

## CALIDAD Y ESPECTROFOTOMETRIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO DE MIELES DE URUGUAY

Daniel Cozzolino 1,2  
Eduardo Corbella 1

### RESUMEN

Usamos la espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS en inglés) para conocer algunos aspectos de la composición fisicoquímica de muestras frescas de miel. Las muestras (n=104) provenientes de diferentes localidades de Uruguay, fueron escaneadas en transreflectancia (0,2 mm de longitud de onda) en un NIRS 6500 monocromador en las regiones visible y en el infrarrojo cercano (400-2500 nm). Las ecuaciones de predicción fueron desarrolladas empleando cuadrados mínimos parciales y aplicando validación cruzada para evitar sobreajuste. Las calibraciones para contenido de agua, pH, conductividad eléctrica, color e hidroximetilfurfural dieron lugar a coeficientes de calibración de 0,96; 0,88; 0,94; 0,98 y 0,67 respectivamente. Se concluye que NIRS es un método útil para evaluar la composición fisicoquímica de muestras de miel.

**Palabras clave:** miel, reflectancia en el infrarrojo cercano, NIRS.

### ABSTRACT

#### QUALITY AND NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY OF URUGUAYAN HONEY

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) was used to assess the physicochemical composition of fresh honey samples. Samples

---

1 Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental INIA - La Estanzuela, Colonia, Uruguay. corbella@inia.org.uy

2 Dirección actual: The Australian Wine Research Institute, Urrbrae, PO Box 197, Urrbrae, SA 5064, Australia. Daniel.cozzolino@adelaide.edu.au

(n=104) from different locations across Uruguay were scanned in transreflectance (0.2 mm path-length) in a NIRS monochromator in both the visible and near infrared region (400-2500 nm). Prediction equations were developed using partial least squares and cross validation was applied to avoid overfitting. Calibrations for water content, pH, electrical conductivity, colour and hydroxymethylfurfural yielded a coefficient of calibration of 0.96, 0.88, 0.94, 0.98 and 0.67 respectively. It is concluded that NIRS is a useful method to evaluate physicochemical composition of honey samples.

**Key words:** honey, near infrared reflectance, NIRS.

## INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se emplea desde la década del 70 en la industria alimenticia, farmacéutica, petroquímica, como alternativa a los métodos fisicoquímicos y bioquímicos tradicionales. Es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante, de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración (1, 2). En los últimos años se desarrollaron numerosas aplicaciones de NIRS para evaluar la composición, monitorear el procesamiento y certificar la calidad de alimentos tanto para animales como para la población humana (1).

Este método se basa en que cuando la luz incide sobre una materia orgánica, parte de los fotones (unidades de intensidad de la luz) es transmitido a través de la misma, siendo el resto absorbido y/o reflejado. La absorción de la energía luminosa hace que las uniones C-H, O-H y N-H, componentes principales de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en diferente forma (1).

NIRS se desempeña entre los 700 y 2500 nanómetros (nm) de longitud de onda del espectro electromagnético. La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (2).

Al desarrollar una calibración NIRS, se relaciona la información espectral con la información de la composición fisicoquímica proveniente de los análisis convencionales, definiendo el tratamiento matemático de los datos, el segmento del espectro a incluir y los métodos de regresión a emplear. De estos últimos, los más utilizados para analizar los datos de laboratorio y los espectrales son la regresión múltiple, los componentes principales y los cuadrados mínimos parciales (1, 2).

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) determinar algunos indicadores de calidad de mieles de Uruguay correspondientes a la zafra apícola 2000-2001, b) estudiar el potencial uso de NIRS para el análisis de miel y c) construir ecuaciones de calibración entre la información fisicoquímica y la de NIRS para el análisis rápido de muestras de miel. Es decir, estimar la posibilidad de sustituir los datos originados por los análisis ordinarios de control de calidad de mieles por la información aportada por el NIRS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Analizamos 104 muestras de miel en la condición que ninguna de ellas tuviera más de 5 meses de cosechada. Estas muestras, provenientes de los 19 departamentos de Uruguay, fueron conservadas a temperatura ambiente (20 - 25° C) y en la oscuridad. Cuantificamos las siguientes características:

- humedad (mediante refractometría),
- acidez (pH),
- conductividad eléctrica,
- contenido de minerales mediante la fórmula  $C = 0,14 + 1,74A$  donde  $C$  es la conductividad eléctrica y  $A$  el contenido de minerales (3),
- hidroximetil furfural (HMF),
- color.

En todos los casos seguimos los métodos oficiales de análisis de la AOAC-1990 (4) y las recomendaciones del Codex Alimentarius (5). Los análisis fisicoquímicos de las mieles fueron realizados por triplicado

y empleamos el valor promedio de las tres medidas en cada muestra. Para cada variable calculamos el valor promedio y el desvío estándar.

A continuación las muestras fueron leídas en reflexión, presentadas al instrumento en una cápsula bajo la forma de una película delgada de miel de 1 mm de espesor, en el rango de 400 a 2500 nm, correspondiendo al visible e infrarrojo cercano. Utilizamos un monocromador NIRS 6500 (NIRSystems, Silver Spring USA). Cada muestra fue leída una vez y la información obtenida fue almacenada bajo la forma Log 1/R, siendo R la reflexión. Los espectros eran estandarizados utilizando un disco de cerámica. Con los resultados de los análisis físico-químicos y la información NIRS de cada miel construimos ecuaciones de multirregresión, utilizando el método de los cuadrados mínimos parciales.

La fórmula de la ecuación de calibración de NIRS es:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n$$

En la cual **X** representa cada longitud de onda, **b<sub>0</sub>** es un término independiente y los **b** son los coeficientes de regresión de las mismas.

Para cada ecuación calculamos los coeficientes de multirregresión de la calibración ( $R^2_{CAL}$ ) y el error estándar de la calibración (SEC). Las ecuaciones fueron evaluadas en función de obtener el menor SEC y el mayor  $R^2_{CAL}$  (6).

El error estándar de la calibración fue calculado mediante la fórmula:

$$SEC = [\text{Sum } (Y - X)^2 / n - t - 1]^{1/2}$$

**Y** es el valor estimado por NIRS, **X** es el valor real determinado por el método de referencia, **n** es número de muestras, **t** es el número de términos usados en la calibración (6).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 presentamos los resultados de los diferentes análisis utilizando los métodos de referencia habituales.

**Tabla 1.** Valor medio, desvío estándar y variación de los componentes de la calidad de las muestras de miel analizadas.

	Valor medio	DS	Variación
Humedad (gr/100gr)	17,71	1,21	15,60-20,63
pH	3,38	0,52	2,57-6,03
Conductividad (mS/cm)	0,63	0,31	0,20-1,44
Contenido mineral (gr/100gr)	0,28	0,18	0,03-0,75
HMF (mg/k)	9,01	6,46	0,75-29,20
Color (mm Pfund)	63,86	23,73	16-11

### *HUMEDAD*

El promedio de la humedad de las mieles estudiadas es 17,71%, variando desde 15,60 a 20,63%. Vale decir que, en cuanto a humedad, estas mieles cumplen con las exigencias de todas las normas de calidad (7).

### *PH*

El pH promedio de las mieles muestreadas es 3,38 y su rango se encuentra dentro de la normalidad. Debemos considerar que se trata de mieles recién cosechadas y con un adecuado contenido de humedad.

La correlación entre el pH y la conductividad eléctrica (0,82) es positiva y significativa, coincidiendo nuestros resultados con la bibliografía consultada.

### *CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA*

Es una característica que está en función directa con el contenido mineral, el color y la acidez de las mieles. Se expresa en mili Siemens/cm (mS/cm). Es de esperar encontrar una gran variación en la conductividad eléctrica por ser determinada por muchos factores, como

son los edáficos, climáticos, la fisiología floral y, fundamentalmente, el origen botánico de la miel (3).

Los valores de conductividad eléctrica obtenidos determinan una media de 0,63 mS/cm, con una variación entre 0,20 y 1,44 mS/cm. De las 104 muestras de miel estudiadas, 28 presentaron una conductividad eléctrica mayor de 0,80 mS/cm, valor establecido para separar las mieles de los mielatos.

La rotación óptica permite diferenciar las mieles de flores de los mielatos, por presentar las primeras rotación específica negativa y los mielatos rotación positiva (8). Los datos sobre la rotación óptica de las 28 muestras que presentaron conductividad eléctrica superior a 0,80 mS/cm indican que todas las mieles estudiadas son de néctar o florales.

### *CONTENIDO MINERAL*

Empleamos la fórmula que relaciona la conductividad eléctrica con el contenido mineral como una aproximación a la cuantificación de este indicador, sabiendo que originalmente se refiere a mieles monoflorales (4). No podemos, por ahora, comprobar su validez para nuestras mieles hasta tanto no tengamos información sobre su origen botánico.

Hecha esta salvedad, podríamos indicar que, al igual que y en función de la conductividad, encontramos una gran variación del contenido de minerales (0,03 a 0,75g/100g) con un valor promedio de 0,28g cada 100 gramos de miel.

### *HIDROXIMETIL FURFURAL (HMF)*

Las muestras analizadas variaron en el contenido de HMF de 0,75 a 29,20 mg/k de miel, con un valor promedio de 9,01 mg/k. Dentro de esta diferencia, todas las mieles presentan un contenido de HMF bastante por debajo de 40 mg/k, el máximo admitido por las normas internacionales.

### *COLOR*

Nos vimos limitados materialmente a emplear el colorímetro de Pfund, un método criticado debido a sus limitaciones analíticas y al alto contenido subjetivo de la evaluación. Como forma de disminuir este in-

conveniente uno de nosotros fue el encargado de hacer todas las mediciones. De las mismas surge que el promedio es 63,86mm Pfund correspondiente a ámbar claro (*light amber*). La variación del color de las mieles, entre 16 y 111mm Pfund (*extra white* - ámbar) es muy amplia por estar determinada, fundamentalmente, por el origen botánico de los néctares.

Encontramos una correlación positiva y significativa (0,83) entre el color y la conductividad, por ende, también con el contenido mineral. Podemos corroborar lo ya conocido: las mieles oscuras tienden a presentar mayor conductividad y contenido de minerales que las mieles claras.

### CALIBRACIONES NIRS

En la Tabla 2 presentamos las calibraciones NIRS de los análisis fisicoquímicos realizados. Observamos una alta correlación entre esta información y el NIRS para humedad ( $R^2_{CAL}$ : 0.96), color ( $R^2_{CAL}$ : 0.98), conductividad eléctrica ( $R^2_{CAL}$ : 0.94) y pH ( $R^2_{CAL}$ : 0.87) exceptuando el HMF que fue la variable que presentó baja correlación ( $R^2_{CAL}$ : 0.67). Otros investigadores, trabajando con muestras comerciales de miel, obtuvieron buenas calibraciones NIRS para HMF ( $R^2_{CAL}$ : 0.92) (9). En este caso se trataba de mieles comerciales con un rango de HMF de singular amplitud, comprendido entre 2 y 731 (mg/k). El bajo ajuste para HMF obtenido por nosotros, podría ser debido a la poca variación relativa de esta característica en nuestras mieles, por ser frescas, bien manejadas y sin ningún tipo de procesamiento.

**Tabla 2.** Calibraciones NIRS para muestras de miel.

	$R^2_{CAL}$	SEC	$R^2_{VAL}$	T
H	0.96	2.7	0.94	5
CE	0.94	0.07	0.88	9
PH	0.87	0.14	0.70	13
HMF	0.67	35.6	0.61	2
Color	0.98	3.8	0.97	5

H: humedad; CE: conductividad eléctrica;  $R^2_{CAL}$ : Coeficiente de calibración; SEC: error estándar de calibración;  $R^2_{VAL}$ : coeficiente de determinación en la calibración cruzada; T: número de términos PLS de la calibración.

Nuestros resultados reafirman el potencial de la técnica NIRS para realizar estudios sobre la calidad de mieles. La aplicación de este método nos permite, por ahora, la determinación rápida, barata, precisa y no destructiva de algunas de sus principales características físicas y químicas. En el futuro se podrá ampliar su uso, de conseguirse calibraciones para otras variables.

### AGRADECIMIENTOS

A Gustavo Ramallo y Marcelo Maidana por su colaboración en las tareas de laboratorio.

Al Prof. Pedro Sansón, Facultad de Química de la Universidad de la República, por el estudio de rotación óptica de las mieles

A Graciela Vila y Alejandra Díaz, Biblioteca INIA La Estanzuela, por la búsqueda bibliográfica.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Alomar, D.; Fuchslocher, R. 1998. Fundamentos de la Espectrofotometría de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) como Método de Análisis de Forrajes. *Agro Sur* 26 : 88-104.
2. Murray, I. 1993. Forage Analysis by Near Infrared Spectroscopy. In: *Sward Measurement Handbook*. (Davies, A.; Baker, R.D.; Grant, S.A.; Laidlaw, A.S., ed.). 2. ed. Reading, The British Grassland Society.
3. Piazza, M.G.; Accorti, M.; Persano Oddo, L. 1991. Electrical Conductivity, Ash, Colour and Specific Rotatory Power in Italian Unifloral Honeys. *Apicoltura* 7: 51-63.
4. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. *Official Methods of Analysis*. (K. Helrich, K., ed.). 15. ed. Arlington, AOAC. 2v.
5. Codex Alimentarius Commission. *Codex Standards for Methods of Analysis and Sampling*. Codex Alimentarius v.13. Consultado 17 abril 2001. Disponible en [http://www.codexalimentarius.net/STANDARD/volume 13/vol 13-E.htm](http://www.codexalimentarius.net/STANDARD/volume%2013/vol%2013-E.htm).

6. Infrasoft International (ISI). 1995. NIRS 2: Operation Manual for NIR Instruments: Calibration Development Manual. Version 3.10. NIRSystems, ISI.
7. Comisión Internacional de la Miel. 2000. La Calidad de la Miel y las Normas Internacionales. (Bogdanov, S., coord.). *Vida Apícola* no. 100:48-55.
8. Persano Oddo, L.; Piazza, M.G.; Sabatini, A.G.; Accorti, M. 1995. Characterization of Unifloral Honeys. *Apidologie* 26: 453-465.
9. Qiu, P.Y.; Ding, H.B.; Tang, Y.K.; Xu, R.J. 1999. Determination of Chemical Composition of Commercial Honey by Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2760-2765.