obtenidos para estos tres elementos.

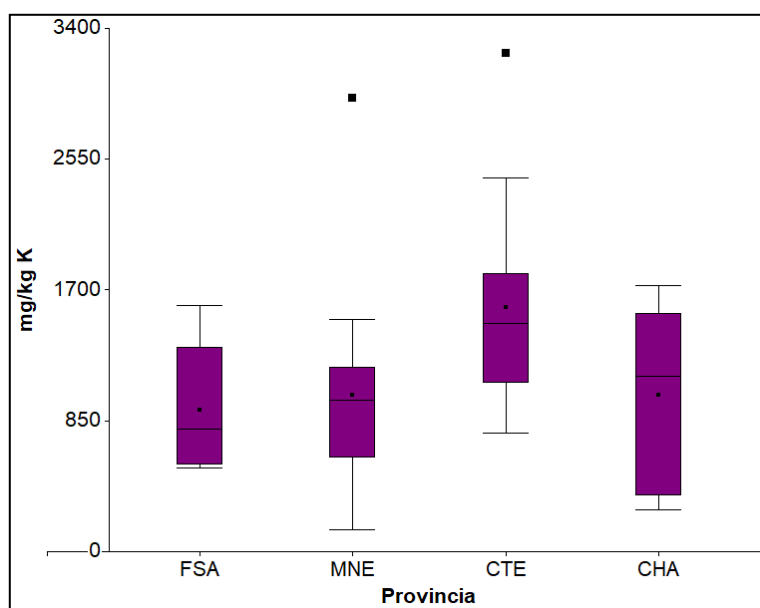


Figura 4.7. Gráfico de cajas y bigotes de K, discriminado por provincia de origen.



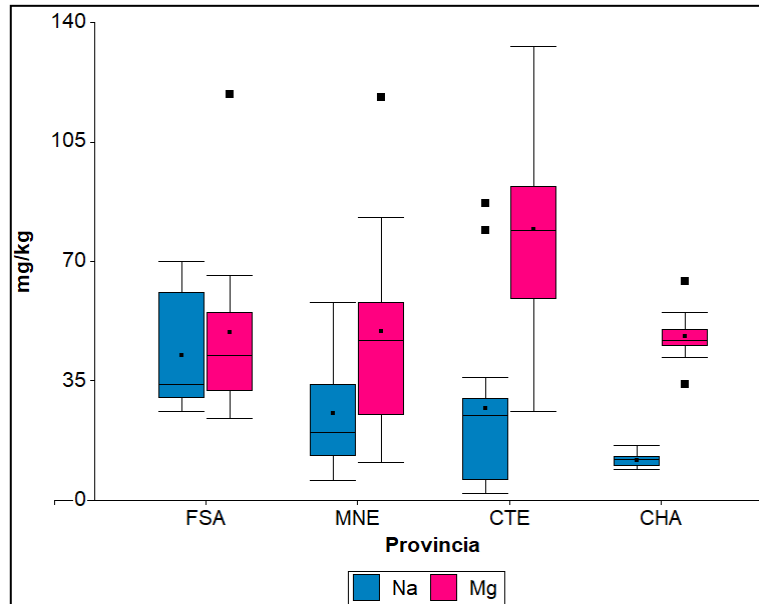


Figura 4.8. Gráfico de cajas y bigotes de Na y Mg, discriminado por provincia de origen.

Según se observa en ambas figuras, existen diferencias en los niveles medios de los elementos minoritarios, lo que indicaría que existe la posibilidad de diferenciar las muestras de acuerdo a su origen geográfico.

### 3.2. Elementos a nivel de vestigios

En la Tabla 4.4. se muestran los resultados de los minerales que se encuentran en el orden de los  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de miel, que fueron determinadas en el equipo de ICP-MS Perkin-Elmer SCIEX, ELAN DRC-e.

Tabla 4.4. Concentración de elementos a nivel de vestigios determinados en muestras de miel de provenientes de las provincias del NEA

Elemento		Formosa	Chaco	Corrientes	Misiones
<b>Cromo [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	8,3	5,4	7,6	8,5
	<i>Min – Máx</i>	4,4 – 13,5	3,9 – 7,9	3,5 – 24,3	3,9 – 32,9
<b>Aluminio [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	3,6	2,7	3,9	5,4
	<i>Min – Máx</i>	1,2 – 6,7	0,8 – 4,6	1,3 – 11,1	1,5 – 10,1
<b>Hierro [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	1,9	2,5	1,6	6,4
	<i>Min – Máx</i>	<0,2 – 3,9	<0,2– 10,1	<0,2 – 6,4	<0,2 – 31,1
<b>Cinc [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	1,6	2,7	1,2	2,8
	<i>Min – Máx</i>	0,2 – 5,5	0,4 – 16,5	0,2 – 3,7	0,4 – 4,9
<b>Manganeso [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	0,6	0,7	3,5	4,0
	<i>Min – Máx</i>	0,1 – 1,6	0,1 – 1,4	0,1 – 19,1	0,3 – 21,7
<b>Vanadio [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	0,4	0,8	2,2	0,2
	<i>Min – Máx</i>	0,02 – 1438	0,005 – 3941	0,002 – 3530	0,02 – 0,8
<b>Cobre [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	0,2	0,2	0,3	0,6
	<i>Min – Máx</i>	0,03 – 0,6	0,02 – 0,3	0,04 – 0,8	0,06 – 1,8
<b>Bario [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	0,1	0,1	0,9	0,8
	<i>Min – Máx</i>	0,005 – 0,6	<0,003 – 0,4	<0,003 – 6,0	0,045 – 4,0
<b>Níquel [mg/kg]</b>	<i>Media</i>	0,09	0,10	0,19	0,32
	<i>Min – Máx</i>	0,016 – 0,3	<0,009 – 0,3	<0,009 – 0,8	0,022 – 0,8
<b>Arsénico [µg/kg]</b>	<i>Media</i>	10	13	8	7
	<i>Min – Máx</i>	1 – 13	2 – 20	2 – 12	1 – 11
<b>Litio [µg/kg]</b>	<i>Media</i>	43	35	52	<35
	<i>Min – Máx</i>	<35 – 73	<35 – 45	<35 – 190	
<b>Berilio [µg/kg]</b>	<i>Media</i>	5	55	100	<5
	<i>Min – Máx</i>	<5 – 14	<5 – 302	<5 – 334	<5 – 25

<b>Cobalto [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	10	5	14	14
	<i>Min – Máx</i>	1 – 21	<1 – 18	1 – 41	<1 – 36
<b>Talio [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	7	2	9	5
	<i>Min – Máx</i>	<1 – 18	<1 – 16	<1 – 15	<1 – 14
<b>Plomo [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	2	6	7	8
	<i>Min – Máx</i>	<2 – 4	<2 – 10	<2 – 15	2 – 14
<b>Plata [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	6	5	6	21
	<i>Min – Máx</i>	<1 – 37	<1 – 26	<1 – 19	<1 – 53
<b>Cesio [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	6	1	24	27
	<i>Min – Máx</i>	<1 – 52	<1 – 4	<1 – 205	<1 – 92
<b>Cadmio [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	5	< 5	11	8
	<i>Min – Máx</i>	<5 – 15		<5 – 20	<5 – 19
<b>Indio [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	46	< 8	32	167
	<i>Min – Máx</i>	<8 – 226		<8 – 339	<8 – 1216
<b>Bismuto [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	4	< 2	2	11
	<i>Min – Máx</i>	<2 – 12	<2 – 9	<2 – 20	<2 – 63
<b>Selenio [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>	<i>Media</i>	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

La FAO considera que los minerales a nivel de vestigio de mayor importancia en la nutrición humana son el hierro, cobre, cromo, cobalto, selenio y zinc. Sin embargo, la miel de abejas no es considerado un alimento capaz de realizar un aporte mineral significativo. Así, si se considera una ingesta diaria de 20 g de miel por día (una cucharada), corresponde a un aporte de aproximadamente 80  $\mu\text{g}$  de hierro y 50  $\mu\text{g}$  de zinc. La dosis recomendada de hierro es de 20 mg al día, y la de zinc 15 mg al día, por lo que al consumir una cucharada de miel al día se cubre menos que 1% de lo recomendado.

El hierro sirve como transportador de oxígeno hacia los tejidos desde los pulmones por medio de la hemoglobina, y además es un componente importante de sistemas enzimáticos. En cuanto a las concentraciones de hierro hallados son similares a los publicados por otros investigadores [14, 21, 22]. En la Figura 4.9 se resumen los resultados en gráficos de cajas y bigotes, tanto del hierro como del cromo.

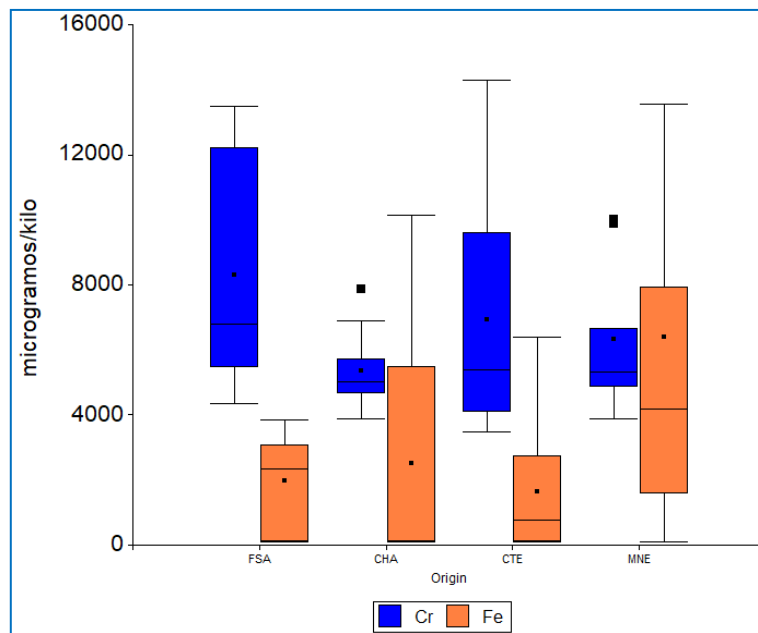


Figura 4.9. Gráfico de cajas y bigotes de Cr y Fe discriminado por provincia de origen.

El cromo es un elemento traza esencial que participa en el metabolismo de la insulina y como cofactor de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa, considerándose una dosis segura y recomendada entre 50 y 200 µg por día. Si se considera la media de todas las muestras estudiadas (6,7 mg/kg), al consumir una cucharada de miel se estaría dentro del rango de ingesta segura de este mineral. En este trabajo se hallaron valores de cromo mayores que los encontrados en mieles de Turquía [17], Polonia [23], Brasil [24] y Argentina [20, 24].

Por otra parte, el zinc desempeña un papel vital en muchas reacciones bioquímicas como síntesis y degradación de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas, entre otros. Se puede

mencionar que las concentraciones de zinc y manganeso determinados fueron similares a las halladas por Yücel y Sultanoğlu [17], y se muestran resumidas en la Figura 4.10.

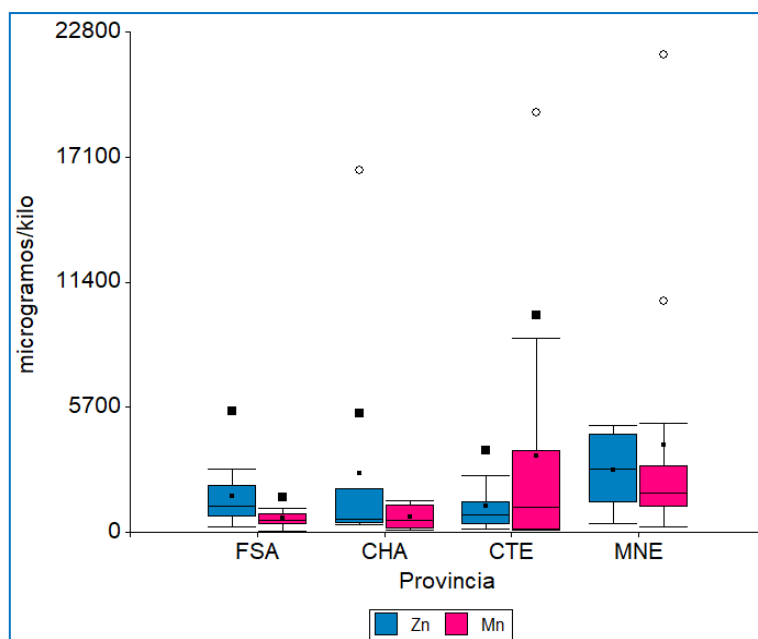


Figura 4.10. Gráfico de cajas y bigotes de Zn y Mn discriminado por provincia de origen.

El manganeso es un cofactor importante en la producción de glicosaminoglicanos, compuestos que constituyen los tejidos conectivos, huesos, arterias y otros órganos. Los valores de las medias de las provincias de Corrientes y Misiones son similares a un trabajo brasileño [24], y las medias de todas las provincias son inferiores a una investigación con mieles de Malasia [16].

Desde el punto de vista nutricional los elementos cobalto, cobre y zinc son elementos que se encuentran a nivel de vestigios en los alimentos y que son considerados esenciales. El consumo diario de 20 g de las mieles estudiadas aportaría una contribución menor al mg de elemento al día.

Si se comparan los resultados obtenidos con valores de concentraciones de elementos a nivel de vestigios en mieles argentinas proveniente de otras provincias publicados en la bibliografía, se encuentra que Conti y colaboradores [21] investigaron la composición mineral

de cinco muestras de miel de Argentina y publicaron valores inferiores para los elementos vanadio, níquel, plomo, arsénico y talio. Por otro lado, las concentraciones de hierro, lantano y samario determinadas en las cuatro provincias de esta tesis resultaron inferiores a las reportadas por Pellerano y colaboradores [25], quienes estudiaron mieles multiflorales de las provincias de La Pampa y San Luis. Adicionalmente, dicho trabajo publica valores inferiores de cesio y similares de cobalto a los de esta tesis. Comparando resultados con países limítrofes, Batista y colaboradores [24] publican valores similares de níquel, en muestras de Brasil, aunque hallan menores concentraciones de arsénico, cadmio, cobalto, cobre y plomo; y mayores concentraciones de bario que los hallados en este trabajo de tesis.

En general la mayoría de los elementos inorgánicos en los alimentos a partir de ciertos niveles establecidos pueden ser considerados como elementos tóxicos. De los elementos estudiados en esta tesis pudieron detectarse a niveles cuantificables, los elementos plomo, aluminio, cadmio, arsénico, talio y bario [13]. Los elementos arsénico, cadmio, plomo, mercurio, y estaño tienen especificados los límites máximos de ingesta diaria admitidos en distintos alimentos [25, 26]. El principio básico de toxicidad se da cuando se produce un desequilibrio de elementos vitales, éstos son siempre reemplazados por metales tóxicos en los sitios de enlace de las enzimas y en los sistemas enzimáticos. Por ejemplo, el plomo reemplaza el calcio; el cadmio reemplaza al zinc; el aluminio puede reemplazar el magnesio y el manganeso.

### 3.3. Tierras raras

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados de los elementos conocidos comúnmente como “tierras raras”, que fueron también determinados en el equipo de ICP-MS Perkin-Elmer SCIEX, ELAN DRC-e.

---

Tabla 4.5. Tierras raras determinadas en muestras de miel de provenientes de las provincias del NEA

<i>Elemento (µg/kg)</i>		<i>Formosa</i>	<i>Chaco</i>	<i>Corrientes</i>	<i>Misiones</i>
<b>Escandio</b>	<i>Media</i>	660,6	1485,9	835,1	419,7
	<i>Min – Máx</i>	73,6 – 1439,2	68,5 – 7114,4	77,1 – 6056,9	70,2 – 1147,4
<b>Ytrio</b>	<i>Media</i>	<1,3	<1,3	1,3	3,3
	<i>Min – Máx</i>	<1,3 – 3,3	<1,3 – 2,1	<1,3 – 3,3	<1,3 – 9,4
<b>Lantano</b>	<i>Media</i>	3,6	1,8	3,1	10,2
	<i>Min – Máx</i>	<0,8 – 10,6	<0,8 – 4,2	<0,8 – 19,3	<0,8 – 39,9
<b>Cerio</b>	<i>Media</i>	5,2	2,4	3,3	14,2
	<i>Min – Máx</i>	<0,5 – 15,5	0,8 – 5,4	<0,5 – 10,7	<0,5 – 40,8
<b>Praseodimio</b>	<i>Media</i>	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1
	<i>Min – Máx</i>			<1,1 – 1,6	<1,1 – 2,7
<b>Neodimio</b>	<i>Media</i>	1,5	1,4	2,5	4,7
	<i>Min – Máx</i>	<1,4 – 5,8	<1,4 – 3,9	<1,4 – 5,6	<1,4 – 12,2
<b>Samario</b>	<i>Media</i>	<0,4	0,6	1,3	0,8
	<i>Min – Máx</i>	<0,4 – 0,9	<0,4 – 3,7	<0,4 – 3,4	<0,4 – 2,9
<b>Europio</b>	<i>Media</i>	< 0,8	< 0,8	1,8	< 0,8
	<i>Min – Máx</i>		<0,8 – 1,2	<0,8 – 20,9	<0,8 – 0,9
<b>Gadolinio</b>	<i>Media</i>	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3
	<i>Min – Máx</i>		< 1,3 – 2,6	< 1,3 – 3,6	< 1,3 – 1,9
<b>Terbio</b>	<i>Media</i>	< 0,6	< 0,6	0,5	< 0,6
	<i>Min – Máx</i>		< 0,6 – 1,8	< 0,6 – 2,0	
<b>Disproso</b>	<i>Media</i>	< 0,5	< 0,5	0,8	< 0,5
	<i>Min – Máx</i>		< 0,5 – 2,3	< 0,5 – 2,9	< 0,5 – 1,3
<b>Erbio</b>	<i>Media</i>	< 0,9	< 0,9	< 0,9	< 0,9
	<i>Min – Máx</i>		< 0,9 – 2,1	< 0,6 – 2,0	

<b>Tulio</b>	<i>Media</i>	< 0,8	1,0	1,8	< 0,8
	<i>Min – Máx</i>		< 0,8 – 6,8	< 0,8 – 6,3	
<b>Iterbio</b>	<i>Media</i>	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8
	<i>Min – Máx</i>		< 0,8 – 1,5	< 0,8 – 1,7	

Los valores de las medianas hallados para los elementos Ho y Lu fueron menores a los límites de detección en todas las muestras, por lo cual están ausentes en la Tabla 4.5.

En general los elementos considerados tierras raras poseen un rol menor o desconocido desde el punto de vista fisiológico, tanto para plantas como animales. Por esta razón se asumen que los mismos son transportados de forma pasiva de un compartimiento a otro en el ambiente, y que su concentración en los alimentos depende principalmente de su abundancia natural en la región estudiada [28].

Mieles brasileñas estudiadas por ICP-MS, reportaron valores similares a los determinados en las muestras estudiadas para los elementos erbio e iterbio [29]. Además, si se comparan los valores de cerio, tienen valores no muy alejados respecto a los de la provincia de Misiones. En cambio, los valores de lantano encontrados en estas muestras de Argentina fueron menores a las de Brasil, excepto para las muestras de Misiones. Además, en esta tesis las concentraciones de gadolinio y neodimio fueron menores que las muestras brasileñas. En cuanto al elemento europio no pudo ser detectado en la mayoría de las muestras, sin embargo, en algunas muestras de la provincia de Corrientes si pudo cuantificarse, determinándose a niveles superiores que las muestras brasileñas.

#### 4. Análisis multivariado

Una vez obtenido los resultados multielementales y fisicoquímicos que permitieron caracterizar las muestras, los mismos fueron analizados mediante la aplicación de técnicas de

---



análisis estadístico multivariado. Los resultados obtenidos se presentan en dos secciones, la primera corresponde a muestras recolectadas en las diferentes cuencas productoras de la *Provincia de Corrientes* en las *campañas 2011-2012*, y la segunda corresponde a muestras recolectadas en todo el territorio de las *provincias correspondiente a la región NEA* en las *campañas 2015-2016*.

#### 4.1. Muestras de la Provincia de Corrientes (campañas 2011-2012)

Durante las campañas 2011-2012 se recolectaron 141 muestras provenientes de cuatro cuencas melíferas de la provincia de Corrientes. Estas muestras se caracterizaron mediante la determinación de nueve parámetros fisicoquímicos: humedad, color, pH, conductividad eléctrica, HMF, prolina, diastasa, azúcares reductores y sacarosa aparente mediante la aplicación de técnicas estándar de análisis de mieles [3, 28, 29]. El objeto del análisis fue caracterizar las diferentes muestras y profundizar en el estudio para establecer parámetros que permitan predecir la cuenca productora de origen donde fueron recolectadas las muestras. Las cuencas productoras en las que se encuentra dividida la provincia pueden consultarse en [32]. Las cuencas consideradas en este trabajo fueron: Bella Vista (BV), Corrientes Capital (CT), Goya (GY) y Monte Caseros (MC).

Para el análisis multivariado de las muestras, en primera instancia se utilizó una técnica de reducción de variables, análisis de componentes principales (ACP) con el objeto de realizar una primera aproximación a la distribución de muestras en el espacio multidimensional, además de explorar posibles correlaciones entre las variables analizadas. Los resultados obtenidos del ACP se pueden observar en las Figuras 4.11 (gráfico de loadings) y Figura 4.12 (gráfico de scores).

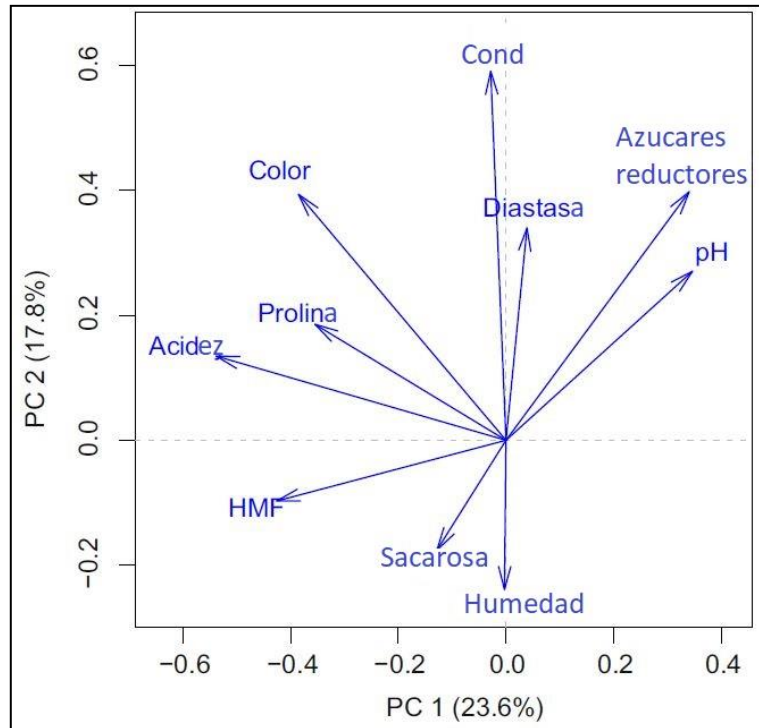


Figura 4.11. Gráfico de Loadings, proyectado en Componente Principal 1 (PC1) vs Componente Principal 2 (PC2).

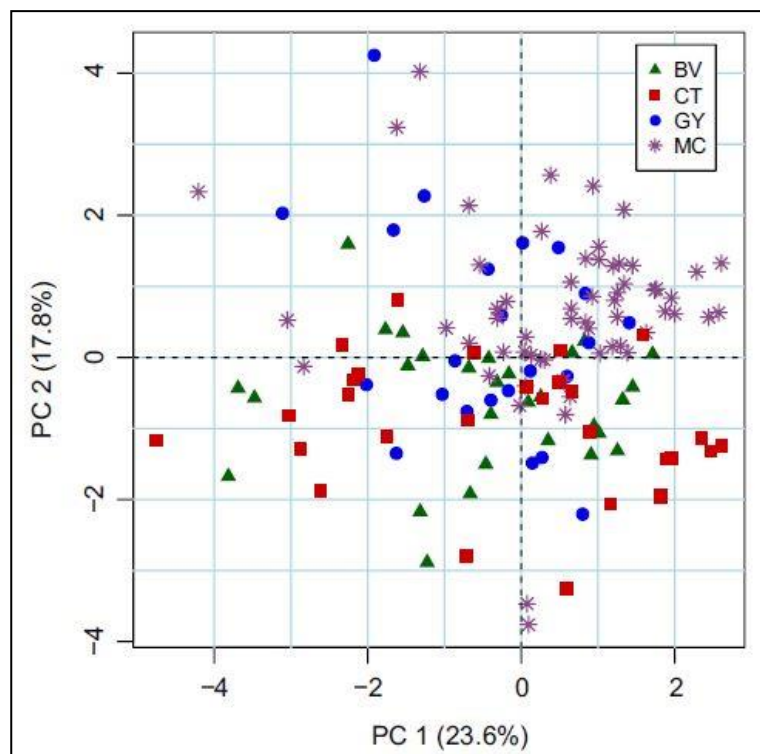


Figura 4.12. Gráfico de Scores Componente Principal 1 (PC1) vs Componente Principal 2 (PC2). BV: Bella Vista, CT: Corrientes, GY: Goya, MC: Monte Caseros

Para la elaboración de los gráficos se utilizaron las dos primeras componentes principales (PCs), donde las muestras se encuentran identificadas según la cuenca apícola de origen. Las dos primeras PCs retienen un 41,4% de la variabilidad total en los datos, que es un valor considerado aceptable para la primera representación de la distribución de muestras en el espacio de dimensiones reducidas. Los porcentajes de varianza retenidos por las siguientes componentes fueron inferiores al 15% (PC3: 14%, PC4:11%, otros).

Según se observa en la Figura 4.11, la PC2 se encuentra positivamente correlacionada con los valores de Conductividad y en menor grado con Diastasa, esta misma componente se encuentra correlacionada negativamente con los valores de humedad. Si bien se observa una fuerte correlación con estas variables, al analizar el gráfico de scores se observa que, si bien no se observan agrupamientos en los scores proyectados sobre PC2, todas las muestras provenientes de la cuenca MC presentaron valores positivos, indicando elevados valores de conductividad y diastasa, a la vez bajos niveles de humedad. Con respecto a la PC1, se encuentra positivamente correlacionada con el pH de las muestras, y negativamente con la acidez de las mismas y los contenidos de HMF. En el caso de esta variable la superposición entre grupos de procedencia es aún mayor que en el primer caso, sin embargo, la combinación de ambas variables permite observar una cierta tendencia en las muestras a formar grupos, lo que indica que existe la posibilidad de aplicar técnicas supervisadas con el objeto de generar modelos predictivos. Así, se observa que las cuencas BV y CT están mayoritariamente caracterizadas por valores negativos en PC2, correspondiente a alta contribución de los valores de humedad, HMF y sacarosa. La cuenca MC está caracterizada por valores positivos tanto de PC1 como de PC2. Esto se corresponde con alta contribución de conductividad eléctrica, azúcares reductores y pH. Adicionalmente, en el gráfico de scores se observa que CT y MC se encuentran claramente separados, pero BV y CT se encuentran solapados. Las muestras provenientes de la cuenca GY está parcialmente solapada a la de CT

y MC. Esto podría asociarse con un cambio gradual de norte a sureste en las condiciones ambientales que se traducen en cambios graduales en los parámetros fisicoquímicos. Las cuencas vecinas geográficamente se presentan más superpuestas, además, de que CT y BV pertenecen a la misma región fitogeográfica.

Una vez concluido el análisis exploratorio de la matriz de resultados mediante ACP, se inició la propuesta de un modelo clasificatorio de las muestras de acuerdo con su origen geográfico. El análisis clasificatorio se abordó mediante el uso de una herramienta muy valorada debido principalmente a su interpretabilidad, denominada análisis lineal discriminante (ALD). Esta propiedad permite que además de obtener información sobre la capacidad del método para clasificar muestras problema, se obtenga también información relacionada a las causas o razones que permiten diferenciar a las muestras. El arreglo matricial de los resultados se dispuso de forma que la variable a modelar fue el origen geográfico (cuencas apícolas), conteniendo cuatro grupos, y las variables cuantitativas consideradas para el cálculo de las funciones discriminantes (LDs) fueron los nueve parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras. El método ALD se aplicó utilizando un algoritmo capaz de seleccionar las variables de mayor importancia de acuerdo a su capacidad discriminante. El algoritmo seleccionó cinco variables: humedad, color, conductividad, pH y HMF para lograr una clasificación similar a la que se obtiene con todos los parámetros. La Figura 4.13 muestra la proyección de las muestras en el espacio generado por las dos primeras funciones LDs.

---

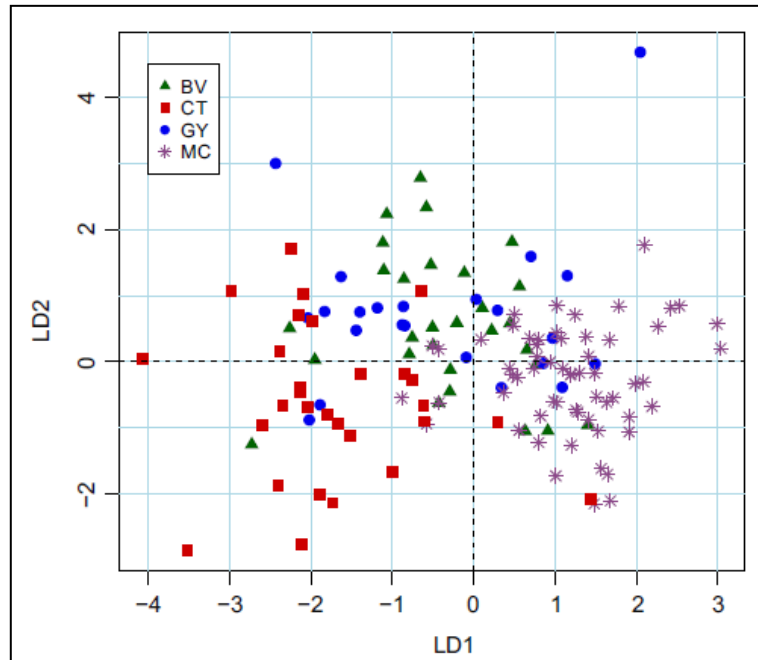


Figura 4.13. Proyección de las muestras en el espacio generado por las dos primeras discriminantes lineales: LD1 vs LD2. BV: Bella Vista, CT: Corrientes, GY: Goya, MC: Monte Caseros

Si bien se observa un gran solapamiento de las muestras de las distintas cuencas apícolas, se logró alcanzar un porcentaje de muestras correctamente clasificadas de 66%. Dicho valor puede ser considerado satisfactorio si se tiene en cuenta que solamente se consideraron solamente 5 parámetros fisicoquímicos como fuente de información para caracterizar a las muestras. El gran solapamiento entre grupos demuestra que las mieles producidas en la Provincia de Corrientes presentan características similares independientemente de la cuenca apícola de origen. Esto posiblemente debido a que las cuencas productoras de la provincia de Corrientes han sido definidas de acuerdo a criterios político-comerciales, sin tener en cuenta las ecorregiones de origen de las mieles.

Finalmente, con el objeto de comprobar la homogeneidad entre muestras producidas en la provincia de Corrientes, se realizó un ACP en una nueva matriz de datos obtenida al incorporar los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados en 18 muestras de miel producidas en la provincia de Formosa. La Figura 4.14 muestra la proyección de las muestras en el espacio generado por las dos primeras PCs, donde se observa claramente una gran separación entre

las muestras provenientes de la provincia de Corrientes respecto de las muestras de Formosa. Esta gran separación se corresponde a que las mieles producidas en la provincia de Formosa corresponden a la ecorregión *Gran Chaco*, que posee características fitogeográficas diferentes a las ecorregiones presentes en la provincia de Corrientes, *Esteros del Iberá*, *Malezas y Pastizales* y *Espinal* [35]

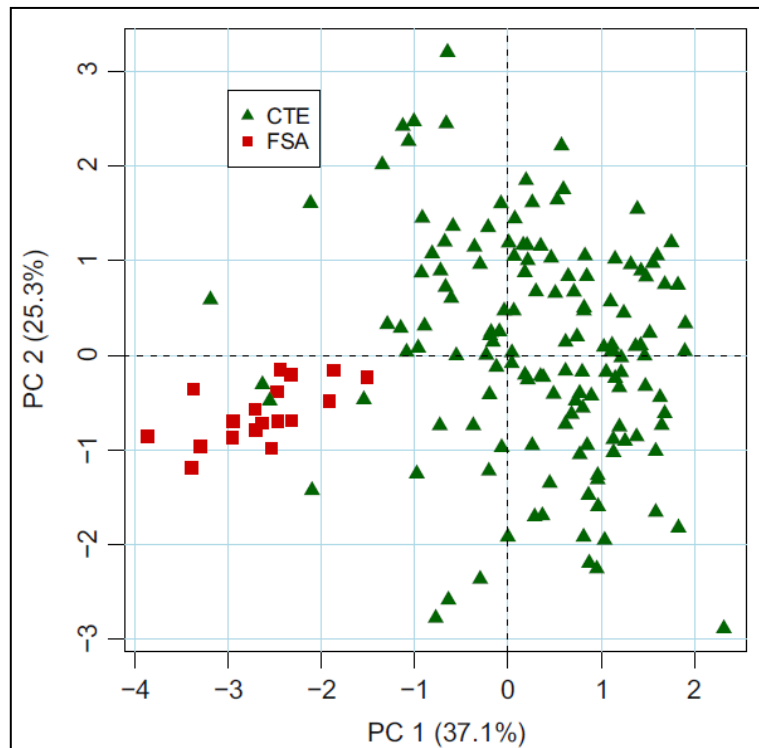


Figura 4.14. Análisis de componentes principales: distribución de las muestras de Corrientes (CTE) y Formosa (FSA).

#### 4.2. Muestras del Nordeste Argentino (campañas 2015-2016)

Durante las campañas 2015-2016 se recolectaron muestras de todo el territorio correspondiente a las cuatro provincias que forman parte del Nordeste Argentino: Formosa (FSA), Chaco (CHA), Corrientes (CTE) y Misiones (MNE). Se seleccionaron puntos representativos de las principales cuencas apícolas. Se estudiaron un total de 50 muestras compuestas determinándose 37 elementos minerales a nivel de vestigios utilizando ICP-MS, más tres elementos minoritarios por AAS y cinco parámetros fisicoquímicos. Los resultados

obtenidos se analizaron mediante el uso de técnicas de análisis multivariado con el objeto de explorar la presencia de posibles correlaciones en los datos, además de proponer modelos predictivos de origen geográfico de las mieles. En primer término, se analizaron los resultados obtenidos de los análisis multielementales y posteriormente, a fin de mejorar la capacidad predictiva de los modelos propuestos, se realizó una fusión de datos fisicoquímicos a la matriz de datos multielementales. La fusión de datos permite agregar información complementaria para mejorar la fiabilidad del modelo predictivo propuesto.

#### 4.2.1. Análisis multielemental

Partiendo de un arreglo matricial de los resultados conteniendo 50 filas (muestras) y 40 columnas, se realizó inicialmente un análisis exploratorio usando la técnica ACP con el objeto de observar la distribución de las muestras y correlaciones entre variables en un espacio de dimensionalidad reducida.

Previo a la aplicación del ACP, las muestras fueron pretratadas, eliminando las variables que no pudieron ser detectadas en ninguna muestra. De los 40 elementos medidos por espectroscopía atómica, solo pudieron cuantificarse 27 elementos, que fueron los considerados para el análisis. A continuación, se aplicó el procedimiento de autoescalado de variables para evitar problemas de dimensionalidad, dado que las variables (concentraciones elementales) se encuentran medidas a diferentes escalas de concentración [33].

Del análisis ACP se obtuvieron los siguientes resultados expresados de manera gráfica:

*Gráfico de autovalores (scores):* este gráfico permite observar gráficamente la distribución de muestras en el espacio de variables reducidas (Figura 4.15). Se puede observar una gran superposición entre muestras de los diferentes grupos según provincia de origen. Las muestras provenientes de la provincia de MNE muestran una cierta tendencia a diferenciarse del resto agrupándose mayormente en el sector correspondiente a valores positivos de PC1,

sin embargo, estas muestras siguen mostrando un alto grado de superposición con las muestras recolectadas en la provincia de CTE principalmente, posiblemente debido a similitudes en la flora melífera utilizada por las abejas durante las campañas de recolección de muestras. Ambas provincias disponen de amplias superficies forestadas con especies coníferas (pinos, eucaliptos u otros) cuyas inflorescencias son comúnmente utilizadas por las abejas para elaborar la miel.

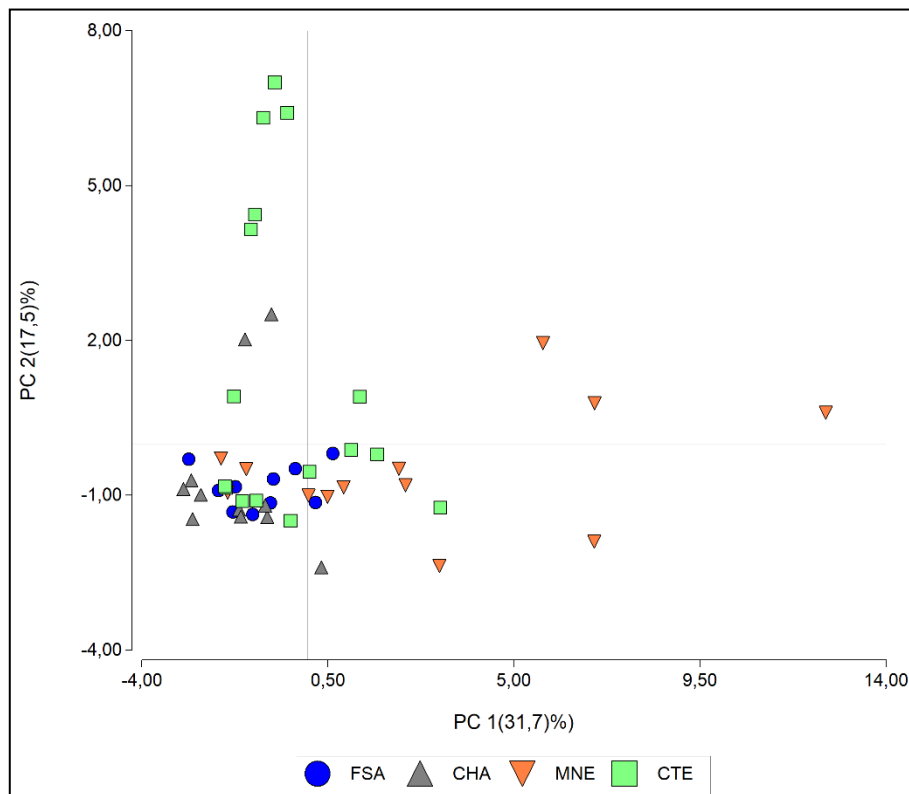


Figura 4.15. Gráfico de scores proyectados en el espacio generado por las dos primeras componentes principales (PC1 vs PC2) obtenidas al analizar la matriz de resultados multielementales

*Gráfico de autovectores (loadings):* la Figura 4.16 muestra el gráfico de loadings en el espacio generado por las dos primeras PCs, este gráfico brinda información respecto de las correlaciones entre las variables utilizadas para la obtención del ACP. Se observa que la PC1 se encuentra positivamente correlacionada con los elementos, Ce, V, Nd y Al; donde también se identifica que las variaciones en las concentraciones de los elementos Y, Co y Ni, están fuertemente correlacionados con la variable Nd, este hecho indica que la información



contenida en la variación de esos elementos puede resumirse considerando solo las variaciones de los contenidos de Nd en las muestras. Adicionalmente se observan fuertes correlaciones positivas entre los elementos Ag y Ce, como así también los elementos Cs y Zn con V. Con respecto a la PC2, esta componente se encuentra positivamente correlacionada con las concentraciones de los elementos Fe, Sc y Be, la información expresada por la PC2 complementa la información resumida por la PC1. En este punto conviene resaltar que elevados valores absolutos en los loadings de un elemento no se refieren a elevados contenidos sino a las variaciones entre muestras resumidas por el ACP.

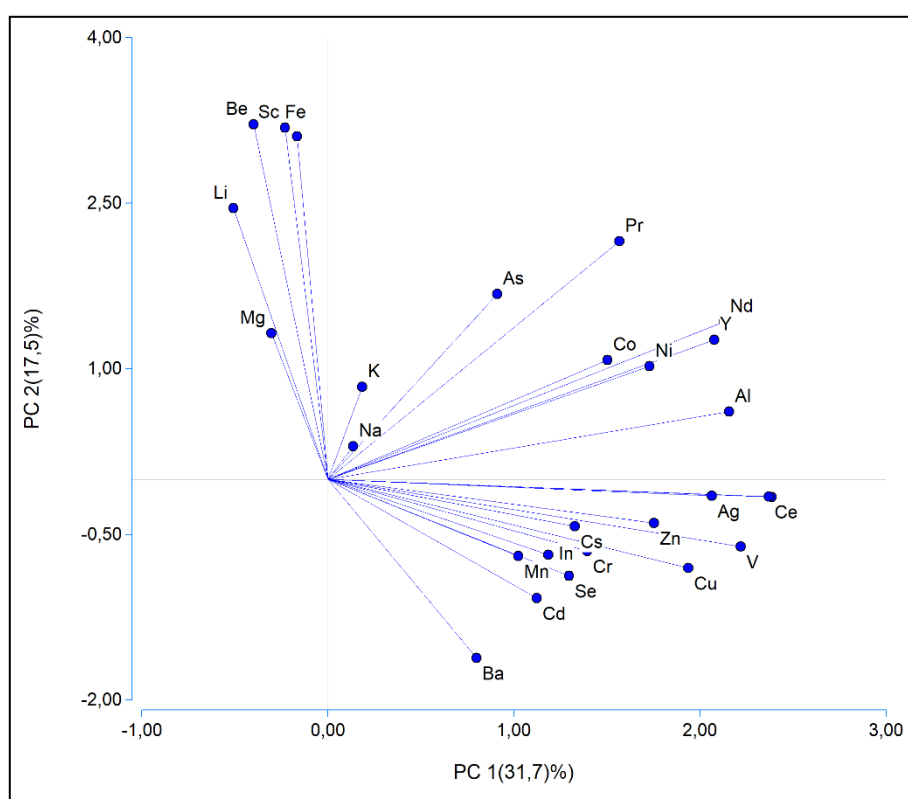


Figura 4.16. Gráfico de loadings correspondiente a las dos primeras componentes principales (PC1 vs PC2) obtenidas al analizar la matriz de resultados multielementales

El ACP permitió observar la distribución de muestras y las correlaciones entre variables en un espacio de dimensionalidad reducida, brindando una primera aproximación a la información contenida en los resultados. Si bien los gráficos de scores obtenidos solo muestran una tendencia parcial en las muestras hacia la formación de agrupamientos (de acuerdo con la

provincia de origen), esta tendencia podría ser suficiente para la propuesta de modelos de clasificación supervisados, dado que estas técnicas se proponen como objetivo maximizar las diferencias entre grupos y minimizar diferencias intragrupo. El ACP por su parte se propone disminuir la dimensionalidad de los datos sin considerar el grupo de pertenencia de cada muestra, tratando de minimizar la pérdida de información como consecuencia de la reducción del número de dimensiones.

Una vez realizado el análisis exploratorio, como parte de los objetivos de este trabajo, se inició la búsqueda y optimización de modelos predictivos de origen geográfico de las muestras basados en la información multielemental. Con el objeto de obtener modelos predictivos se utilizó el método ALD, usando todas las variables disponibles. Esta metodología brinda una respuesta gráfica de igual aspecto e interpretación que el método de ACP, por lo que es un método que resulta muy útil dada su fácil interpretación y posibilidad de reducción de variables consideradas para el análisis. Se obtuvieron los siguientes resultados:

La Figura 4.17 muestra el gráfico de distribución de muestras en el espacio definido por las primeras variables discriminantes (LD1 vs LD2). Se observa que la LD2 diferencia claramente a las muestras provenientes de Misiones (valores negativos) y Corrientes (valores positivos), pero las muestras provenientes de Chaco y Formosa presentan un elevado grado de superposición (confusión), haciendo que sea inaccesible su clasificación correcta.

---

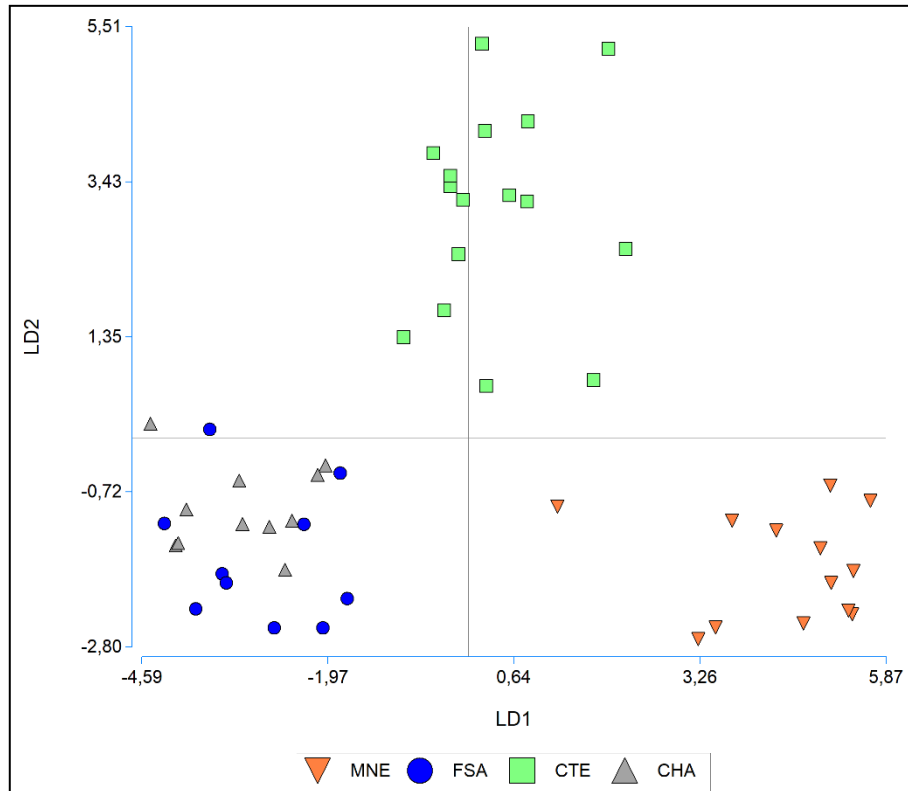


Figura 4.17. Proyección de las muestras en el espacio generado por las dos primeras variables discriminantes lineales.

Esta gran superposición entre las muestras de las provincias CHA y FSA indica una gran similitud en las muestras, haciendo necesario considerar a las muestras provenientes de las provincias de Chaco y Formosa, como formando parte de un mismo grupo para generar modelos predictivos de clasificación. A este nuevo grupo se lo identificó con la sigla FCH.

A continuación, se realizó el análisis ALD considerando tres grupos de origen de las muestras, CTE, MNE y FCH, la proyección de las muestras identificadas de acuerdo al origen geográfico en las dos primeras variables puede observarse en la Figura 4.18.

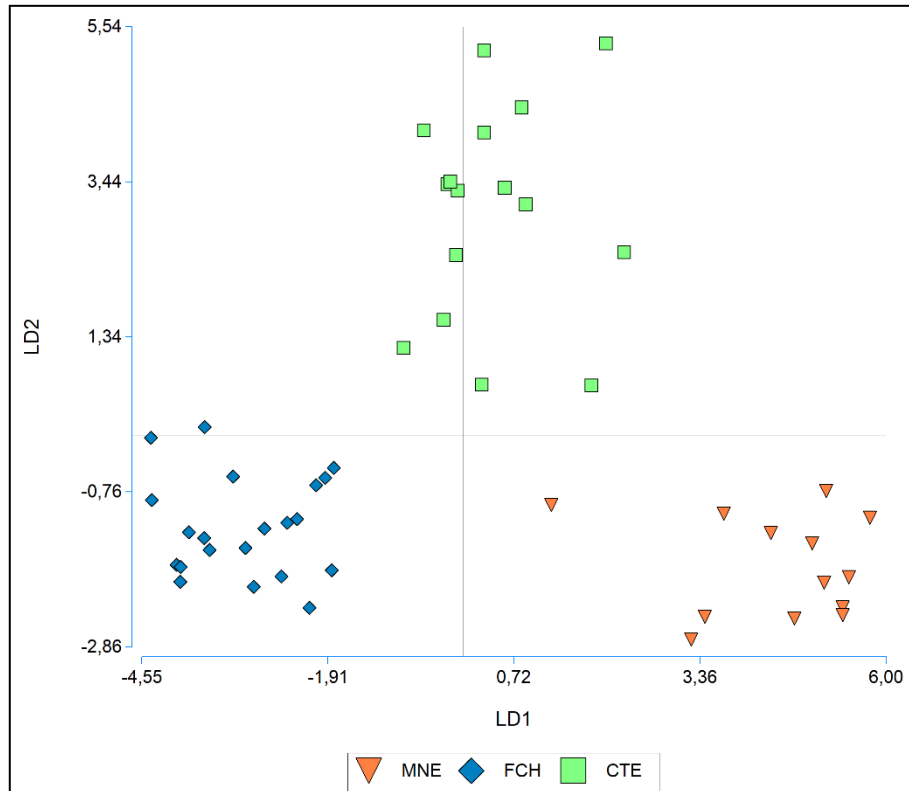


Figura 4.18. . Proyección de las muestras en el espacio generado por las dos primeras variables discriminantes lineales.

Se observa una clara diferenciación en las muestras de acuerdo a la cuenca de origen donde fueron recolectadas, si bien la LD1 es capaz de diferenciar prácticamente la totalidad de las muestras en tres grupos, se hace necesario considerar a LD2 para lograr este objetivo con mayor claridad. Para profundizar en el entendimiento de la estructura de las variables discriminantes, la Tabla 4.6 muestra los coeficientes estandarizados para cada variable. Elevadas correlaciones positivas muestran los elementos Fe, Al y Nd con la LD1, indicando que las muestras de MNE presentaron niveles más elevados de los mismos. Los elementos Cr, Ce y Sc por su parte mostraron elevados coeficientes negativos en LD1, indicando que las muestras del grupo FCH presentaron los valores de concentración más elevados de estos elementos. Finalmente, la LD2 se presenta positivamente correlacionada con los elementos, Zn, Mn, Ce y Sc, y negativamente con Y, y Fe, estas correlaciones junto con el gráfico de proyección de muestras permite afirmar que las muestras provenientes de la provincia de CTE

presentan elevados contenidos de los cuatro primeros elementos y que esta información resulta relevante para poder diferenciarlas.

Tabla 4.6. Coeficientes estandarizados de las variables independientes en las variables discriminantes lineales (DL)

	DL1	DL2		DL1	DL2
<i>Fe</i>	<b>3,55</b>	<b>-2,71</b>	<i>As</i>	-0,06	0,13
<i>Al</i>	<b>2,24</b>	-0,44	<i>Cd</i>	-0,16	0,52
<i>Nd</i>	<b>1,79</b>	-0,6	<i>Pr</i>	-0,24	0,97
<i>Y</i>	0,8	<b>-2,0</b>	<i>Co</i>	-0,32	0,4
<i>Zn</i>	0,75	<b>1,0</b>	<i>Be</i>	-0,64	0,25
<i>In</i>	0,72	-0,06	<i>Li</i>	-0,66	-0,05
<i>Ag</i>	0,5	-0,56	<i>Cu</i>	-0,69	-0,65
<i>La</i>	0,42	0,65	<i>V</i>	-0,79	-0,89
<i>Cs</i>	0,31	0,08	<i>Mn</i>	-0,82	<b>1,18</b>
<i>Ba</i>	0,31	0,57	<i>Ni</i>	-0,94	0,44
<i>Na</i>	0,26	0,07	<i>Cr</i>	<b>-1,1</b>	0,63
<i>Se</i>	0,07	-0,65	<i>Ce</i>	<b>-2,54</b>	<b>1,08</b>
<i>Mg</i>	0,02	0,51	<i>Sc</i>	<b>-3,57</b>	<b>3,86</b>
<i>K</i>	-0,05	0,44			

Los coeficientes se encuentran ordenados de mayor a menor en la primera LD. Coeficientes > 1 se resaltan en negrita.

*Desempeño del modelo discriminante:* la capacidad predictiva del modelo basado en ALD calculado considerando la composición multielemental de las muestras y tres grupos de pertenencia, se realizó utilizando dos metodologías. En primer término, se predijo el grupo de cada una de las muestras utilizadas como entrenamiento como si se tratase de muestras desconocidas. Y en segundo término se evaluó la capacidad predictiva del modelo mediante el método de validación cruzada “dejando uno afuera” (sección 4.2.1 – Capítulo III). El método de validación cruzada “dejando uno afuera” permite estimar el error de predicción evitando el sobreajuste del modelo. Este método de validación, si bien es un método que suele generar predicciones optimistas respecto al desempeño de un modelo clasificatorio, resulta un método robusto para determinar la capacidad predictiva cuando solo se dispone de un número pequeño de muestras [34]. La Tabla 4.7 muestra los resultados obtenidos en forma

de matriz de confusión, de donde pueden estimarse los parámetros de capacidad predictiva del modelo.

*Tabla 4.7. Resultados de la clasificación de las muestras de miel en tres grupos de origen geográfico por ALD.*

<b>Region</b>		<b>Predicción de grupos</b>			<b>Total</b>	
		<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>3,00</b>		
<b>Original</b>	<b>Recuento</b>	<b>FCH</b>	21	0	0	21
		<b>MNE</b>	0	13	0	13
		<b>CTE</b>	0	0	16	16
	<b>%</b>	<b>FCH</b>	100,0	0,0	0,0	100,0
		<b>MNE</b>	0,0	100,0	0,0	100,0
		<b>CTE</b>	0,0	0,0	100,0	100,0
<b>Validación cruzada</b>	<b>Recuento</b>	<b>FCH</b>	20	1	0	21
		<b>MNE</b>	1	11	1	13
		<b>CTE</b>	6	3	7	16
	<b>%</b>	<b>FCH</b>	95,2	4,8	0,0	100,0
		<b>MNE</b>	7,7	84,6	7,7	100,0
		<b>CTE</b>	37,5	18,8	43,8	100,0

Se observa que el 100% de las muestras originales fueron clasificadas correctamente; si bien este hecho aparenta ser un buen resultado, se debe aplicar el método de la validación cruzada para evitar los problemas de sobreajuste. El porcentaje promedio de muestras correctamente clasificadas por validación cruzada alcanzó solamente una proporción valor de 76,0%. Este valor es considerado poco satisfactorio para un modelo predictivo a ser aplicado a futuras muestras problema.

#### 4.2.2. Fusión de datos multielementales y físico-químico

La fusión de datos es el proceso de integración de múltiples datos y conocimientos que representa el mismo objeto de estudio en una representación coherente, precisa y útil. Puede ser categorizado como bajo, intermedio o alto, dependiendo de la etapa en la que la fusión tiene lugar. En este trabajo se realizó una fusión de datos a bajo nivel, que es aquella que utiliza datos en bruto para producir nuevas matrices de datos en bruto. Los objetivos de la fusión de datos son que los datos fusionados pueden ser más informativos y sintéticos que la visualización de las fuentes originales independientemente [34]. En este trabajo se fusionaron la matriz de datos multielementales determinados por AAS e ICP-MS, con la matriz de datos fisicoquímicos en el sentido de las muestras, obteniéndose una matriz fusionada de 50 filas (muestras) × 32 columnas (27 variables elementales + 5 variables fisicoquímicas).

En un inicio para explorar la información presente en la matriz de datos fusionadas se realizó un ACP con la totalidad de los parámetros determinados a las muestras del NEA, las determinaciones fisicoquímicas de calidad de mieles y las concentraciones de todos los elementos. Como se expuso anteriormente el objetivo de la ACP es reducir la dimensión de la matriz de datos perdiendo la menor cantidad de información posible. La Figura 4.19 muestra el gráfico de proyección de scores en el espacio generado por las componentes PC1 vs PC2. Se observa que la varianza resumida por estas dos primeras componentes disminuyó por el agregado de las variables fisicoquímicas (varianza = 43,9%). En cuanto a la distribución de scores identificados de acuerdo con la provincia de origen, se sigue manteniendo escasa la tendencia a agruparse, aunque en este caso se observa una mejora aparente de las muestras provenientes de la provincia de MNE hacia valores positivos en LD1 y valores negativos de la misma variable para las muestras del grupo de dos provincias FCH.

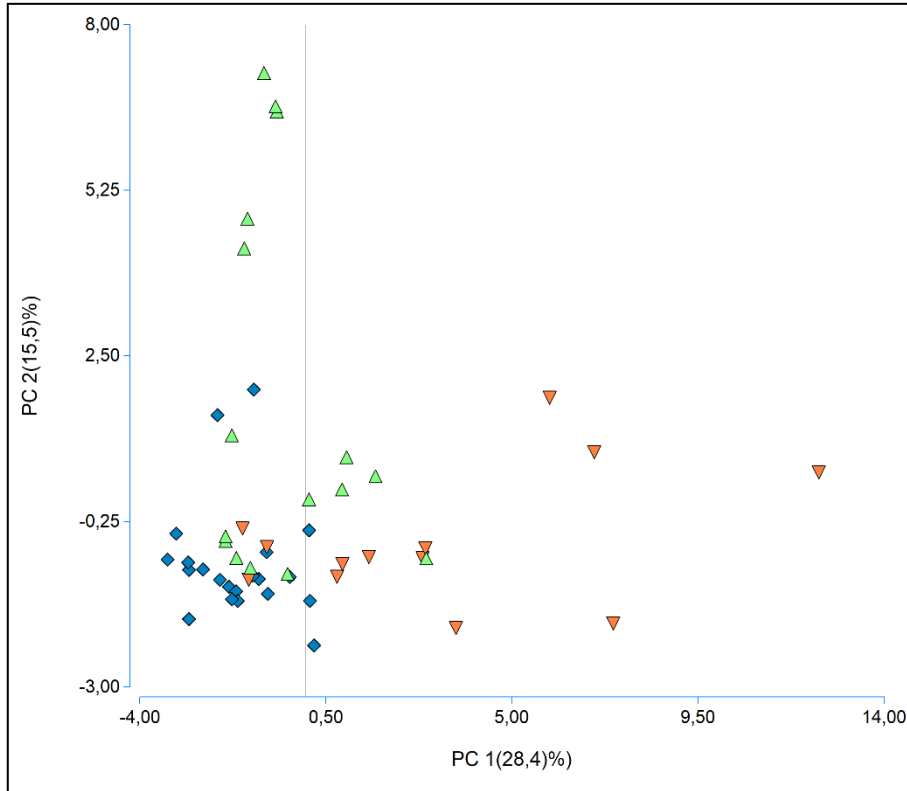


Figura 4.19. Gráfico de scores proyectados en las dos primeras componentes principales (PC1 vs PC2) obtenidas al analizar la matriz fusionada de resultados multielementales y parámetros fisicoquímicos.

Con respecto al gráfico de loadings (Figura 4.20), la distribución de vectores representando las variables correspondientes a los elementos minerales estudiado se mantuvo de la misma forma a las que se le agregaron las variables fisicoquímicas. Entre ellas se observa una elevada correlación positiva del pH con LD1 y negativa con Col (Color). Considerando la distribución de scores se observa que las muestras provenientes de FCH serían aquellas con color más oscuro.



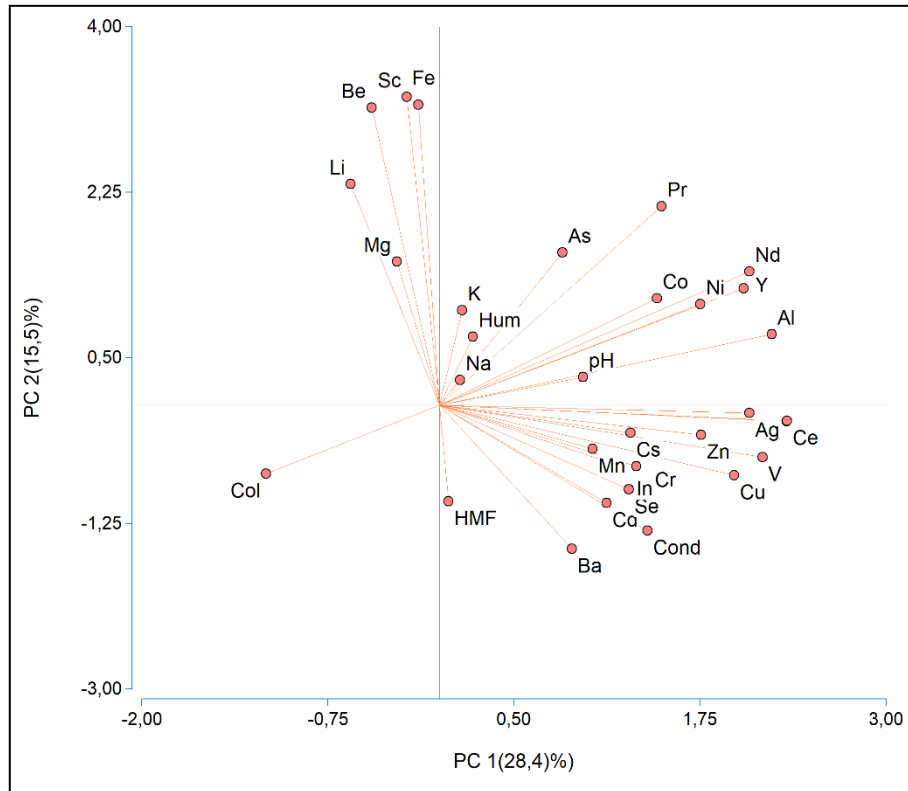


Figura 4.20. Gráfico de Loadings, proyectado en el espacio generado por las dos primeras componentes principales: PC1 vs PC2 obtenidas al analizar la matriz fusionada de resultados multielementales y parámetros fisicoquímicos.

Para calcular modelos predictivos, se utilizó ALD, considerando 3 grupos para los orígenes geográficos. La distribución de muestras en el espacio generado por las dos primeras LDs se puede observar en la Figura 4.21.

Se observa una clara diferenciación entre grupos como consecuencia de la información agregada por la fusión de datos fisicoquímicos. Si bien los tres grupos pueden diferenciarse prácticamente utilizando solo la LD1, la información contenida en LD2 complementa a la primera mejorando la discriminación entre grupos.

La Tabla 4.8 resume los coeficientes estandarizados para cada variable, ordenados de mayor a menor con respecto a LD1. Elevados coeficientes positivos para Nd, Al, In, As y la Cond (Conductividad eléctrica), y negativos para Ce, Cr, V y Col (Color) con respecto a LD1, indicarían la importancia de estas variables en la construcción de esta LD.

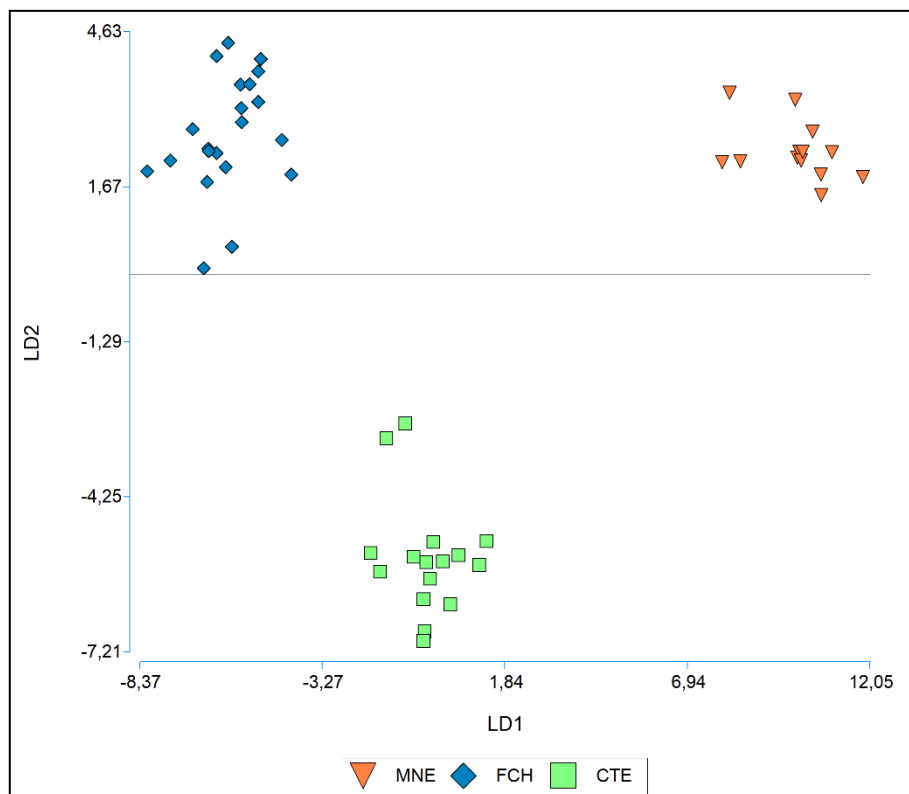


Figura 4.21. Proyección de las muestras en el espacio generado por las dos primeras discriminantes lineales: LD1 vs LD2.

Tabla 4.8. Coeficientes estandarizados de las dos primeras variables discriminantes lineales

	<b>DL1</b>	<b>DL2</b>		<b>DL1</b>	<b>DL2</b>
Nd	<b>2,45</b>	<b>2,11</b>	Fe	-0,13	<b>-1,24</b>
Al	<b>1,68</b>	0,11	HMF	-0,46	0,17
In	<b>1,34</b>	0,69	Cd	-0,49	-0,92
As	<b>1,28</b>	0,1	Mg	-0,59	-0,36
Cond	<b>1,19</b>	0,87	Ba	-0,63	-0,7
K	0,64	-0,15	Cu	-0,66	0,51
Ag	0,56	0,7	La	-0,76	<b>-1,99</b>
Y	0,55	0,24	Ni	-0,77	-0,46
Cs	0,46	-0,13	Pr	-0,81	-0,97
Zn	0,36	-0,98	Li	-0,84	-0,22
Be	0,34	-0,09	Co	-0,85	-0,34
Na	0,28	-0,22	Sc	<b>-1,08</b>	0,22
Hum	0,17	-0,59	Ce	<b>-1,17</b>	-0,71
Se	0,14	0,81	Cr	<b>-1,22</b>	<b>-1,01</b>
pH	0,02	0,08	V	<b>-1,22</b>	<b>1,71</b>
Mn	-0,04	-0,87	Col	<b>-1,42</b>	0,67

DL: variable discriminante lineal

Finalmente, para evaluar el desempeño de este método en la Tabla 4.9 se presentan los resultados de las predicciones realizadas sobre las muestras originales y por validación cruzada.

*Tabla 4.9. Resultados de la clasificación de las muestras de miel en tres grupos de origen geográfico por ALD.*

<b>Region</b>		<b>Predicción de grupo</b>			<b>Total</b>	
		<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>3,00</b>		
<b>Original</b>	<b>Recuento</b>	<i>FCH</i>	21	0	0	21
		<i>MNE</i>	0	13	0	13
		<i>CTE</i>	0	0	16	16
	<b>%</b>	<i>FCH</i>	100,0	0,0	0,0	100,0
		<i>MNE</i>	0,0	100,0	0,0	100,0
		<i>CTE</i>	0,0	0,0	100,0	100,0
<b>Validación cruzada</b>	<b>Recuento</b>	<i>FCH</i>	21	0	0	21
		<i>MNE</i>	0	12	1	13
		<i>CTE</i>	1	1	14	16
	<b>%</b>	<i>FCH</i>	100,0	0,0	0,0	100,0
		<i>MNE</i>	0,0	92,3	7,7	100,0
		<i>CTE</i>	6,3	6,3	87,5	100,0

100% de las muestras originales fueron agrupadas correctamente. Al aplicar el método de validación cruzada el porcentaje de acierto disminuye a 94%, lo que es considerado un nivel muy satisfactorio. Los grupos con mayores dificultades para ser correctamente identificados fueron los de las muestras de CTE (2 muestras mal clasificadas) y MNE (1 muestra mal clasificada). Estos resultados resultan alentadores dado que permiten afirmar que el modelo ALD para tres posibles orígenes geográficos basado en parámetros multielementales y físico-

químicos presenta un excelente desempeño desde el punto de vista de su capacidad discriminatoria. Sin embargo, resulta importante aclarar que otras técnicas de clasificación, tales como k-vecino más cercano, máquinas de vectores soporte o árboles aleatorios, también fueron ensayadas, sin embargo, los resultados obtenidos siempre fueron de menor calidad que aquellos correspondientes al ALD.

Los resultados de clasificación resultan satisfactorios para los objetivos de la tesis, al proponer modelos matemáticos que permitan certificar autenticidad y denominación de origen de futuras muestras de miel de la región Nordeste de Argentina, lo cual se estima que serían identificadas por provincias, en preferencia a identificarlas por ecorregiones. Resulta importante destacar la dificultad de identificar a las mieles de acuerdo a su origen geográfico, ya que corresponde a una clasificación política arbitraria sin tener en cuenta la ecorregión de origen. Es por ello que el modelo predictivo obtenido en base a la fusión de datos logró diferenciar con un muy buen nivel de acierto, luego de unificar en un grupo a las muestras de las provincias de Formosa y Chaco, las cuales pertenecen a la ecorregión del Gran Chaco [35]. Otro grupo se obtuvo para las muestras de miel de la provincia de Misiones, que pertenece a la ecorregión de la Selva paranaense, y el tercer grupo fue para las muestras de miel de la provincia de Corrientes, que pese a estar dividida en tres ecorregiones (Esteros del Iberá, Campos y malezas, y Espinal) fueron bien clasificadas como un grupo en el ALD.

## Referencias

- [1] ANMAT, *Código Alimentario Argentino*. Argentina, 1997.
  - [2] E. Communities, "COUNCIL DIRECTIVE 2001/112/EC of 20 December 2001 relating to honey," *Off. J. Eur. Communities*, vol. 5, p. L10/47-L10/52, 2002.
  - [3] IRAM, *Instituto de Racionalización Argentino de Materiales (IRAM)*. Argentina, 1997.
-

- [4] E. Bertozzi, “Los sabores y colores de la miel,” 2012. [Online]. Available: <https://inta.gob.ar/documentos/los-sabores-y-colores-de-la-miel>. [Accessed: 03-Feb-2018].
- [5] G. Peltzer, “En la miel, color y sabor van de la mano,” Posadas, 19-Apr-2014.
- [6] N. Comisión Interinstitucional, *NORMA HONDUREÑA*. Honduras, 2001.
- [7] A. Bentabol Manzanares, Z. Hernández García, B. Rodríguez Galdón, E. Rodríguez Rodríguez, and C. Díaz Romero, “Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 2, pp. 572–578, Mar. 2014.
- [8] Y. Yücel and P. Sultanoğlu, “Characterization of honeys from Hatay Region by their physicochemical properties combined with chemometrics,” *Food Biosci.*, vol. 1, pp. 16–25, Mar. 2013.
- [9] I. K. Karabagias, A. Badeka, S. Kontakos, S. Karabournioti, and M. G. Kontominas, “Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics,” *Food Chem.*, vol. 146, pp. 548–57, Mar. 2014.
- [10] H. M. Habib, F. T. Al Meqbali, H. Kamal, U. D. Souka, and W. H. Ibrahim, “Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions,” *Food Chem.*, vol. 153, pp. 35–43, Jun. 2014.
- [11] ANMAT, *Capítulo X: Alimentos Azucarados*. 2010, p. 767 al 818.
- [12] B. Magnusson and U. Örnemark, “A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,” *Eurachem*, 2014.
- [13] M. C. Latham, *Colección FAO: Nutrición en el mundo en desarrollo*. Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2002.
- [14] M. V. Baroni *et al.*, “Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics,” *Food Chem.*, vol. 114, no. 2, pp. 727–733, May 2009.
- [15] M. E. Conti, J. Stripeikis, L. Campanella, D. Cucina, and M. B. Tudino, “Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters,” *Chem. Cent. J.*, vol. 1, no. 1, p. 14, 2007.
- [16] L. S. Chua, N.-L. Abdul-Rahaman, M. R. Sarmidi, and R. Aziz, “Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia,” *Food Chem.*, vol. 135, no. 3, pp. 880–7, Dec. 2012.
- [17] Y. Yücel and P. Sultanoğlu, “Characterization of Hatay honeys according to their multi-

- element analysis using ICP-OES combined with chemometrics.," *Food Chem.*, vol. 140, no. 1–2, pp. 231–7, Sep. 2013.
- [18] A. Boussaid *et al.*, "Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia," *Arab. J. Chem.*, vol. 11, no. 2, pp. 265–274, Feb. 2018.
- [19] J. Lachman, D. Koliňová, D. Miholová, J. Kořata, D. Titěra, and K. Kult, "Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality," *Food Chem.*, vol. 101, no. 3, pp. 973–979, Jan. 2007.
- [20] F. Mohammed, N. Abdulwali, D. Guillaume, and R. Bchitou, "Element content of Yemeni honeys as a long-time marker to ascertain honey botanical origin and quality," *LWT*, vol. 88, pp. 43–46, Feb. 2018.
- [21] M. E. Conti, M. G. Finioia, L. Fontana, G. Mele, F. Botrè, and I. Iavicoli, "Characterization of Argentine honeys on the basis of their mineral content and some typical quality parameters," *Chem. Cent. J.*, vol. 8, no. 1, p. 44, 2014.
- [22] A. Panormitis, I. Konstantinos, S. Kontakos, M. George, and C. Papastephanou, "Botanical discrimination of Greek unifloral honeys based on mineral content in combination with physicochemical parameter analysis, using a validated chemometric approach," *Microchem. J.*, vol. 135, pp. 180–189, 2017.
- [23] M. Chudzinska and D. Baralkiewicz, "Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity," vol. 49, pp. 2741–2749, 2011.
- [24] B. L. Batista *et al.*, "Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques," *Food Res. Int.*, vol. 49, no. 1, pp. 209–215, Nov. 2012.
- [25] R. G. Pellerano, M. A. Uñates, M. A. Cantarelli, J. M. Camiña, and E. J. Marchevsky, "Analysis of trace elements in multifloral Argentine honeys and their classification according to provenance," *Food Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 578–582, Sep. 2012.
- [26] O. M. de la Salud, *Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos.* .
- [27] E. Communities, *Reglamento (CE) No 1881/2006.* 2006.
- [28] M. Aceto, "The Use of ICP-MS in Food Traceability," *Adv. Food Traceability Tech. Technol. Improv. Qual. Throughout Food Chain*, pp. 137–164, 2016.
- [29] F. A. de Oliveira *et al.*, "Evaluation of matrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees
-

- (*Tetragonisca angustula* – Jataí) by Q-ICP-MS,” *Talanta*, vol. 162, no. October 2016, pp. 488–494, 2017.
- [30] AOAC, *AOAC Official methods of analysis*, 16th ed. Washington D.C., 1996.
- [31] IRAM, *Instituto de Racionalización Argentino de Materiales (IRAM)*. Argentina, 1996.
- [32] D. C. Fechner, A. L. Moresi, J. D. Ruiz Díaz, R. G. Pellerano, and F. A. Vazquez, “Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties,” *Food Biosci.*, vol. 15, 2016.
- [33] R. Bro and A. K. Smilde, “Principal Component Analysis,” *Anal. Methods*, vol. 6, no. 2, pp. 2812–2831, 2014.
- [34] E. Borràs, J. Ferré, R. Boqué, M. Mestres, L. Aceña, and O. Busto, “Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment – A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 891, pp. 1–14, Sep. 2015.
- [35] F. V. Silvestre, “Ecorregiones.” [Online]. Available: [www.vidasilvestre.org.ar](http://www.vidasilvestre.org.ar). [Accessed: 12-Feb-2019].





# CONCLUSIONES



## Capítulo V: Conclusiones

La espectroscopía atómica permitió cuantificar la composición mutielemental de mieles multiflorales del Nordeste argentino en cuanto al contenido de: Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Tl, Zn, V, Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sc, Sm, Tb, Tm, Y e Yb. Estas técnicas demostraron poseer rangos de exactitud y sensibilidad adecuados para la determinación de las concentraciones elementales en una matriz heterogénea como las mieles. Adicionalmente se caracterizaron dichas mieles desde el punto de vista fisicoquímico, permitiendo realizar estudios de calidad.

Entre los elementos determinados, también se cuantificaron los minerales a nivel de vestigio de importancia para la nutrición humana, tales como Fe, Cu, Cr, Co, Se y Zn. Sin embargo, se concluye que las mieles de abejas analizadas realizan un aporte de estos minerales inferior al 1% de la ingesta diaria recomendada. Entre los elementos considerados no-esenciales, el As, Cd, Pb y Tl son actualmente considerados tóxicos, aunque los niveles detectados en las mieles analizadas estuvieron por debajo de los límites establecidos. Por otra parte, estos elementos no-esenciales presentes en mieles son considerados indicadores de contaminación ambiental o antropogénica.

La presencia de marcadores químicos de identidad en las mieles estudiadas mediante la aplicación de análisis multivariado (ACP, ADL, k-vecino más cercano, máquinas de vectores soporte, árboles aleatorios) fue estudiada, mediante lo cual se propusieron modelos matemáticos que permiten certificar autenticidad y denominación de origen de futuras muestras del Nordeste Argentino, contribuyendo al desarrollo y establecimiento de sistemas de control de la trazabilidad de agroalimentos como la miel.

Finalmente, el desarrollo del trabajo experimental fue realizado en dos etapas:

1. Campañas 2011-2012: se obtuvieron 141 muestras provenientes de cuatro cuencas productoras de la provincia de Corrientes. Todas las muestras fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico mediante la determinación de nueve parámetros: Humedad, Color, Acidez, Hidroximetilfurfural, Conductividad eléctrica, Prolina, Diastasa, Azúcares reductores y Sacarosa aparente. Los resultados obtenidos fueron analizados por técnicas multivariadas de análisis, lográndose una clasificación correcta del 66% de las muestras estudiadas, agrupadas por cuencas apícolas, de las cuales tres comparten la misma ecorregión. Sin embargo, este porcentaje se vio fuertemente aumentado (97%) al considerar muestras de otra provincia (Formosa), perteneciente a una ecorregión muy diferente de las de la provincia de Corrientes. Esta primera etapa del trabajo de tesis permitió demostrar que, si bien la información fisicoquímica resulta útil para evaluar la calidad y aptitud de las mieles, esta información solo permite obtener modelos predictivos subóptimos, siendo necesario incorporar nueva información complementaria a partir de técnicas de naturaleza diferente a las consideradas.

2. Campañas 2015-2016: se obtuvieron 50 muestras provenientes de diferentes cuencas productoras de las cuatro provincias que forman parte del NEA. Todas las muestras fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico mediante la determinación de cinco parámetros: Humedad, Color, pH, Conductividad eléctrica e Hidroximetilfurfural. Adicionalmente se determinaron las concentraciones de tres elementos minoritarios por AAS (K, Na y Mg) y 37 elementos a nivel de vestigios por ICP-MS.

Todas las metodologías analíticas fueron validadas, y los resultados analizados por técnicas de análisis multivariado. Si bien en un inicio se consideraron las cuatro provincias de origen como variable a ser modelada, el análisis exploratorio de la

---

matriz de resultados indicó una gran similitud entre las muestras provenientes de las provincias de Chaco y Formosa, resultando conveniente modelar la información para predecir en solo tres grupos de origen geográfico, agrupando en una sola región las muestras provenientes de estas dos provincias (las cuales comparten la ecorregión del Gran Chaco). Al utilizar solo la información contenida en las variables multielementales se alcanzó un modelo predictivo por ADL con un 100% de acierto en las muestras que fueron modeladas, pero que disminuye fuertemente al ser sometido al método de validación cruzada (76% de acierto), siendo el Fe, Al, Sc, Ce, Y, Nd, Mn, Cr, Zn las variables con mayor relevancia en la construcción del modelo. Se hizo necesario entonces utilizar toda la información disponible respecto a las muestras para mejorar el desempeño de los modelos predictivos propuestos. Con este objetivo, se realizó una fusión de datos a bajo nivel de las matrices de datos multielementales y fisicoquímicos. El modelo predictivo por ADL obtenido a partir de la matriz de datos fusionada alcanzó un 100% de acierto de las muestras usadas para entrenamiento y 94% por validación cruzada, resultando Nd, Al, In As, Conductividad, La, Color, V, Cr, Ce las variables con mayor relevancia en la construcción del modelo. Los porcentajes de muestras correctamente clasificadas son considerados muy satisfactorios para el cumplimiento de los objetivos propuestos. Resulta importante aclarar que otras técnicas de clasificación tales, como k-vecino más cercano, máquinas de vectores soporte o árboles aleatorios, también fueron ensayadas, sin embargo, los resultados obtenidos siempre fueron de menor calidad que aquellos correspondientes al ADL. Por lo tanto, se concluye que el modelo matemático obtenido por ADL aplicado a la fusión de datos permite certificar autenticidad y denominación de origen geográfico de futuras muestras de las provincias de: Corrientes, Misiones y Formosa-Chaco, confirmando así las hipótesis y respondiendo a los objetivos particulares planteados.

En resumen, el abordaje del problema científico para la realización del presente trabajo de tesis permitió a la tesista llevar a la práctica todas las etapas del método científico, desde el análisis de un problema científico, su planteamiento, enunciar hipótesis, proponer posibles soluciones y metodologías de trabajo, validar las herramientas de medición experimental, obtener y analizar resultados, para generar respuestas al problema original planteado. Adicionalmente, se logró alcanzar todos los objetivos particulares planteados y en consecuencia el objetivo general de esta tesis, constituyendo de esta manera un importante aporte al conocimiento de la composición química nutricional de mieles de gran importancia en la región.

El presente trabajo de tesis permitió a la tesista lograr la siguiente producción científica:

## Producción científica

### 1. Publicaciones con referato

- “Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties”. Diana C. Fechner, Adriana L. Moresi, Juan D. Ruiz Diaz, Roberto G. Pellerano, Francisco A. Vazquez. Food Bioscience, 15, 2016. 10.1016/j.fbio.2016.05.002

### 2. Presentaciones en congresos y comunicaciones científicas

- “Determinación multielemental en mieles producidas en el nordeste argentino, y estudio quimiométrico según zona de origen”. Diana Corina Fechner, Juan Daniel Ruiz Díaz, Raúl Andrés Gil, Eduardo Jorge Marchevsky, Roberto Gerardo Pellerano. 9no Congreso Argentino de Química Analítica. Río Cuarto, Córdoba. 7 al 10 de noviembre de 2017.
  - “Clasificación multivariada de mieles de Corrientes según el origen geográfico basado en parámetros físico-químicos”. Diana C. Fechner; Adriana L. Moresi; Juan D. Ruiz Díaz;
-

Roberto G. Pellerano; Francisco A. Vazquez. 8vo Congreso Argentino de Química Analítica. La Plata. Noviembre de 2015.

- “Determinación de Al, Si, P, Cr, Cu, Ga, Ge, As, Sb, Hg, Fe, Mn, Zn, Cu, Ca, Mg, Na y K, en mieles mediante ICP-MS por dilución directa en agua”. Juan D. Ruiz Díaz, Adriana L. Moresi, Diana C. Fechner, Andrea R. Da Cruz, Luis D. Martinez, Raúl A. Gil. Trabajo presentado en el 7mo Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza. 01 al 04 de octubre de 2013.

### 3. Trabajos enviados a publicar en evaluación

“Multi-element determination in Argentinean honey samples produced in the Northeast region of Argentina, authentication of geographical origin”, enviado en octubre de 2018 a la revista Food Bioscience (Elsevier).

#### Becas obtenidas:

- **Beca interna doctoral – CONICET.** Lugar de trabajo: IQUIBA-NEA (UNNE-CONICET). Período: 01/04/2015 al 01/04/2019.

