

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**



**“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN MIEL *DE Apis mellifera* EN EL DEPARTAMENTO DE CHALATENANGO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

**ESTHER ABIGAIL ARCE HERNÁNDEZ**

**VICENTE RAFAEL HERNÁNDEZ MELARA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MAYO DE 2022**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**

**“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN MIELES DE  
*APIS MELLÍFERA* EN EL DEPARTAMENTO DE CHALATENANGO POR  
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

**ESTHER ABIGAIL ARCE HERNÁNDEZ**  
**VICENTE RAFAEL HERNÁNDEZ MELARA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ASESORES:**

**MSC. DIEGO FRANCISCO CHICAS BAÑOS**  
**LIC. DAVID ALFREDO SERVELLÓN CARPIO**  
**LIC. JORGE ALBERTO VELÁSQUEZ REALES**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MAYO DE 2022**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

**RECTOR:**

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIA GENERAL:**

MSC. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

**FISCAL GENERAL:**

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**DECANO**

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA

**VICEDECANO:**

MSC. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

**SECRETARIO:**

LIC. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA

**DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA**

LIC. NELSON MAURICIO COTO MENDOZA

## AGRADECIMIENTOS

A Dios porque nunca me ha dejado sola. Porque de él, por él y para él son todas las cosas. A él sea la gloria siempre.

A mi madre Isabel por ser mi ayuda en todo este proceso, además de ser mi inspiración. Gracias por amarme incondicionalmente, animarme orar y siempre creer en mí, te amo mami.

A mi padre Samuel porque desde el cielo ha estado conmigo, de él heredé el amor por la química (me hubiera encantado escuchar tus historias de química, sé que un día me las contarás), te extraño papi. A mi abuelita Juanita gracias por sus consejos, oraciones, historias y sobre todo por su dulce compañía. Te amo mucho abue Juanita

A mi esposo porque definitivamente sin él no hubiera podido terminar esto, por tanto, amor y paciencia, porque cuando ya no podía más estabas animándome, diciéndome que si se podía. Lo logramos amor mío.

A mis hijos Mateo y Samuel por su amor y paciencia incondicional, son el motivo principal por ser mejor cada día. Los amo mucho mis bebés.

A mi hermano Samuel por ser mi polo tierra, a Jenni por ser más que mi cuñada mi amiga y creer ciegamente en mí, mis princesas Belén y Jael son lo mas bello que mi hermano me ha podido dar, quiero ser una super tía. Familia Arce Castro los amo tanto que no se pueden imaginar.

A mis tíos Estelita y Roberto y mi Josué siempre estuvieron para mí, por llevarme, traerme y cuidarme. Los quiero muchísimo, ahora si a celebrar.

A mi familia Ascencio Hernández Dios pensó en mi cuando los hizo, gracias por su ayuda y por darme donde dormir para no madrugar tanto. Son lo máximo, los quiero mucho.

A la familia Hernández Marín, tantas historias juntos, gracias por su apoyo y compañía. Los quiero.

A toda la familia De León de la cual ahora soy parte, gracias por su amor, oraciones y apoyo. Vamos a hacer fiesta familia.

A mis amigas Andrea, Loida, Maura, Sarita, Katia, Marina y Jenni, este camino fue mucho mejor con ustedes, tantas historias, risas, llantos, enojos, noches de estudio juntas. De lo mejor que me pudo dejar esta carrera. Las quiero chicas.

A mi super compañero de fórmula Vicente, definitivamente este trabajo no lo hubiera logrado sola, tu paciencia y enorme corazón han dejado una huella en mí. Lo hicimos compañero.

A mis asesores Diego, Jorge y David, la paciencia y el que hayan creído en nosotros se agradece enormemente. Qué bonito aprender de los mejores, son una fuente de inspiración para mí. Los admiro muchísimo.

**Esther Abigail Arce Hernández**

Agradecer en primer lugar a Dios por brindarme la sabiduría para culminar este proyecto tan importante en mi vida.

A mis padres, Eugenia y Vicente por su infinito apoyo. Sin su paciencia no hubiese terminado. Gracias por amarme incondicionalmente.

A Soraya, Milton e hijos, por ser una fuente de inspiración. Gracias por todo el apoyo y cariño que me brindaron hasta el último día en la universidad.

A mi Tía “Su” y mi primo Carlitos por sus ocurrencias y su compañía.

A mis hermanos, José, Orlando, Enma, Adriana, María por acompañarme en esta travesía.

Al Centro de Investigaciones de Metrología (CIM) de la UES por su apoyo para la realización de esta investigación.

Al Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICIES) por su disposición y su apoyo invaluable.

A todos los maestros de la Escuela de Química por enseñarme el amor a la química y demostrar lo importante que es el trabajo científico.

A mis Asesores, Diego Chicas, David Servellón, Jorge Reales, eternamente agradecido por todas sus correcciones, enseñanzas, apoyo, su inteligencia y gran humildad para hacer realidad esta tesis. Me llevo lo mejor de grandes profesionales y compañeros.

A Jennifer Chavéz y Dr. Orellana por su ayuda en todo momento, por su sencillez y su profesionalismo para encaminarnos a finalizar de la mejor manera. Muchas Gracias.

A mi Andreina “coyo” por su perseverancia, esfuerzos y risas que ayudaban a olvidar los momentos difíciles. Eres lo máximo.

A mi compañera Abigail por no desistir a pesar de las adversidades y problemas que surgieron en esta aventura.

A todos mis amigos y compañeros de la escuela de química, muchas gracias a todos...

**Vicente Rafael Hernández Melara**

## ÍNDICE

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
2.1 ANTECEDENTES	2
2.2 LA APICULTURA	3
2.3 LA APICULTURA EN EL SALVADOR	7
2.4 MIEL DE ABEJA	9
2.4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL	10
2.4.1.1 HUMEDAD	10
2.4.1.2 CARBOHIDRATOS (GLÚCIDOS)	11
2.4.1.3 PROTEÍNAS	11
2.4.1.4 MINERALES	11
2.4.1.5 ENZIMAS	11
2.4.1.6 ÁCIDOS ORGÁNICOS	12
2.4.1.7 SUSTANCIAS AROMÁTICAS	12
2.5 NORMATIVAS NACIONAL, REGIONAL Y EUROPEA	12
2.6 SANIDAD APÍCOLA	13
2.6.1 ANTIBIÓTICOS EN LA MIEL	14
2.6.2 OXITETRACICLINA (OTC)	16
2.7 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	16
2.7.1 HUMEDAD	16
2.7.2 AZÚCARES REDUCTORES	17
2.7.3 CENIZAS	17
2.7.4 pH	18
2.8 TÉCNICA A UTILIZAR	19
2.8.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	19
2.8.1.1 CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTALES DE HPLC	20
2.8.1.1.1 SISTEMA DE BOMBEO	20
2.8.1.1.2 SISTEMA DE INYECCIÓN	21
2.8.1.1.3 FASE MOVIL (ELUCIÓN ISOCRÁTICA Y GRADIENTE)	21
2.8.1.1.4 COLUMNAS	22

2.8.1.1.4.1 SEPARACIONES BASADAS EN LA POLARIDAD	23
2.8.1.1.5 DETECTORES	27
2.8.1.1.5.1 DETECTOR DE ABSORCION UV-VIS CON ARREGLO DE DIODOS	27
2.8.1.1.6 CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN	28
2.8.1.1.6.1 FASE NORMAL	28
2.8.1.1.6.2 FASE REVERSA	28
2.8.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	28
2.8.2.1 DESCRIPCIÓN DEL CARTUCHO SPE	29
2.8.2.2 ETAPAS DE LA SPE	30
2.8.3 REFRACTOMETRÍA	32
2.8.3.1 REFRACTOMETRO ABEE	33
2.8.4 POTENCIOMETRÍA: MEDICIÓN DE pH	33
2.8.4.1 TITULACIONES REDOX	34
2.8.4.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CURVA DE VALORACION	35
2.8.4.3 DETECCION DEL PUNTO FINAL EN VALORACIONES REDOX	35
2.8.4.4 INDICADORES REDOX	35
2.8.4.5 AZUL DE METILENO	36
2.8.5 CONDUCTIMETRÍA	36
2.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS	38
2.9.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS	38
2.9.1.1 LINEALIDAD	38
2.9.1.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	38
2.9.1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN	39
2.9.1.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	40
<b>3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	41
3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO	41
3.2 MUESTRAS	42
3.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	42
3.3.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	42
3.3.1.1 TITULACIÓN DE DISOLUCIÓN DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ CON EDTA.	42
3.3.1.2 TITULACIÓN DE DISOLUCIÓN DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ CON DISOLUCIÓN DE MUESTRA DE MIEL	43
3.3.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS	44
3.3.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	44
3.3.4 DETERMINACIÓN DE pH	45

3.4 DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE OXITETRACICLINA POR HPLC	45
3.4.1 PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN	45
3.4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	48
3.5 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	48
3.5.1 LINEALIDAD	48
3.5.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	49
3.5.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	49
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
4.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	50
4.1.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	50
4.1.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS	53
4.1.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	54
4.1.4 DETERMINACIÓN DE pH	56
4.2 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	57
4.2.1 EVALUACION DE LA LINEALIDAD	57
4.2.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	60
4.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	62
4.2.3.1 RESULTADO DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS	65
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>70</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	<b>71</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>78</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales países productores de Miel en el 2019.	8
Tabla 2	Composición Química promedio de la miel.	10
Tabla 3	Tipos de contaminación de la miel.	13
Tabla 4	Límites máximos permitidos de productos veterinarios y contaminantes ambientales en la miel según la Norma Salvadoreña.	14
Tabla 5	Sustituyentes y constantes de disociación ácido para tetraciclina (TTC) y la oxitetraciclina (OTC).	26
Tabla 6	Información de la procedencia de muestras de miel utilizadas para el análisis de restos de oxitetraciclina.	42
Tabla 7	Datos de la curva de calibración para cuantificar OTC.	46
Tabla 8	Condiciones cromatográficas utilizadas en la determinación de OTC en muestra de miel de abeja.	48
Tabla 9	Resultados obtenidos en la determinación de azúcares reductores.	52
Tabla 10	Resultados obtenidos en la determinación de cenizas.	53
Tabla 11	Resultados obtenidos en la determinación de humedad.	55
Tabla 12	Resultados obtenidos en la determinación de pH.	56
Tabla 13	Valores correspondientes al tiempo de retención de áreas encontradas en los puntos de la curva de calibración de OTC evaluado en 360, 355 y 350 nm.	57
Tabla 14	Ecuaciones de regresión lineal, coeficiente de determinación y de correlación a tres longitudes de onda 360, 355, 350 nm.	58
Tabla 15	Resultado del porcentaje de recuperación de OTC obtenidos.	61
Tabla 16	Cálculo del promedio y desviación estándar de blancos para la evaluación del límite de detección y cuantificación a una longitud de onda de 355 nm.	63
Tabla 17	Parámetros de curva de calibración para la evaluación del límite de detección y cuantificación a una longitud de onda de 355 nm	63
Tabla 18	Resultado de análisis de muestras de miel	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Pinturas rupestres correspondientes al periodo mesolítico.	6
Figura 2	Pintura rupestre correspondiente al periodo paleolítico.	6
Figura 3	Tendencias de la exportación de miel salvadoreña desde 2010 hasta el 2019.	9
Figura 4	a) Estructura química del grupo de tetraciclinas. b) Fórmula química de la Oxitetraciclina	16
Figura 5	Reacción propuesta entre azúcar reductor y cobre.	17
Figura 6	Diagrama de bloques que muestra los componentes de típico equipo de HPLC.	19
Figura 7	Propuesta de mecanismo de interacción entre la fase estacionaria de la columna cromatografía y la oxitetraciclina.	24
Figura 8	Equilibrio ácido-base de la OTC. Comportamiento catiónico bajo un pH 3.27; Comportamiento zwitteriónico entre los pHs 3.27 y 7.32; Comportamiento aniónico entre los pHs 7.32 y 9.11; comportamiento dianiónico sobre un pH 9.11.	25
Figura 9	Estructura zwitteriónica de la OTC entre pH 3.27 y 9.11.	26
Figura 10	Cartuchos SPE HLB.	29
Figura 11	Composición química de los cartuchos Chromabond HBL.	31
Figura 12	Propuesta de Interacción entre la OTC y el cartucho Chromabond HLB.	32
Figura 13	Refractómetro Abbe.	33
Figura 14	Estructura clásica de un electrodo selectivo de iones hidrógeno combinado referencia	34
Figura 15	Estructura química del indicador azul de metileno en su forma reducida y oxidada.	36
Figura 16	a) Sistema de electrodos de una celda conductimétrica. b) Celda de inmersión.	37
Figura 17	Procedimiento para la determinación de azúcares reductores.	43
Figura 18	Procedimiento para la determinación de cenizas.	44

Figura 19	Procedimiento para la determinación de pH.	45
Figura 20	Diagrama del proceso para la preparación de curva de calibración y tratamiento de muestras.	47
Figura 21	Gráficos de la curva de calibración correspondiente a OTC.	59-60
Figura 22	Cromatogramas de OTC con 5 concentraciones diferentes a longitud de onda de 355 nm. Fase móvil: buffer-acetonitrilo-metanol (72:13:15), flujo 0.6 ml/min, volumen de inyección 20 $\mu$ l, Pinnacle C18 5 $\mu$ m 150x5.6mm (resumen de condiciones cromatográficas).	62
Figura 23	Curva de calibración para la determinación de Límite de detección y Límite de cuantificación	63
Figura 24	Intervalos de no detección, detección y cuantificación, definidos por límite de detección y límite de cuantificación.	64
Figura 25	Cromatogramas de OTC para muestra 4 a longitud de onda de 355 nm. Fase móvil: buffer-acetonitrilo-metanol (72:13:15), flujo 0.6 ml/min, volumen de inyección 20 $\mu$ l, columna C18 5 $\mu$ m 150x5.6mm (resumen de condiciones cromatográficas).	66

## RESUMEN

La miel cosechada en el departamento de Chalatenango representa una fuente de ingresos económicos importantes para los pequeños apicultores y las cooperativas que exportan este dulce producto hacia los países del continente europeo, donde se evalúa estrictamente la calidad de la miel para aceptar, rechazar o fijar el precio. En este documento se presenta y discute el estudio de la calidad de la miel, a través del desarrollo de un método analítico de prevalidación, para la determinación de residuos de oxitetraciclina en muestras de miel de abeja (*Apis mellífera*) utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución. Así mismo, se analizan los parámetros fisicoquímicos de 15 muestras de miel que representan aproximadamente el 5% de los apiarios del departamento ubicado en la zona norte del país. Los resultados obtenidos han sido contrastados con la Norma Salvadoreña (NSO 67.19.01:08), el Codex Alimentarius (CODEX STAN 12-1981) y la Norma Europea (2002/657/CE) para verificar el cumplimiento de los estándares de calidad exigidos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La miel es una sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en colmenas, de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición.<sup>1</sup> La composición es compleja y los carbohidratos representan la mayor proporción, dentro de los que destacan la fructosa y glucosa, pero contiene una gran variedad de sustancias menores como: enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales.<sup>2</sup>

La apicultura es una actividad generadora de empleos directos e indirectos en zonas rurales del país, siendo una alternativa de ingresos para agricultores y exportadores.<sup>3</sup> Sin embargo, dicha actividad en El Salvador es afectada por diferentes factores, principalmente naturales, como plagas; así como la caída de precios del mercado exterior debido a la especulación sobre el producto contaminado, que a la fecha sigue impactando negativamente al sector.<sup>4</sup>

Las tetraciclinas (TCs) son agentes bacteriostáticos de amplio espectro que muestran actividad contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluidos algunos anaerobios, y se han utilizado ampliamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas,<sup>5</sup> convirtiéndose en antibióticos de uso habitual en seres humanos, animales y la agricultura. Actualmente el uso en humanos es cada vez menor, aunque siguen siendo muy habituales en veterinaria dentro y fuera de nuestro país, a pesar de la prohibición que ha hecho la Unión Europea (UE) de su utilización.<sup>6</sup> La existencia de residuos de antibiótico en la miel es un problema importante, debido a los efectos que tiene en la salud de los consumidores.<sup>7</sup>

Recientemente se ha reportado que hasta el 80% de la producción nacional de miel se exporta hacia la UE,<sup>8</sup> quien ha establecido límites máximos de residuos (LMRs) para la presencia de tetraciclinas en productos alimentarios y para el caso de la oxitetraciclina (OTC), este es de 25 µg. Kg<sup>-1</sup>.<sup>9</sup> En la presente investigación se ha comprobado la calidad de la miel producida al realizar un muestreo representativo en el departamento de Chalatenango, verificando ciertos parámetros fisicoquímicos (humedad, pH, cenizas, y azúcares reductores), así como la determinación de OTC, generando un método confiable para verificar el cumplimiento de las normas internacionales establecidas por los países compradores. Así mismo, este estudio

proporciona información sobre las condiciones en la producción de miel en la zona norte de El Salvador.

## **2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **2.1 ANTECEDENTES**

El hombre reconoció a la abeja y con ella, la miel como alimento dulce, mucho después que esta hubiera asumido la importante función de la polinización, principal contribución del insecto como dinamizador de la diversidad biológica y del equilibrio de los ecosistemas.<sup>10</sup>

El Salvador, al igual que todos los países subdesarrollados, basan su economía en el área agropecuaria siendo uno de los rubros más importantes en el producto interno bruto (PIB). La apicultura salvadoreña creció en el siglo XIX y gran parte del siglo XX con una serie de limitantes.<sup>11</sup>

Desde el punto de vista económico, los productos obtenidos de la apicultura son muy demandados, por lo que son considerados una fuente generadora de ingresos. Entre estos están la miel de abeja, el polen y los propóleos, los cuales tienen un buen mercado internacional; ya sea por ser usados como materia prima para la elaboración de otros productos (industrias de panadería, confitería y de cereales, productos farmacéuticos y cosméticos) o como alimento natural.<sup>3</sup>

En la producción apícola de nuestro país, el uso de antibióticos se ha generalizado a partir de la aparición de las enfermedades bacterianas de la cría. Esta práctica se encuentra ampliamente difundida, siendo las tetraciclinas (TCs) en su forma de clorhidrato los antibióticos más comúnmente utilizados. Los medicamentos deben ser usados para tratar enfermedades de la abeja durante el periodo no nectarífero; sin embargo, muchas veces se utilizan en épocas de abundancia de néctar y en concentraciones elevadas lo cual ocasiona un fuerte impacto en la calidad de la miel; ya que las abejas lo depositan en las celdas, junto al néctar de las flores, y pasa a formar parte del producto.<sup>12</sup>

Debido a lo anterior, ha aumentado la preocupación de los consumidores y apicultores por la posible presencia de antibióticos y sulfonamidas en la miel. Siendo algunas veces el interés desproporcionado en relación con el real riesgo toxicológico del medicamento y el valor económico del mercado de la miel.<sup>13</sup>

## **2.2. LA APICULTURA**

La apicultura se refiere a la actividad agrícola del manejo y crianza de la abeja *Apis mellifera* con el objeto de obtener miel y otros productos como polen, jalea real y propóleos,<sup>14</sup> los cuales representan una gran fuente de riqueza por los múltiples beneficios que se pueden obtener a través de la explotación artesanal o industrial.<sup>15</sup>

La existencia de la abeja melífera data de tiempos anteriores a la existencia del hombre y las primeras evidencias de contacto entre ambos llegan a través de pinturas rupestres. En las cercanías de ToghwanaDam, en MatopoHills, Zimbabwe, puede encontrarse una pintura rupestre, que data del período mesolítico (7,000 a.C.) situada en una caverna, cerca de la ciudad de Valencia, España. Otro ejemplo, es una pintura correspondiente al período paleolítico, aproximadamente 30,000 a 10,000 a.C. Las distintas civilizaciones de la historia utilizaron diferentes materiales y diseños para alojar a las colonias de abejas. Los egipcios utilizaban recintos cilíndricos hechos de barro (3,000 a 2,000 a.C.) y las culturas aborígenes americanas, empleaban la arcilla como material para instalar enjambres.<sup>16</sup>

La apicultura propiamente dicha, comenzó cuando el hombre aprendió a proteger, cuidar y controlar las colonias de abejas que encontraba, por ejemplo, en árboles. A partir del siglo XVI, el hombre comienza a preocuparse por la producción de miel, el cuidado de la colmena y el estudio biológico de las abejas. En el año 1851, Langstroth revolucionó la apicultura, diseñando una colmena con techo desmontable y cuadros móviles, dispositivos fundamentales en la apicultura moderna. Con el creciente aumento en la producción apícola, llegó al continente americano, originaria de Europa, la especie melífera de abejas “*Apis mellifera*”, que asumió el rol prioritario en la apicultura.<sup>16</sup>

Los principales productos apícolas, son:<sup>16</sup>

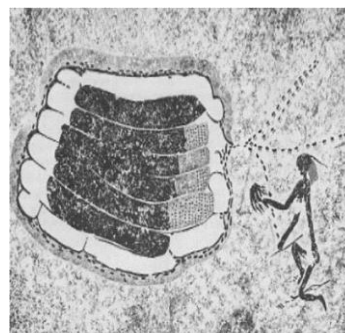
- a) **Miel:** Es el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores que las mismas recogen y almacenan en panales, donde maduran hasta completar su formación.
- b) **Polen:** Es el elemento masculino de las flores, recogido por las abejas obreras depositado en la colmena y aglutinado en granos por sustancias elaboradas por las mismas abejas.
- c) **Jalea real:** Es el alimento de la larva de la abeja reina hasta el tercer o cuarto día de vida y está constituido por la secreción de las glándulas de la cabeza de abejas jóvenes (5-15 días de vida).
- d) **Propóleos:** Es una sustancia de consistencia viscosa, compuesto por resinas, ceras, aceites esenciales y polen, con olor y sabor característico, que cumple diferentes funciones dentro de la colmena.



**Figura 1. Pintura rupestre correspondiente al periodo mesolítico.**

Entre otros productos de la colmena, se pueden mencionar:

- 1. **Cera de abeja:** Es un producto segregado por las glándulas ceríferas de las abejas, de composición muy compleja, que solidifica en la colmena. Se utiliza como ingrediente para ungüentos, velas y jabones, y como agente impermeabilizante para la madera y el cuero.
- 2. **Apitoxina:** Es el veneno de la abeja, incoloro y soluble en agua. En la actualidad se estudian sus propiedades medicinales.



**Figura 2. Pintura rupestre correspondiente al periodo paleolítico**



### 2.3. LA APICULTURA EN EL SALVADOR

La apicultura se inició en El Salvador en la época colonial con la introducción de las abejas melíferas conocidas “extranjeras”, de “castilla”, “negras”, o “alemanas”, cuyo nombre científico es *Apis Mellifera*, las cuales son originarias de Europa y África.<sup>17</sup>

Posterior a la Colonia, algunos apicultores importaron abejas de otras razas europeas y caucásicas. La mansedumbre de estas razas permitió mantener colmenas en bancos colectivos y en algunos casos hasta se colocaban en los patios de las viviendas rurales.<sup>18</sup>

La apicultura salvadoreña creció en el siglo XIX y gran parte del siglo XX con una serie de limitantes: entre ellas, la carencia de leyes que regulen y controlen la producción, resistencia de algunos apicultores a la adquisición de nueva tecnología, la falta de uniformidad del material apícola y el inadecuado sistema de financiamiento.<sup>18</sup>

En 1976, con el fin de impulsar el desarrollo apícola y otras especies, el gobierno (por medio del Ministerio de Agricultura y Ganadería) implementó un programa de especies de abejas sin aguijón. En 1980, este programa se fortaleció con el proyecto “Fomento de la Apicultura”, financiado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés). En 1984, el Banco Central de Reserva de El Salvador, abrió a través de bancos comerciales, una línea especial de créditos para la producción de miel.<sup>19</sup>

Ante la amenaza de la africanización de los apiarios, la FAO, en 1985, favoreció a los apicultores con el proyecto “Apoyo al Plan de Emergencia para el Control de Abeja Africanizada”, que capacitó adecuadamente a técnicos y productores de manera que el impacto en la producción fuera minimizado. Esto además se logró por la adaptación de la mayoría de los apicultores a las abejas africanizadas, ya que cambiaron la ubicación de los apiarios y utilizaron la vestimenta protectora. Se calcularon 190,000 colmenas antes del proceso de africanización y posteriormente a este, la población se redujo a 175,000 colmenas.<sup>18</sup>

La organización de los apicultores comenzó en 1980 con la fundación de la Sociedad Cooperativa de Apicultores de El Salvador (SCAES). En 1987 se organizó la Asociación Cooperativa de Comercialización, Aprovechamiento, Ahorro y Crédito de Apicultores “La Libertad”. A partir de 1996 algunas organizaciones no gubernamentales comenzaron a

desarrollar proyectos apícolas en comunidades de escasos recursos y áreas de bosques.<sup>19</sup> Ante la amenaza de la varroasis (enfermedad en las abejas producida por el ácaro parásito varroa) en 1996, los sectores involucrados con la apicultura (productores, exportadores, Ministerio de Agricultura y Ganadería y Universidad de El Salvador) comenzaron a reunirse para analizar su impacto en el país. Para 1998, se formó la Comisión Nacional Apícola de El Salvador (CONAPIS), una entidad jurídica, ajena a toda actividad política, religiosa o lucrativa, destinada a promover, fomentar y proteger la producción de miel de abeja y otros productos apícolas. Los principales logros de esta comisión son la coordinación en el uso de acaricidas para el control de la varroasis y la elaboración de la normativa de la calidad de miel en El Salvador, por medio de un comité formado por representantes de CONAPIS, Ministerio de Economía, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de El Salvador y la Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”.<sup>18</sup>

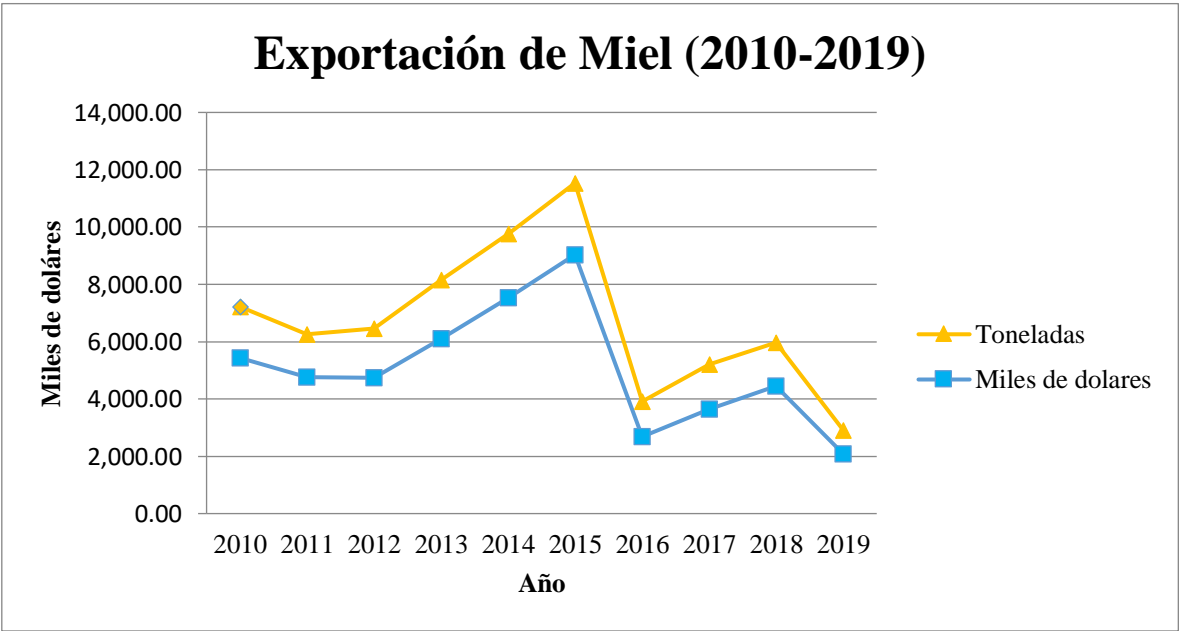
Hoy en día, la apicultura se ha convertido en una actividad agrícola muy importante en todo el globo.<sup>14</sup> Según datos estadísticos de la página de estadísticas de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT), la producción de miel a nivel mundial en el año 2019 fue de 1,852,598 toneladas, y los 10 países con los mayores volúmenes en el mismo año se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1: Principales países productores de Miel en el 2019<sup>20</sup>**

<b>Posición</b>	<b>Región</b>	<b>Producción (T)</b>
<b>1</b>	China, Continental	444,100
<b>2</b>	Turquía	109,330
<b>3</b>	Canada	80,345
<b>4</b>	Argentina	78,927
<b>5</b>	Irán (Republica Islámica)	75,463
<b>6</b>	Estados Unidos de América	71,179
<b>7</b>	Ucrania	69,937
<b>8</b>	India	67,141
<b>9</b>	Federación de Rusia	63,526
<b>10</b>	México	61,986

Destacan a nivel latinoamericano Argentina y México, que son también los países con mayor extensión territorial de la región. Según la misma fuente, Centroamérica tuvo en el 2019 una producción de 9,162 toneladas, de las cuales El Salvador produjo 1,678, situado sólo por debajo de Guatemala que alcanzó 5,981 toneladas.<sup>20</sup>

De acuerdo con información disponible en el Sistema de Estadísticas de Comercio de Centroamérica, la exportación de miel en El Salvador fue de 827.6 toneladas para el año 2019. La figura 3 muestra el comportamiento de la exportación de miel en los últimos 9 años, esta información es de la Base de Datos del SIECA.<sup>21</sup>



**Figura 3: Tendencias de la Exportación de Miel Salvadoreña desde 2010 hasta el 2019<sup>21</sup>**

**2.4 MIEL DE ABEJA<sup>22</sup>**

La miel es el producto alimenticio creado 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 las mismas, que las abejas recogen, transforman, almacenan y dejan madurar en los panales de colmena.

## 2.4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La miel es una mezcla muy compleja de sustancias ya que su procedencia es diversa y varía según diferentes factores como la situación geográfica, la época del año, la vegetación circundante a la colmena, entre otras.<sup>14</sup> La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente glucosa y fructosa. Además, contiene proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, sustancias minerales, polen y puede contener otros azúcares: sacarosa, maltosa, melecitosa y otros oligosacáridos (incluidas las dextrinas), así como vestigios de hongos, algas, levaduras y otras partículas sólidas, como consecuencia del proceso de obtención de la miel.<sup>22</sup>

Como referencia, en la tabla 2 se muestran los datos promedios obtenidos del resultado del análisis de 492 muestras de miel <sup>23</sup>

**Tabla 2: Composición Química promedio de la miel<sup>23</sup>**

Composición	Promedio	Contenido
Humedad	17.2	13.4 - 22.9 %
Fructosa	38.2	27.2 - 44.3 %
Glucosa	31.3	22.0 - 40.7 %
Sacarosa	1.3	0.2 - 7.6 %
Maltosa	7.3	2.7 - 16.0 %
Azúcares mayores	1.5	0.1 - 8.5 %
Ácido libre (Glucónico)	0.43	0.13 - 0.92 %
Lactona (Gluconolactona)	0.14	0.0 - 0.37 %
Ácido total (Glucónico)	0.57	0.17 - 1.17 %
Cenizas	0.17	0.02 - 0.03 %
Nitrógeno	0.04	0.00 - 0.13 %
pH	3.91	3.42 - 6.10

### 2.4.1.1 HUMEDAD<sup>24</sup>

El contenido de humedad es una de las características más importantes de la miel y está en función de ciertos factores tales como los ambientales y de contenido de humedad del néctar.

La miel madura tiene normalmente un contenido de humedad por debajo del 18.5% y cuando se excede de este nivel, es susceptible a fermentar, particularmente cuando la cantidad de levaduras osmofílicas es suficientemente alta. Además, el contenido de agua en la miel influye en su viscosidad, peso específico y color, condicionando así la conservación y cualidades organolépticas de este producto. Después de la extracción de la miel de la colmena, su contenido de humedad puede cambiar dependiendo de las condiciones de almacenamiento.

#### **2.4.1.2 CARBOHIDRATOS (GLÚCIDOS)<sup>25</sup>**

Los carbohidratos (o azúcares) son los componentes mayoritarios en la miel, variando su contenido entre el 60 y 80%, siendo los principales la fructosa (38%), glucosa (31%) y sacarosa (5%), contenidos que varían considerablemente entre una miel y otra. Por otro lado, se han identificado más de 20 oligosacáridos como la maltosa. La sacarosa está relacionada con el grado de maduración de la miel por lo que su valor debe ser menor al 5%; siendo el contenido máximo permitido por la mayoría de los países.

#### **2.4.1.3 PROTEÍNAS<sup>26</sup>**

Las proteínas en la miel se encuentran en cantidades muy pequeñas, procedentes del néctar o de las propias secreciones salivares de las abejas. Destaca la presencia de albúminas, globulinas, proteasas y peptonas. El contenido de proteínas en mieles centrifugadas oscila entre el 0.4% al 0.26%.

#### **2.4.1.4 MINERALES**

Se encuentran ampliamente representadas en la miel, aunque las proporciones varían según el origen floral y geográfico de ésta, cuanto más oscura sea la miel, mayor será el contenido de sales minerales. Se ha determinado en mayor proporción el potasio, además se han encontrado minerales como sodio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso, cloro entre otros, y elementos trazas como zinc, níquel y otros.<sup>26</sup>

#### **2.4.1.5 ENZIMAS**

Las enzimas son añadidas principalmente por las abejas, aunque algunas pocas proceden de las plantas. Las abejas añaden enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a

miel y éstas son en gran parte las responsables de la complejidad composicional de esta última. Las principales son la glucosa-oxidasa, la invertasa, y otras enzimas como las amilasas y catalasa; de estas últimas aún se sabe poco en cuanto a su efecto y contenido en las mieles.<sup>25, 27</sup>

#### **2.4.1.6 ÁCIDOS ORGÁNICOS**

Proporcionan el carácter ácido a la miel, cuyo pH medio es de 3.5 y le confieren parte de las propiedades antisépticas que posee. El principal es el ácido glucónico, producido por la fermentación aeróbica de la glucosa por enzimas de ciertas bacterias (*Acetobacter*) y mohos (*Aspergillus*). Otros ácidos presentes en pequeñas cantidades son el acético, cítrico, succínico, fórmico, málico, maléico y oxálico.<sup>25,26</sup>

#### **2.4.1.7 SUSTANCIAS AROMÁTICAS**

En la miel se han aislado ésteres de ácidos alifáticos y aromáticos, aldehídos, cetonas y alcoholes.<sup>25</sup>

### **2.5 NORMATIVAS NACIONAL, REGIONAL Y EUROPEA**

De acuerdo con la Corporación de Exportadores de El Salvador (Coexport), el 80 por ciento de la miel producida en El Salvador se destina a exportaciones a Europa y el resto se dirige hacia el mercado regional y nacional.<sup>8</sup> Por lo tanto, las instituciones del área agropecuaria tanto nacional, regional y europeo han creado una serie de normativas con la finalidad de garantizar la calidad de la miel.<sup>14</sup>

Las normas están homologadas a nivel centroamericano y las prácticas apícolas están supervisadas a nivel nacional por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), a nivel regional por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) y a nivel europeo se regula la miel de acuerdo con la Directiva del Consejo 2001/110/EC.<sup>14</sup>

La Norma Salvadoreña de Miel de Abeja, define los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que son indicadores de calidad reconocidos mundialmente. Además, existen otros elementos normativos como el Manual de Buenas Prácticas Apícolas, (elaborado en el 2004 por organismos que promueven actividades apícolas en Centroamérica, siendo la Comisión Nacional Apícola de El Salvador, “CONAPIS”, la contraparte salvadoreña), y el

Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para Plantas Exportadoras de Miel de Abeja (elaborado por el OIRSA en el 2007) que regulan la cadena de producción de la miel desde la extracción correcta de la colmena hasta su exposición en el mercado. Esta documentación es evidencia que las instancias responsables de las actividades agrícolas en la región han realizado esfuerzos importantes que han permitido que la apicultura se desarrolle notablemente en el país.<sup>14</sup>

## 2.6 SANIDAD APÍCOLA

Para garantizar la calidad e inocuidad de la miel es importante mantener la colmena libre de contaminantes, así como también mantener un control sobre las enfermedades y plagas que afectan a las abejas, en ese sentido el apicultor debe estar alerta a fin de que las medidas de diagnóstico, prevención, control, vigilancia y muestreo sean aplicadas correctamente, lo que permitirá obtener productos apícolas de calidad.<sup>28</sup>

Los productos de las abejas pueden estar contaminados a través de diferentes fuentes, las cuales se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3: Tipos de contaminación de la miel<sup>29</sup>.**

<b>A) Contaminantes ambientales</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Metales tóxicos como el plomo, cadmio y mercurio.</li> <li>2) Isotopos radioactivos</li> <li>3) Contaminantes orgánicos, bifenilos policlorados (PCB's)</li> <li>4) Plaguicidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas)</li> <li>5) Bacterias patógenas</li> <li>6) Organismos modificados genéticamente</li> </ol>
<b>B) Contaminantes apícolas</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Acaricidas: compuestos sintéticos lipófilos y sustancias no tóxicas tales como ácidos orgánicos y componentes de aceites esenciales.</li> <li>2) Antibióticos utilizados para el control de enfermedades de crías de abejas, principalmente tetraciclinas, estreptomycinas, sulfonamidas y cloranfenicol</li> <li>3) Paradiclorobenceno, utilizado para el control de la polilla de cera y repelentes químicos</li> </ol>

En la Norma Salvadoreña, se encuentran establecidos los límites máximos permitidos de productos veterinarios y contaminantes ambientales en la miel, descritos en la tabla 4

**Tabla 4. Límites máximos permitidos de productos veterinarios y contaminantes ambientales en la miel**<sup>22</sup>

Grupo de sustancias	Sustancias	LMR ( $\mu\text{g. kg}^{-1}$ )
Antibióticos	Estreptomicina (CAS 57-92-1) **	200
	Oxitetraciclina (CAS 79-57-2)	100
	Cloranfenicol (CAS 56-75-7)	0.3
	Nitrofurano - AHD (CAS 2827-56-7)	0.5
	Nitrofurano - AMOZ (CAS 43056-63-9)	0.5
	Nitrofurano - AOZ (CAS 80-65-9)	0.5
	Nitrofurano – SEM (CAS 563-41-7)	0.5
Piretroides	Flumetrina (CAS 69770-45-2)	No requiere
	Tau fluvalinato (CAS 102851-06-9)	No requiere
Derivados de la tiazolidina	Ciamizol (CAS 61676-87-7)	1000
Formamidina	Amitraz (CAS 33089-61-1)	200
Ácidos orgánicos	Cualquier tipo	No requiere
Organofosforados	Coumaphos (CAS 56-72-4)	100
Metales tóxicos	Plomo/Pb (CAS 7439-92-1)	50
	Cadmio/Cd (CAS 7440-43-9)	25
	Mercurio/Hg (CAS 7439-97-6)	25

\*\*CAS: Chemical Abstracts Service

### 2.6.1 ANTIBIÓTICOS EN LA MIEL<sup>29</sup>

Los antibióticos pueden encontrarse como residuos en la miel debido a su utilización en la apicultura para el tratamiento de enfermedades bacterianas, como, la enfermedad de la loque europea y las enfermedades de las loqueas americanas causadas por las larvas de *Paenibacillus (Bacillus)* y por las bacterias *Streptococcus pluton*, respectivamente. Los residuos de antibióticos se originan principalmente del medio ambiente y de las prácticas



inadecuadas de la apicultura. Algunos antibióticos que se utilizan son cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, lincomicina, monensina, estreptomina y enrofloxacin.

Se han encontrado residuos de oxitetraciclina (la cual forma parte de las tetraciclinas y será estudiada en este trabajo), por encima de los estándares normativos de la miel, de igual manera ha sucedido con cloranfenicol.

Los residuos de antibióticos en la miel se han convertido en una preocupación importante para el consumidor ya que algunos fármacos tienen el potencial de producir reacciones tóxicas en los consumidores directamente, mientras que otros pueden producir reacciones alérgicas o de hipersensibilidad. Los antibióticos de lactama causan erupciones cutáneas, dermatitis, síntomas gastrointestinales y anafilaxia a dosis muy bajas. Los efectos a largo plazo de la exposición a los residuos de antibióticos incluyen riesgos microbiológicos, carcinogenicidad, efectos reproductivos y teratogenicidad.

Además, estos residuos consumidos junto con la comida y la miel pueden producir resistencia en poblaciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública mundial y sigue siendo un problema difícil. Los centros para el control y la prevención de enfermedades han descrito la resistencia a los antibióticos como "uno de los problemas de salud más urgentes del mundo", debido a que "el número de bacterias resistentes a los antibióticos ha aumentado y muchas infecciones bacterianas se están volviendo resistentes a los más comunes.

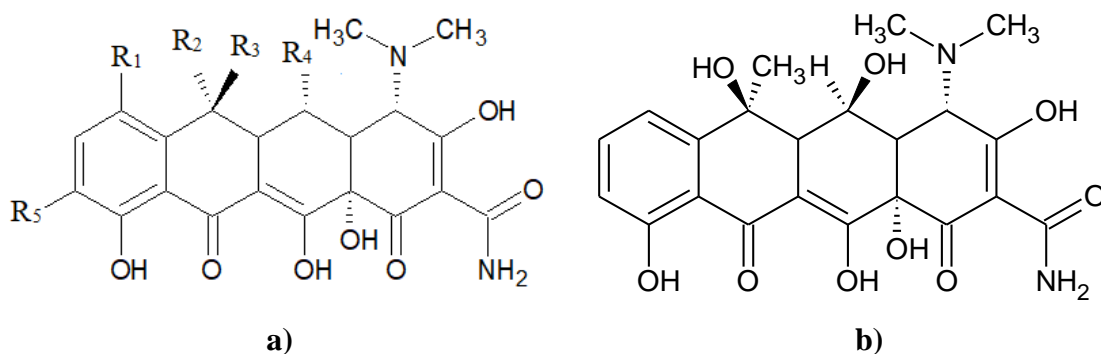
La OMS ha identificado la resistencia a los antibióticos como "una de las tres mayores amenazas para la salud humana". La causa principal es la exposición a largo plazo a los antibióticos a través de su uso como medicamentos en humanos y animales, horticultura y para la conservación de alimentos. Los tipos de antibióticos utilizados en los animales son frecuentemente similares a los utilizados en humanos.

Como ya se ha mencionado antes, uno de los antibióticos más utilizados ante el tratamiento de enfermedades en los apiarios es la Oxitetraciclina, y siendo necesario que exista un control de residuos de este antibiótico, es importante que se cumplan con las normas nacionales, regionales y europeas para que los productos apícolas y en específico la miel, puedan salir al mercado y además pueda ser exportado.

## 2.6.2. OXITETRACICLINA<sup>30</sup>

La oxitetraciclina, antibiótico de amplio uso en medicina veterinaria, pertenece al grupo de las tetraciclinas (Figura 4a). Inhibe la síntesis de proteínas en la bacteria a nivel ribosomal. La oxitetraciclina presenta principalmente una acción bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como también frente a otros microorganismos tales como micoplasmas, espiroquetas, clamidias y rickettsias. Se clasifica en la actualidad de acuerdo con la cinética de muerte bacteriana como codependiente.

La oxitetraciclina en particular es un polvo cristalino amarillo, soluble en agua y que se disuelve en soluciones diluidas de ácidos o bases. El peso molecular de la oxitetraciclina es de 460.434 g/mol. El nombre IUPAC para la oxitetraciclina es (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,12,12-a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,12,12a-octa hidrotetraceno-2-carboxamida; siendo su fórmula química abreviada C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>. (Figura 4 b). Su CAS (Chemical Abstract Service) es el 79-57-2.



**Figura 4. a) Estructura química del grupo de tetraciclinas. b) Fórmula química de la oxitetraciclina**

## 2.7 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

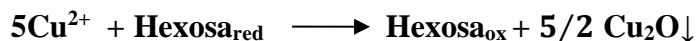
### 2.7.1 HUMEDAD<sup>2</sup>

La determinación del contenido de humedad en esta investigación se realizó por el método refractométrico, basado en la medida del índice de refracción de la miel; utilizando un

refractómetro de Abbe, corregido a una temperatura de 20° C. A partir de los valores obtenidos y luego de las correcciones aplicadas, se calculó la humedad, utilizando la equivalencia mediante la tabla de Chataway (Anexo 1).

### 2.7.2 AZÚCARES REDUCTORES

Dentro de los métodos químicos para la determinación de azúcares están los métodos reductométricos, que se basan en la capacidad reductora de los distintos azúcares sobre disoluciones salinas de metales pesados (como el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), el hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o el yodo (I). Los monosacáridos, como la glucosa y la fructosa, se encuentran en forma hemiacetálica, con el grupo carbonilo libre. En disolución alcalina, la estructura hemiacetálica se rompe y el grupo carbonilo reductor se libera. En el caso específico del cobre, éste es reducido desde  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  en disolución alcalina, a temperatura de ebullición y en condiciones de trabajo estrictamente controladas, formándose finalmente un precipitado de óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), que dependerá de la cantidad de azúcar que hubiera.<sup>31</sup>



**Figura 5. Reacción propuesta entre un azúcar reductor y  $\text{Cu}^{2+}$**

De acuerdo con Preza De la Vega en el año 2007, la relación estequiométrica de la reacción de Fehling es que un mol de azúcar reductor reacciona con 5 moles de  $\text{Cu}^{2+}$  presentes en el licor de Fehling.<sup>32</sup>

La Norma Salvadoreña para Miel de Abeja establece un porcentaje mínimo de azúcares reductores del 60% para miel de flores y del 65% para miel de mielato y su mezcla con miel de flores.<sup>25</sup>

### 2.7.3 CENIZAS

El contenido de sustancias minerales (cenizas) en la miel, se puede determinar en forma indirecta sobre la base de la conductividad eléctrica (Método Bianchi). La misma es una medida de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Las soluciones de electrolito conducen una corriente eléctrica por la migración de iones bajo la influencia de un campo eléctrico. Puede incluirse la miel entre los conductores eléctricos

secundarios ya que, además de azúcares y el agua que en estado puro ofrecen una gran resistencia a la corriente eléctrica, contiene también electrolitos, es decir, sustancias capaces de formar iones. En la miel estos están constituidos por las sales minerales, los ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.<sup>33</sup>

La correlación lineal existente entre la conductividad eléctrica de la miel y su contenido en cenizas ha sido encontrada de forma empírica, siendo posible la determinación del contenido en sales minerales a través de la medida conductividad eléctrica, y la aplicación de la siguiente ecuación:

$$X = 1.74 A + 0.14$$

en donde “X”, es la conductividad específica ( $\text{mS. cm}^{-1}$ ) y “A”, el porcentaje de cenizas. Los valores de la pendiente (1.74) y de la ordenada al origen (0.14) se obtuvieron luego de realizar un estudio de la correlación entre el porcentaje de cenizas (determinado por el residuo de la calcinación de una masa de miel conocida) y la conductividad eléctrica medida de una disolución acuosa de miel<sup>25</sup>.

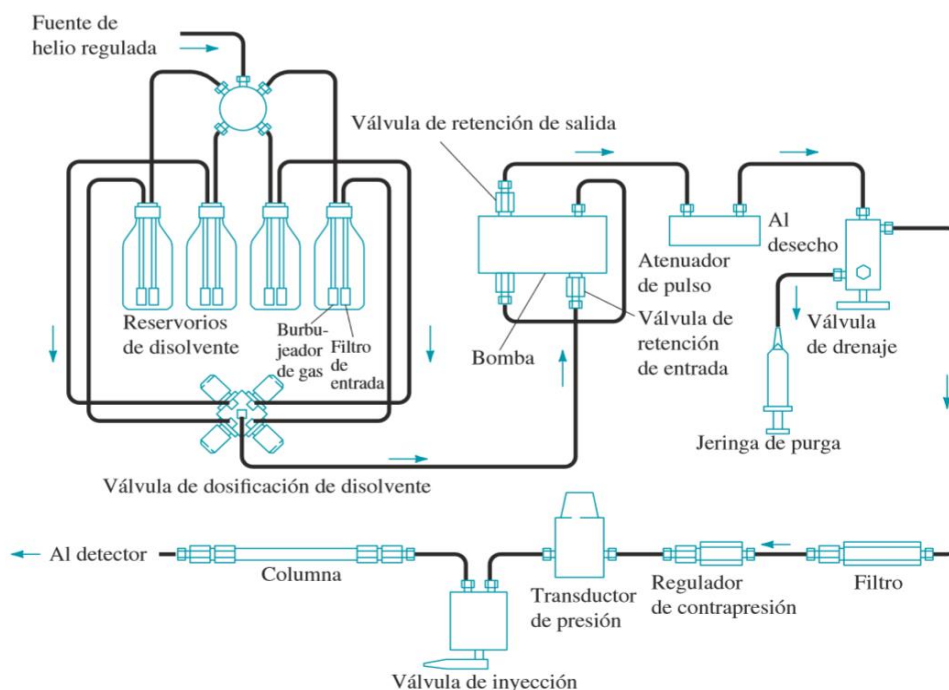
La Norma Salvadoreña para Miel de Abeja no contempla el contenido de cenizas en sus requisitos.<sup>25</sup>

#### **2.7.4 pH<sup>34</sup>**

El pH es un parámetro de gran importancia a evaluar durante la obtención y almacenamiento de los alimentos por su influencia sobre el desarrollo de microorganismos y enzimas. Además, afecta las propiedades físicas del producto como la textura, estabilidad y resistencia. El pH de la miel se halla muy condicionado por el contenido de sales minerales, en especial de potasio, sodio y calcio. Por otro lado, en mieles de mielada puede aumentar su valor debido al efecto regulador de las sales tampones que contiene. El pH de la miel oscila entre 3.4 y 6.1 con una media de 3.9. Esta variación depende de la procedencia botánica, siendo generalmente inferior o igual a 4.0 para mieles de tipo floral y superior a ese valor para mieles de mielada.

## 2.8 TÉCNICAS A UTILIZAR

### 2.8.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA



**Figura 6. Diagrama de bloques que muestra los componentes de un típico equipo de HPLC<sup>38</sup>**

La cromatografía es un método ampliamente utilizado para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan poderoso y generalmente aplicable como la cromatografía.<sup>35</sup>

La cromatografía es un método físico de separación en que los componentes a ser separados están distribuidos entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y la otra (fase móvil) que se mueve en una dirección definida.<sup>36</sup>

La cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es un tipo de cromatografía que combina una fase móvil líquida y una fase estacionaria empaquetadas en una columna. Con el fin de obtener velocidades de flujo satisfactorias que reduzcan el tiempo de análisis y que optimicen la separación de analitos, el líquido debe ser presurizado a varios cientos de libras por pulgada cuadrada para alcanzar velocidades de flujo razonables (0.1 a 10 mL. Min<sup>-1</sup>).<sup>37</sup>

En principio se utilizó una alta presión para incrementar la velocidad lineal y reducir la difusión de los compuestos en el interior de las columnas empaquetadas, mejorando así la resolución de la cromatografía. Se emplearon para ello bombas capaces de generar hasta 500 psi. En la década de los 70 la tecnología empleada experimentó grandes avances, con bombas capaces de generar hasta 6000 psi, mejores inyectoros, detectores y columnas con partículas más pequeñas; en ese momento se mantuvo el acrónimo de HPLC, pero el nombre pasó a ser cromatografía líquida de alta eficacia.<sup>38</sup>

## **2.8.1.1 CARACTERÍSTICAS INSTRUMENTALES DE HPLC**

### **2.8.1.1.1 SISTEMAS DE BOMBEO**

Un sistema de bombeo de HPLC debe ser capaz de generar elevadas presiones, producir un flujo libre de pulsaciones, conseguir un amplio intervalo de caudales con elevada reproducibilidad y estar dotado de componentes resistentes a la corrosión.<sup>38</sup>

La bomba cromatográfica impele la fase móvil al flujo seleccionado dotándola de la presión necesaria para atravesar la columna y el resto del sistema.<sup>39</sup>

Las bombas empleadas pueden ser de dos tipos: de flujo constante y de presión constante. En esta investigación se utilizó una bomba de flujo constante, específicamente de pistón; las cuales consisten en una cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre. El flujo de disolvente hacia dentro y hacia fuera del sistema es controlado por dos válvulas de cierre de bola, que se abren y se cierran alternativamente. Con este diseño el disolvente estaría en contacto directo con el pistón. Una desventaja de las bombas de pistón es el flujo pulsado que producen; este problema se puede solucionar utilizando bombas con dos pistones que al trabajar en serie o en paralelo consiguen un flujo constante, a pesar de que los cambios de viscosidad o de temperatura teóricamente deberían afectar al flujo bombeado. Las ventajas de estas bombas son múltiples: su pequeño volumen interno, sus altas presiones de salida, su fácil adaptación a los gradientes y sus caudales constantes, prácticamente independientes de la columna y de la viscosidad del disolvente.<sup>38,39</sup>

Otra de las características del sistema de bombeo utilizado en esta investigación es su sistema cuaternario con una sola bomba y una válvula para mezclar hasta cuatro disolventes. Dicho

sistema opera en caudales analíticos a semipreparados (máx. 10 mL. Min<sup>-1</sup>) y en todo el rango de presión de HPLC, hasta 19.000 psi, sin comprometer el rendimiento del gradiente. La válvula cuaternaria también funciona como un selector de disolvente que añade diferentes relaciones de disolvente para el ajuste del pH o del modificador de fase móvil. Cuando se configuran 2 bombas con una válvula cuaternaria cada una, el gradiente binario de alta presión resultante permite al analista seleccionar cualquiera de los 4 disolventes de cada bomba, creando un sistema automático de desarrollo de métodos con 16 pares de fases móviles.<sup>40</sup>

#### **2.8.1.1.2 SISTEMA DE INYECCIÓN<sup>38</sup>**

Los sistemas de inyección hacen posible la introducción de la muestra sin despresurizar el sistema y sin sobrecargar la columna. Habitualmente la muestra se suele introducir mediante bucles de muestra, dispositivos integrados en el equipo e intercambiables que permiten variar el volumen de muestra inyectado. Por otro lado, la mayor parte de los sistemas de HPLC utilizan inyectores automáticos, si bien suele ser también posible la introducción de la muestra de manera manual. Los sistemas de inyección son un componente fundamental del HPLC, ya que un factor limitante en la precisión de una separación cromatografía es la reproducibilidad con la que se pueda introducir la muestra en la columna.

El equipo utilizado en esta investigación cuenta con un sistema automatizado de inyección que garantiza la reproducibilidad de la introducción de la muestra durante el análisis cromatográfico.

#### **2.8.1.1.3 FASE MÓVIL (ELUCIÓN ISOCRÁTICA Y POR GRADIENTE)<sup>38</sup>**

Existen dos modos básicos de elución: isocrático y por gradiente. En el primero de ellos y el cual fue el que se utilizó en la presente investigación, la composición de la fase móvil (que puede ser un disolvente puro o una mezcla) permanece constante a lo largo de cada inyección. Por otro lado, en el modo gradiente, la composición de la fase móvil cambia durante la separación, de manera continua o escalonadamente. El modo gradiente se suele utilizar para muestras que contienen compuestos con un amplio rango de polaridad cromatográfica, aumentando de manera significativa la eficacia de separación. En este caso, la fuerza de elución de la fase móvil se incrementa a medida que la separación tiene lugar, con la finalidad

de conseguir que los componentes de la muestra más fuertemente retenidos sean eluidos. El mezclador de las fases móviles puede estar situado después de las bombas, con lo que el gradiente se crea en alta presión, o antes de una sola bomba común, con lo que el gradiente se crea en baja presión y una válvula de mezcla selecciona la proporción de cada uno de los disolventes empleados.

#### **2.8.1.1.4 COLUMNAS<sup>38</sup>**

Las columnas son un elemento esencial para que transcurra la separación cromatográfica. La fase estacionaria está contenida en un tubo con terminaciones, aislada por ambos lados, que debe ser capaz de contener la presión generada en su interior tanto durante su fabricación como durante su uso. Las columnas deben proporcionar un camino controlado y adecuado para la entrada y la salida de la muestra, sin fugas, con el mínimo volumen posible y sin volúmenes muertos. Además, deben ser químicamente inertes respecto al sistema de separación (muestra, fase móvil y fase estacionaria). La mayor parte de las columnas están construidas en acero inoxidable para conseguir la mayor resistencia posible a la presión.

Otro parámetro que diferencia las columnas cromatográficas entre sí es su relleno. Existen dos tipos básicos de relleno: pelicular y de partícula porosa. El primero consiste en bolas de vidrio o de polímero, no porosas y esféricas, con diámetro de 30 a 40 micras; en su superficie se deposita una capa delgada y porosa, que suele ser de sílice, de alúmina, de una resina sintética de poliestireno- divinilbenceno o de una resina de intercambio iónico. El recubrimiento también puede ser una fase estacionaria líquida que se mantiene fija por adsorción, una capa superficial orgánica.

Los rellenos de partícula porosa están formados por micropartículas porosas de pequeño diámetro y con la menor dispersión posible, las cuales pueden ser de sílice, alúmina, resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico. Las partículas de sílice se preparan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores en unas condiciones tales que se forman partículas mayores de diámetros muy uniformes. Las partículas resultantes a menudo se recubren con partículas orgánicas unidas física o químicamente a la superficie.

La resolución cromatográfica es el grado de separación conseguido para dos componentes de una mezcla. Hay dos factores principales que determinan el poder de separación o resolución



que se puede alcanzar en una columna de HPLC: el poder de separación mecánico, debido a la longitud de la columna, el tamaño de partícula y la uniformidad del empaquetamiento; y el poder de separación químico, debido a la competición fisicoquímica de los compuestos de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. La eficiencia mide el poder de separación mecánico y la selectividad mide el poder de separación químico.

El poder de separación mecánico en una columna estable y uniformemente empaquetada está determinado por su longitud y su tamaño de partícula y a menudo se mide y se compara por el número de platos (N). Los tamaños de partícula más pequeños producen mayor eficiencia y presión. Si se mantiene constante el tamaño de partícula se conseguirá mayor separación mecánica cuanto mayor sea la longitud de la columna. Las desventajas correspondientes son mayores tiempos de elución, mayor consumo de disolventes y mayor presión.

El poder de separación químico vendrá determinado por la combinación de fase móvil y fase estacionaria. Para conseguir una buena separación entre analitos lo mejor es optimizar esta variable y escoger el modo de cromatografía o mecanismo de retención adecuado.

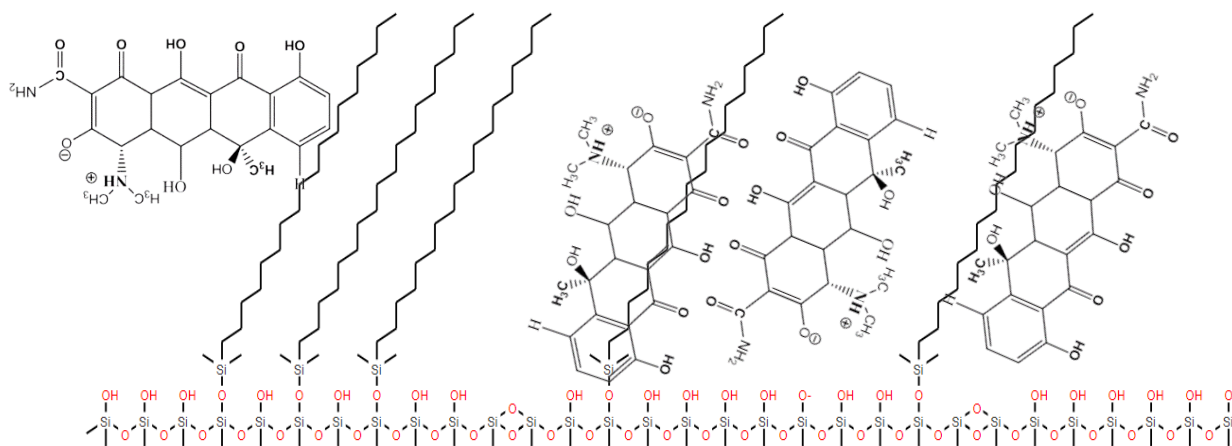
El tipo de columna utilizado en esta investigación tiene un relleno de material poroso; es una columna de octadecilsiloxano monomérico convencionalmente unido químicamente a sílice porosa, adecuada para el análisis de una amplia gama de compuestos, desde ácidos hasta compuestos ligeramente básicos.

#### **2.8.1.1.4.1 SEPARACIONES BASADAS EN LA POLARIDAD**

En este tipo de separaciones el grado de retención de una molécula concreta estará determinado por los grupos funcionales principales que contenga y por su disposición espacial, en función de lo cual habrá moléculas altamente polares y altamente apolares. La regla básica que rige estas separaciones es que moléculas con polaridad cromatográfica similar tienden a atraerse, por ello habría que seleccionar una fase móvil y una fase estacionaria de diferentes polaridades. Los disolventes que forman parte generalmente de las fases móviles se pueden clasificar en series eluotrópicas, en función de su polaridad cromatográfica relativa, yendo desde el más polar, el agua, al menos polar, el hexano, pasando por metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Se podría hacer una clasificación similar para las fases estacionarias. La sílica tiene una superficie hidrofílica que contiene

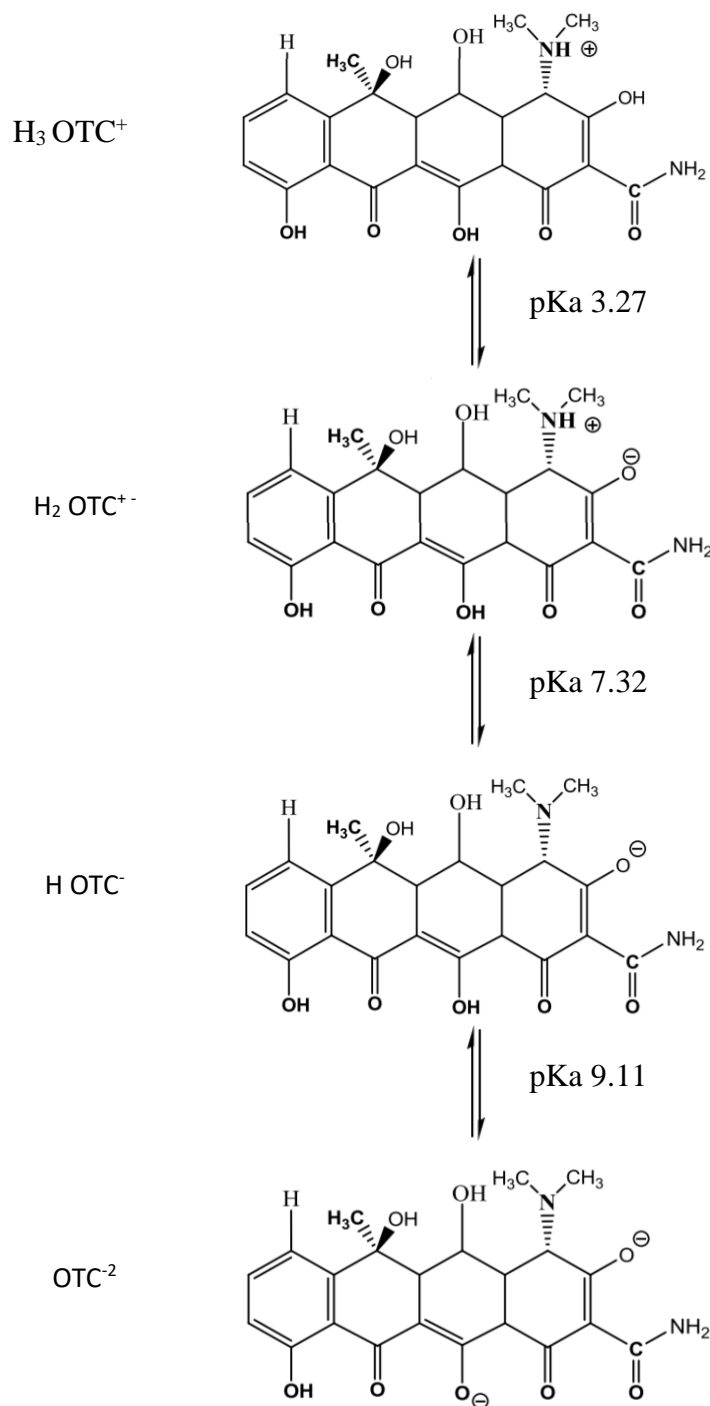
grupos funcionales silanol. La polaridad de dicha superficie puede ser modificada selectivamente uniéndole químicamente grupos funcionales no polares: de cianopropilsilil- (CN), n-octilsilil- (C8) y n-octadecilsilil- (C18, ODS).<sup>38</sup>

En este trabajo se utilizó una columna C18 (Pinnacle II, 5 $\mu$ m, 150x5.6 mm), donde las cadenas hidrofóbicas del relleno de octadecilsiloxano interactuaron con la OTC mediante un proceso de adsorción de fuerzas de van der Waals<sup>41</sup> cómo se observa en la figura 7.



**Figura 7. Propuesta de mecanismo de interacción entre la fase estacionaria de la columna cromatografía y la oxitetraciclina.**

Al observar los grupos químicos presentes en la estructura de la OTC, se cuenta que esta tiene tres constantes de disociación, donde el  $pK_{a1}$  es asignado al grupo tricarbonyl, el  $pK_{a2}$  al grupo dimetilamina y el  $pK_{a3}$  al grupo  $\beta$ -dicetona, lo cual hace que este compuesto presente carga en todo el rango de pH. Así, la OTC posee un comportamiento catiónico bajo un pH 3.27, comportamiento zwitteriónico entre los valores de pH de 3.22 y 7.32, y un comportamiento aniónico entre los valores de pH de 7.32 y 9.11, y un comportamiento diónico sobre pH 9.11 (ver figura 8 y tabla 5).<sup>42</sup> Debido a esto, el ajuste del pH es una etapa muy importante en el análisis de las tetraciclinas.<sup>43</sup> Otra característica importante de la OTC es la gran cantidad de enlaces dobles conjugados, lo que le confiere extensas nubes  $\pi$ , zonas de aromaticidad, y estructuras planas que favorecen interacciones de asociación intra e intermolecular.<sup>42</sup>

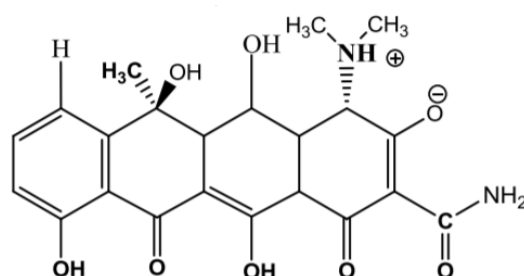


**Figura 8. Equilibrio ácido-base de la OTC. Comportamiento catiónico bajo un pH 3.27; Comportamiento zwitteriónico entre los pHs 3.27 y 7.32; Comportamiento aniónico entre los pHs 7.32 y 9.11; comportamiento dianiónico sobre un pH 9.11.<sup>4</sup>**

**Tabla 5. Sustituyentes y constantes de disociación ácido para tetraciclina (TTC) y la oxitetraciclina (OTC).**<sup>42</sup>

	R1	R2	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
Tetraciclina (TTC)	H	H	3.30	7.68	9.69
Oxitetraciclina (OTC)	H	OH	3.27	7.32	9.11

El pH=4 de la fase móvil utilizado en esta investigación condicionó el comportamiento zwitteriónico de la molécula de OTC, como se muestra en la figura 9.



**Figura 9. Estructura zwitteriónica de la OTC entre pH 3.27 y 7.32**

En la fase estacionaria todos los grupos silanol (Si-OH) residual se encuentran prácticamente protonados a un pH=2-3. Sin embargo, a pH por encima de 3, el silanol puede disociarse para formar Si-O<sup>-</sup>, ocasionando la retención de la OTC a través del grupo dimetilamino protonado<sup>44</sup>. Además de esto, la OTC en presencia de iones metálicos y la adsorción en el grupo silano fácilmente puede formar un complejo de quelato en la columna de fase inversa, debido a la presencia de dos grupos cetonas en su estructura, lo que origina la formación de picos cola durante el análisis. Para evitar la formación de complejos de quelatos y su adsorción en columnas de fase inversa se utilizó ácido oxálico como un agente de supresión de ionización; el cual, minimiza la aparición de mecanismos de separación mixtos para el antibiótico y mitiga eficazmente la ionización incompleta, producto de los silanoles residuales en la fase estacionaria. La concentración de la disolución del ácido (0.01 M) contribuye, además, en la mejora de la simetría del pico cromatográfico.<sup>45</sup>

### **2.8.1.1.5 DETECTORES**

Un detector es un instrumento con la capacidad de percibir la presencia de un compuesto y enviar la señal eléctrica correspondiente a un ordenador de registro. Las características ideales de un detector son múltiples, se pueden citar la alta sensibilidad, la respuesta lineal para los diferentes analitos, la reproducibilidad y el tiempo de respuesta corto. Además, resulta interesante que el detector presente una respuesta semejante para todos los analitos, o alternativamente una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.<sup>46</sup>

Según las características y concentraciones de los compuestos implicados en la separación cromatográfica, se puede escoger el detector más adecuado para cada aplicación. De manera general se distinguen dos tipos básicos de detectores. El primero de ellos engloba los que están basados en la medida de una propiedad de la disolución, que se verá afectada por la presencia en la misma de las moléculas que se van a separar, destacando los detectores que miden el índice de refracción, la constante dieléctrica y la densidad. El segundo tipo está formado por aquellos que miden una propiedad de los compuestos que se desean separar, destacando los de absorbanza, los de fluorescencia y los de espectrometría de masas.<sup>38</sup>

#### **2.8.1.1.5.1 DETECTOR DE ABSORCIÓN UV-VIS CON ARREGLO DE DIODOS<sup>47</sup>**

La detección ultravioleta es ampliamente utilizada en HPLC a causa de su buena sensibilidad y rango lineal, porque permite detectar analitos en el orden de los nanogramos y por presentar un costo económico razonable. Funciona en el rango de longitud de onda de 190 a 350 nm, y en algunos equipos se hace extensivo a la zona visible del espectro (350 a 700 nm). Entre los detectores ultravioleta están: el fotométrico, que emite la mayor parte de la energía a una longitud de onda fija de 254 nm; el espectrofotométrico, permite trabajar en un rango más amplio del espectro, lo que favorece la sensibilidad de los compuestos que no absorben a 254 nm o de otras longitudes de onda para las que existen filtros; por último, el detector de arreglo de diodos (DAD), que permite en tiempo real conocer todo el espectro de UV/Visible dentro de un rango de longitud de onda. La base de su funcionamiento es simple; el haz de radiación es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos.

En este contexto, la literatura consultada explica que las tetraciclinas presentan dos longitudes de onda de absorción máxima a 275 y 350 nm en el detector ultravioleta.<sup>45</sup> Sin embargo, para este estudio se monitoreo los cromatogramas desde 200-500 nm, donde se verificó que las longitudes de onda de detección de 350, 355 y 360 nm presentan altas respuestas. Cabe mencionar, que se decidió trabajar con los datos encontrados en la longitud de onda de 355 nm, debido a que presenta los mejores valores estadísticos.

#### **2.8.1.1.6 CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN (FASE NORMAL Y FASE REVERSA)<sup>48</sup>**

La separación de las sustancias se logra por migración diferencial de los solutos. La fase estacionaria de la cromatografía de partición es un líquido soportado en un sólido inerte, el más usado es el ácido silícico o gel de sílice. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes, la polaridad puede ser notablemente diferente a la del líquido estacionario.

##### **2.8.1.1.6.1 FASE NORMAL<sup>38</sup>**

La fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar. Un ejemplo será el uso de la sílica como fase estacionaria y del hexano como fase móvil. De esta manera los compuestos no polares eluyen antes de la columna, mientras que los polares quedan retenidos.

##### **2.8.1.1.6.2 FASE REVERSA<sup>38</sup>**

Se usa una fase estacionaria no polar, como la C18, y una fase móvil polar, como una disolución acuosa. De esta forma, los compuestos no polares quedarán retenidos en la columna, mientras que los polares saldrán rápidamente. Este tipo de cromatografía es el más utilizado hoy en día, debido a su mayor reproducibilidad y a sus amplias aplicaciones.

#### **2.8.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA<sup>49,65</sup>**

La extracción en fase sólida, SPE (Solid Phase Extraction) es un método rápido, confiable y preciso para la preparación de muestra, limpieza y concentración del analito de interés, libre de interferencias y en una adecuada concentración para su detección y medición. La SPE tiene lugar mediante mecanismos de intercambio iónico, interacciones apolares e interacciones polares, donde se produce la adsorción-desorción de los analitos en la superficie

del material activo de las columnas, estableciéndose un equilibrio entre la concentración de analito en la fase estacionaria y la fase móvil. Dentro de las ventajas de la SPE con respecto a otras técnicas como la extracción líquido-líquido se cuentan:

- a) La rapidez en la preparación de la muestra
- b) Un bajo costo, debido a que hay un menor consumo de solventes y reactivos y una menor generación de residuos.
- c) Permite la concentración de sustancias a nivel de trazas.
- d) Requiere una menor cantidad de muestra.
- e) Elimina las posibles interferencias.
- f) Mejora la seguridad debido a que reduce la exposición a los solventes.
- g) Es de fácil automatización permitiendo un simultáneo procesamiento de lotes de muestras múltiples.

#### 2.8.2.1 DESCRIPCIÓN DEL CARTUCHO DE SPE<sup>49</sup>

La SPE para muestras líquidas ha llegado a ser una técnica ampliamente usada después de la introducción en el año de 1970 de cartuchos de adsorbentes desechables conteniendo poros del tamaño de la partícula que permite el procesamiento de la muestra mediante succión suave. Un típico cartucho de SPE consiste en pequeñas columnas o cartuchos de plástico como se muestra en la Figura 10. Estas columnas se rellenan con cantidades variables (desde 100 hasta 500 mg) de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de HPLC, de mayor granulometría con tamaño de la partícula del orden de 50-60  $\mu$ m, empacado entre metal poroso o plástico fritado.



**Figura 10. Cartuchos SPE HLB.**

La muestra es colocada en el cartucho y forzada a atravesar por cualquiera de las formas siguientes.

- Un émbolo (presión positiva)
- Aplicando vacío (presión negativa)

- Por centrifugación.

### 2.8.2.2 ETAPAS DE LA SPE

El proceso de extracción en fase sólida se realiza en cuatro etapas. En la primera etapa, la fase estacionaria debe acondicionarse con un disolvente para activarlo y mejorar la reproducibilidad de la retención de los analitos, así como para eliminar las posibles impurezas que pueda contener. Posteriormente se realiza la carga de la muestra con el objetivo de retener al máximo los analitos, en seguida, se realiza una etapa de limpieza con el fin de eliminar los componentes de la matriz que pudieran interferir en la determinación y finalmente se realiza la elución del analito para su posterior análisis.<sup>49</sup>

Entre los parámetros que pueden afectar la recuperación están<sup>49</sup>:

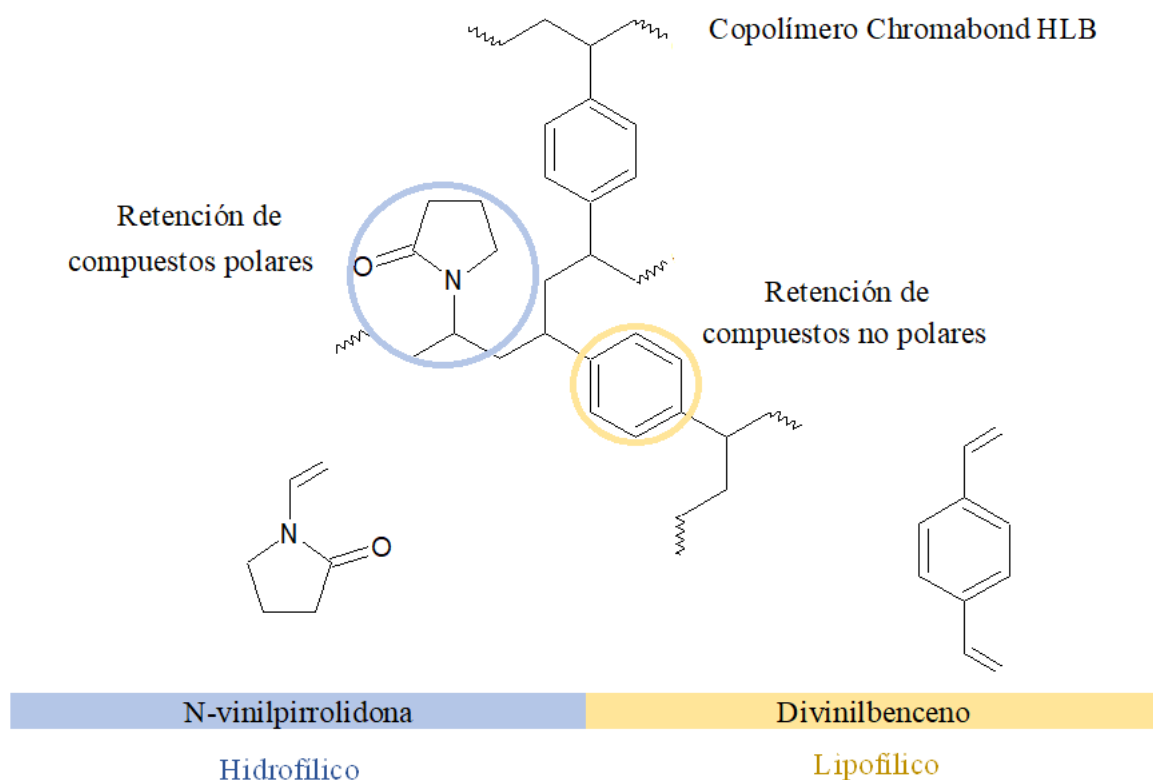
- 1) El tipo de fase estacionaria
- 2) El volumen de muestra
- 3) La velocidad de flujo de la extracción
- 4) La composición del solvente de elución
- 5) El volumen del solvente de elución.

Debido a que las concentraciones de los analitos son generalmente bajas, la correcta selección de la fase estacionaria que mejor se adapte al analito es una etapa importante a la hora de optimizar el proceso de preconcentración, además existen diferentes tipos de adsorbentes y éstos se eligen en función de las características de los analitos que se quieren determinar. Por otro lado, se debe establecer el volumen de muestra a ser procesado para no exceder la capacidad de retención del adsorbente y evitar que todo el analito que entre por el cartucho salga sin ser retenido. En cuanto a la velocidad de extracción, este paso debe efectuarse a una velocidad determinada (generalmente entre 1 a 10 mL/min) ya que flujos demasiado rápidos pueden producir bajas recuperaciones del analito. Para conseguir una concentración relativamente elevada del analito es deseable recuperarlo en un mínimo volumen del solvente de elución; por esta razón es importante establecer la composición del solvente de elución en el cual se obtenga mayor porcentaje de recuperación del analito.<sup>49</sup>



En la presente investigación, se optó por utilizar cartuchos Chromabond® HLB (ver anexo 5), de 3 mL de capacidad, previamente acondicionado con 1 mL de metanol y 1 mL de agua calidad HPLC, puesto que las tetraciclinas pueden presentar fuertes interacciones con los cartuchos SPE, por diferentes mecanismos, incluida las interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, quelación e intercambio catiónico,<sup>50</sup> debido a los grupos oxigenados y el anillo aromático presente en la estructura de la molécula.<sup>45</sup>

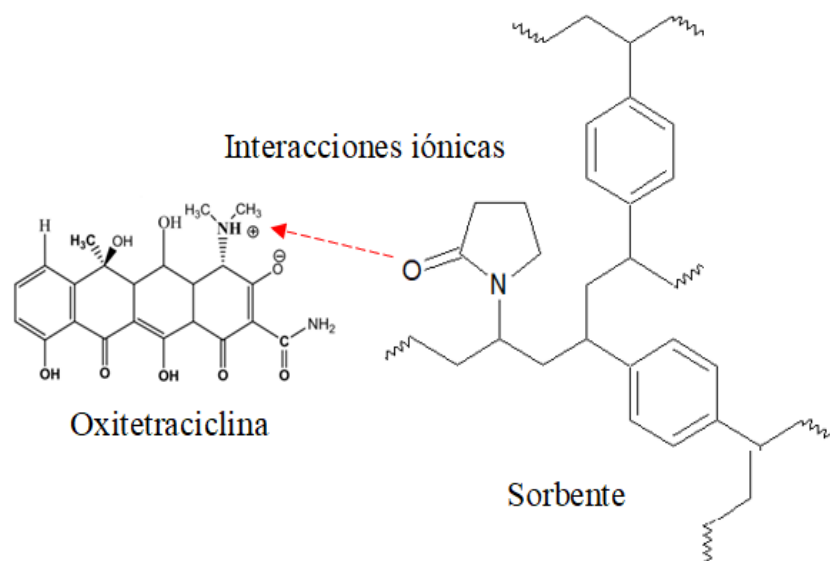
La figura 11 muestra que el copolímero de este cartucho es lipofílico e hidrofílico, pues posee una relación equilibrada de dos monómeros: *N*-vinilpirrolidona-divinilbenceno (NVP/DVB).<sup>51</sup>



**Figura 11<sup>51</sup>. Composición química de los cartuchos Chromabond HBL (por sus siglas en inglés Hydrophilic-lipophilic balanced phase)**

Para el procedimiento de limpieza y concentración del analito, diversos autores han demostrado que el cartucho HLB es superior al C18 a base de sílice, debido a las

interacciones iónicas entre los grupos catiónicos de las Tetraciclinas en condiciones ácidas y el grupo carbonilo en el resto del sorbente de la vinilpirrolidona. Más importante aún, el sorbente en fase sólida no tiene grupos de silanol que pueden interactuar con OTC y provocar una baja recuperación.<sup>52</sup>



**Figura 12. Propuesta de Interacción entre la OTC y el cartucho Chromabond HLB.**

### 2.8.3 REFRACTOMETRÍA<sup>53</sup>

La refractometría es una técnica analítica que consiste en la medida del índice de refracción de un líquido con objeto de investigar su composición, si se trata de una disolución, o su pureza, si es una sustancia.

El principio de esta técnica es la medición del cambio de dirección que sufre el haz de luz al pasar de un medio a otro. Actualmente tiene una aplicación importante en pruebas de control de calidad de jarabes, jugos, aceites, vidrio, hidrocarburos aromáticos, miel entre otros, así como en las áreas de investigación y desarrollo de nuevos productos de las industrias alimenticia, química, petroquímica, farmacéutica, etc.

Los refractómetros son instrumentos de medición que basan su funcionamiento en el fenómeno de refracción de la luz. Las determinaciones refractométricas se fundamentan

principalmente en supuesto de que al aumentar la densidad de una solución se origine un incremento en el valor del índice de refracción. De este modo cuando se produce un gradiente de concentración en una solución cabe esperar que el cambio en el índice de refracción sea proporcional.

### **2.8.3.1 REFRACTÓMETRO ABBE<sup>54</sup>**

El funcionamiento del refractómetro Abbe está basado en el estudio del ángulo límite en el que se produce la reflexión total del rayo que atraviesa los prismas y la muestra entre ellos. Como este valor depende de los índices de refracción de las sustancias atravesadas y, dado que el valor correspondiente a los prismas es conocido, resulta posible conocer el índice de refracción de la muestra. Solo es necesario colocar el objetivo en la posición correspondiente al ángulo límite y leer el ángulo en la escala situada junto a éste. Es importante hacer las correcciones correspondientes tomando en cuenta la temperatura.

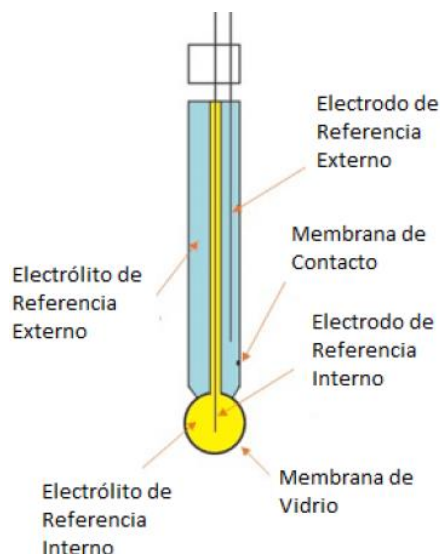


**Figura 13. Refractómetro Abbe**

### **2.8.4 POTENCIOMETRÍA: MEDICIÓN DE pH<sup>25</sup>**

Para la determinación de pH se utilizó un pHmetro, el cual posee un electrodo combinado en el que se encuentran en un mismo dispositivo el electrodo indicador (membrana de vidrio) y el electrodo de referencia (electrodos de Ag/AgCl interno y externo)<sup>8</sup>. La membrana está conformada por una red irregular de tetraedros de silicatos ( $\text{SiO}_4$ ) unida mediante un átomo

de oxígeno. Coordinados a los átomos de oxígeno se encuentran iones tales como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Los cationes monovalentes, principalmente el  $\text{Na}^+$  pueden moverse lentamente a través de la red del silicato. La superficie de la membrana se hincha cuando absorbe agua, permitiendo que se dé un equilibrio de intercambio iónico entre los iones  $\text{H}^+$  y los cationes metálicos del vidrio.



**Figura 14. Estructura clásica de un electrodo selectivo de iones hidrógeno combinado referencia<sup>14</sup>.**

#### **2.8.4.1 TITULACIONES REDOX<sup>55</sup>**

Una reacción de oxidación-reducción es un tipo de reacción en la que se transfieren electrones de un reactivo a otro. Una sustancia que tiene una fuerte afinidad por los electrones se conoce como agente oxidante, el cual como su nombre indica, tiene facilidad para oxidar a otras especies y él mismo sufre reacciones de reducción. El agente reductor es una especie que cede electrones con facilidad, sufriendo por tanto él mismo reacciones de oxidación.

Las valoraciones redox se basan en reacciones de oxidación-reducción entre el analito y el reactivo. La curva de valoración es la representación gráfica de la variación del potencial de la disolución que contiene el analito en función del volumen de valorante añadido.

#### **2.8.4.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CURVA DE VALORACIÓN<sup>55</sup>.**

La estequiometría de la reacción de valoración es una variable que influye en la forma de la curva de valoración redox, de modo que si la estequiometría valorante: analito es 1:1, el punto de equivalencia coincide exactamente con el punto de inflexión de la curva. Sin embargo, si la estequiometría de la reacción de valoración no es 1:1, el punto de equivalencia no coincide con el punto de inflexión de la curva. Sin embargo, debido a que para trabajar en condiciones óptimas se eligen reactivos valorantes agentes oxidantes o reductores enérgicos, el salto de potencial en la zona de equivalencia es tan brusco que, aunque se considere que el punto de equivalencia coincide con el de inflexión de la curva, el error cometido es mínimo.

#### **2.8.4.3 DETECCIÓN DEL PUNTO FINAL EN VALORACIONES REDOX<sup>55</sup>**

Las dos formas principales de detectar un punto final en una volumetría de oxidación-reducción: La primera se basa en un método instrumental, concretamente mediante potenciometría, determinándose el potencial de un electrodo indicador frente a un electrodo de referencia como el electrodo de calomelanos saturado (ECS), la segunda se basa en detectar el punto final con el uso de indicadores químicos.

#### **2.8.4.4 INDICADORES REDOX<sup>55</sup>**

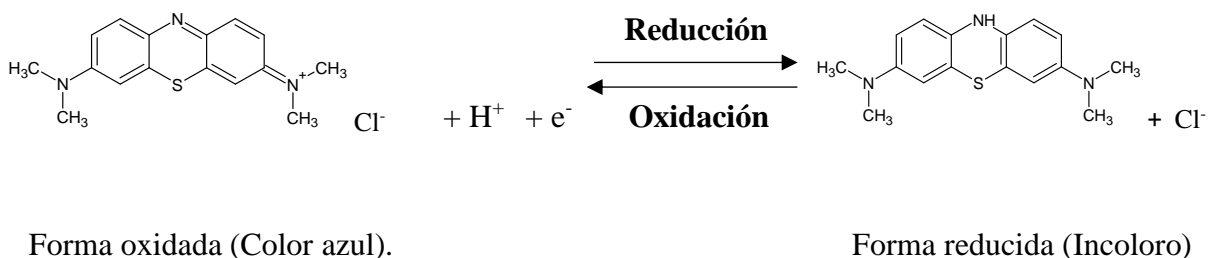
Los indicadores de oxidación-reducción se usan extensivamente para detectar el punto final. Un indicador redox general es un compuesto que cambia de color cuando pasa de su forma oxidada a reducida o, al contrario. La semirreacción a la que se debe el cambio de color puede escribirse como:



Si dicha reacción es reversible, podemos aplicarle la ecuación de Nernst. Para que el ojo humano pueda observar el cambio de color de la forma oxidada del indicador a la forma reducida se requiere que la proporción de concentraciones de ambas formas varíe unas 100 veces, que es lo mismo que decir que se requiere que la relación  $[\text{InRed}]/[\text{InOx}] \leq 0,1$  se transforme en  $[\text{InRed}]/[\text{InOx}] \geq 10$ .

#### 2.8.4.5. AZUL DE METILENO<sup>56</sup>

El azul de metileno (cloruro de tetrametiltionina, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S) es un colorante aromático heterocíclico, miembro de los colorantes de tiazina. Se presenta como cristales de color azul oscuro inodoros y es soluble en agua y cloroformo, pero moderadamente en alcohol. En su estado oxidado, el color de esta sustancia es azul debido al hecho de que la molécula de fenotiazinio absorbe la luz visible fuertemente en la región de 600 a 700 nm, lo que permite que se transmita el resto del espectro visible (350 a 600 nm). En su forma reducida, es incoloro y no absorbe la luz en la región visible (Figura 15).



**Figura 15. Estructura química del indicador azul de metileno en su forma reducida y oxidada.**

#### 2.8.5 CONDUCTIMETRÍA<sup>14</sup>

La conductividad específica (X) de una solución cualquiera es una medida de la facilidad con que la corriente eléctrica fluye a través de la matriz de la solución y depende, en primer lugar, de la concentración de cada especie conductora (es decir la cantidad de cada uno de los iones en solución), la temperatura y la naturaleza de las especies en solución.

La conductividad se determina utilizando un conductímetro, que en realidad mide la conductancia “L” (en  $\mu\text{S}$ ). El valor de L se convierte en conductividad específica (X) a través del valor de la constante de celda del aparato, empleando la relación siguiente:

$$X = L \cdot k_c$$

Donde:

X es la conductividad específica expresada en  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,

L es la conductancia de la solución medida del conductímetro y expresada en  $\mu\text{S}$ , y

kc es el valor de la constante de celda del conductímetro que tiene un valor dado en  $\text{cm}^{-1}$

Está demostrado que la conductividad de la miel está directamente relacionada con el porcentaje de cenizas de esta. Se ha propuesto una ecuación lineal que describe dicha relación:

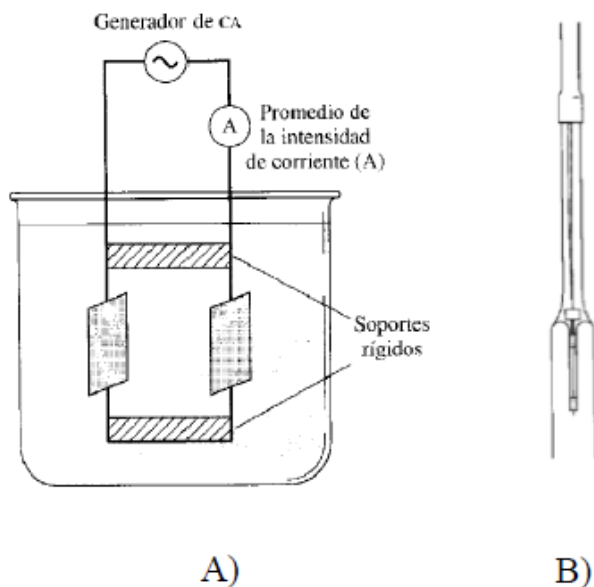
$$X = 1.74A + 0.14$$

Donde: X es la conductividad específica expresada en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , y A es el porcentaje en masa de cenizas de la miel.

Por lo tanto, el valor del porcentaje de cenizas estará dado por la siguiente ecuación:

$$A = \frac{X - 0.14}{1.74}$$

La conductividad es un parámetro importante de las mieles y está incluida, en algunas normas como un parámetro de calidad. Hay estudios que proponen que la conductividad en la miel es un insumo importante para conocer el origen palinológico, botánico y geográfico de la misma.



**Figura 16. a) Sistema de electrodos de una celda conductimétrica. b) Celda de inmersión**

## 2.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS

La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Esta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.<sup>57</sup>

### 2.9.1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

#### 2.9.1.1 LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática (mínimos cuadrados) bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.<sup>58</sup>

Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, se calculó el valor de la pendiente (b), la ordenada en el origen (a), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza para la pendiente (IC(b)), el intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC(a)), y el coeficiente de variación de regresión ( $CV_{x/y}$ ).<sup>59</sup>

#### 2.9.1.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD<sup>58</sup>

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

La recuperación (eficiencia de la extracción) se calcula como

$$\%Recuperación = \frac{(CMA-CM)*100}{CA}$$

**Dónde:**

CMA = Concentración de la muestra más el patrón

CM = Concentración inicial de la muestra



CA = Concentración del patrón añadido

Al hablar de precisión, se hace referencia al grado de concordancia entre los resultados obtenidos de una serie de medidas repetidas, por tanto, depende de la magnitud de los errores aleatorios que afectan el método de análisis, y se cuantifica mediante parámetros estadísticos de dispersión, fundamentalmente, como la desviación estándar, la desviación relativa y la varianza.<sup>59</sup>

Para obtener un grado de precisión aceptable en una serie de medidas repetidas es necesario realizar el método en condiciones de mínima de variabilidad, es decir: El mismo procedimiento de medida, aplicado por los mismos operadores, en las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, en un periodo corto de tiempo.<sup>59</sup>

El coeficiente de variación se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$CV = \left(\frac{S}{y}\right) * 100$$

**Dónde:**

S = Desviación estándar

y = media

### **2.9.1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)<sup>60</sup>**

El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable o la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Para obtener el límite de detección de un método, el LD debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo.

$$L. D = \frac{3.3 * Sb}{b1}$$

Donde:

LD= Límite de detección.

Sb= Desviación estándar de las mediciones de muestra fortificada.

b= Pendiente de la recta de calibración.

#### **2.9.1.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)<sup>60</sup>**

La menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas de la prueba.

$$L. C = \frac{10 * Sb}{b1}$$

Donde:

LC= Límite de Cuantificación.

Sb= Desviación estándar de las mediciones de muestra fortificada.

b= Pendiente de la recta de calibración.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO.

##### 3.1.1 MATERIAL Y REACTIVOS

- Agitadores de vidrio y magnéticos
- Termómetro
- Balones volumétricos de 5, 10, 50 100, 500, 1000, 2000 mL
- Beaker de 25, 50, 125, 500 mL
- Erlenmeyer de 125 mL
- Micropipetas de 20, 100 y 100  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta 20, 100 y 100  $\mu$ L
- Probeta de 10, 25, 100 mL
- Embudos de vidrio
- Filtros de nylon para jeringa, con poro de 0.22 $\mu$ m
- Espátula de metal
- Buretas de 50 mL
- Pipeta volumétrica de 20 mL
- Jeringa de 3 mL
- Frasco lavador
- Pipeta Pasteur
- Viales
- Vidrio de reloj
- Cartuchos 3 mL SPE
- Soporte Universal
- Pinzas de nuez
- Pinzas de sostén
- Papel filtro
- Acetonitrilo calidad HPLC
- Metanol calidad HPLC
- Ácido clorhídrico (concentrado)
- Ácido Oxálico
- Hidróxido de Sodio (0.1M)
- Sulfato de cobre Pentahidratado
- Agua calidad HPLC
- Tartrato de sodio y potasio
- Acetona HPLC
- Clorhidrato de oxitetraciclina (Patrón secundario)
- Ácido Sulfúrico Concentrado
- Ácido Sulfúrico Concentrado
- Azul de metileno
- Zinc en granallas
- Negro de eriocromo
- EDTA disódico
- Ácido cítrico monohidratado
- Fosfato disódico
- Nitrógeno ( $N_{2(g)}$ ).
- Acetato de etilo
- Hidróxido de amonio
- Cloruro de amonio

##### 3.1.2 EQUIPO DE LABORATORIO

- Baño limpiador ultrasónico Branson 2510MT.
- Balanza Analítica, Mettler-Toledo
- Conductímetro
- pHmetro, ISE meter 225
- Refractómetro Abbe
- Columna Pinnacle II C18 5  $\mu$ m 150x5.6mm
- Detector de arreglo de diodos SPD-M20A
- Cromatógrafo Shimadzu LC-2010<sup>a</sup> HT
- Plato de calentamiento con agitación magnética.
- Bomba de vacío

### 3.2 MUESTRAS

El estudio se realizó con 15 muestras de miel proporcionadas por una empresa apícola dedicada a la exportación, cuyos apiarios se encuentran distribuidos en distintos municipios del departamento de Chalatenango y representan alrededor del 5% de los apiarios<sup>61</sup> del departamento antes mencionado. Los datos de la procedencia de la miel recolectada son presentados en la tabla 6.

**Tabla 6. Información de la procedencia de muestras de miel utilizadas para el análisis de restos de oxitetraciclina.**

No	Código	Fecha de cosecha	Lugar
1	MM1	07/12/2017	Río Grande Tejutla, Chalatenango
2	MM2	18/11/2017	Santa Rosa, Nueva Concepción
3	MM3	24/11/2017	Cantón el Tamarindo, San Antonio La Cruz
4	MM4	28/11/2017	Cantón Plan Grande, Dulce Nombre de María
5	MM5	01/12/2017	Las Mercedes, El Gramal Chalatenango
6	MM6	13/12/2017	Cantón Chilamate, Nueva Concepción
7	MM7	14/12/2017	Potrero Sula, Nueva Concepción
8	MM8	27/11/2017	Hacienda Cantón El Portillo, San José Las Flores
9	MM9	16/11/2017	Cantón Agua Fría, Agua Caliente
10	MM10	13/11/2017	Chilamate, Chalatenango
11	MM11	28/11/2017	Laguna Seca, Nueva Concepción
12	MM12	03/12/2017	Cantón Sunapa, Nueva Concepción
13	MM13	13/12/2017	Cantón Cimarrón, Nueva Concepción
14	MM14	30/12/2017	Cantón Candelaria M/Comalapa
15	MM15	03/12/2017	El Zapotal de Agua, Chalatenango

### 3.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS<sup>25</sup>.

#### 3.3.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

##### 3.3.1.1 Titulación de disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ con EDTA

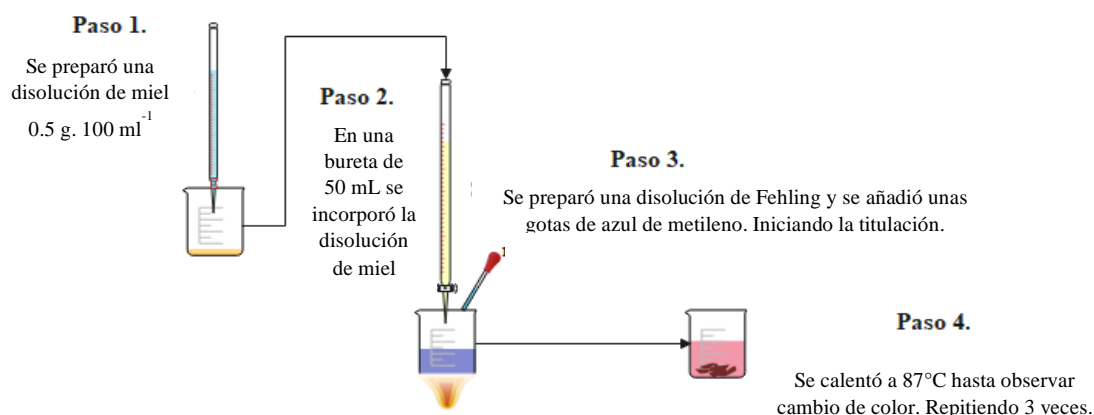
En un Erlenmeyer de 250 mL se incorporó un agitador magnético y 5 mL de disolución de sulfato de cobre pentahidratado ( $0.3 \text{ mol. L}^{-1}$ ). A continuación, se agregó 57 mL de disolución de amoníaco, comprobándose un  $\text{pH}=8.06$  para la mezcla. Se agitó fuertemente hasta la incorporación de una pequeña cantidad de indicador murexida.

Se llenó una bureta con disolución de sal disódica de EDTA  $0.109 \text{ mol. L}^{-1}$  (estandarizado) y se valoró la disolución de cobre, observándose en el punto final un cambio de color de naranja-amarillo a un violeta profundo. Este procedimiento se repitió tres veces para encontrar el promedio de volumen gastado y determinar la concentración real de la disolución de cobre.

### 3.3.1.2 Titulación de disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ con disolución de muestra de miel

Se preparó una disolución de miel de aproximadamente 0.5 g en 100.0 mL de agua destilada; a continuación, se elaboró la disolución de Fehling a titular, mezclando 5.0 mL de la disolución Fehling A ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; en este caso se utilizó a una concentración de  $0.30 \text{ mol. L}^{-1}$ ) y 5.0 mL de la disolución Fehling B (tartrato de sodio y potasio  $1.170 \text{ mol. L}^{-1}$  e hidróxido de sodio  $2.500 \text{ mol. L}^{-1}$ ) en un vaso de precipitado de 50 mL. Una vez preparada la disolución de Fehling, se incorporó el indicador (azul de metileno 2%) y se colocó el vaso de precipitados en una parrilla de calentamiento con agitación, llevando un control de la temperatura (por arriba de los  $87^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, la disolución de Fehling se tituló con la disolución de miel preparada.

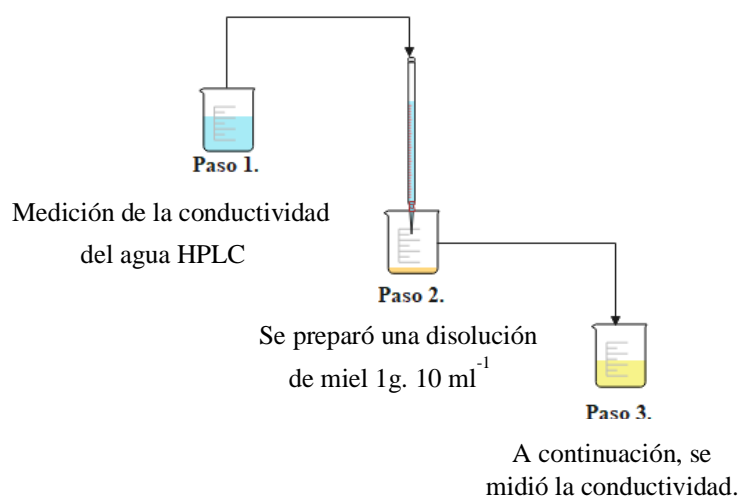
La solución titulante de miel se adicionó poco a poco, agitando hasta que la coloración azul desapareció completamente. Se repitió tres veces la titulación para verificar el punto exacto de viraje. Registrándose a continuación el volumen.



**Figura 17. Procedimiento para la determinación de azúcares reductores**

### 3.3.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS.

Se preparó una disolución de miel de aproximadamente 1.0 g en 10.0 mL de agua desionizada. Posteriormente se colocó en un vaso de precipitado de 20.0 mL y se midió la conductividad eléctrica con la ayuda de un Conductímetro. Como se trata de una propiedad aditiva, se midió las conductividades tanto de la disolución, como del agua desionizada, para calcular la conductividad debida únicamente a los componentes de la miel a través de una simple resta. Una vez se determinó la conductividad eléctrica de la miel se procedió a calcular el porcentaje de cenizas utilizando la relación lineal que existe entre ambas.



**Figura 18. Procedimiento para la determinación de cenizas**

### 3.3.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.

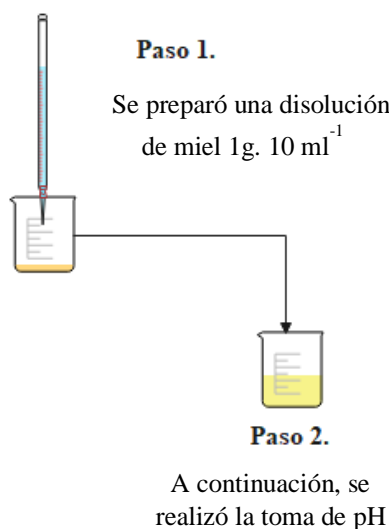
Se colocó una porción de miel entre los prismas del refractómetro. A continuación, se observó la lectura correspondiente y se tomó la temperatura a la que se realizó dicha medición. Se retiró la miel cuidadosamente y se limpiaron los prismas. Como la lectura del índice de refracción se efectuó a una temperatura superior a 20°C, se añaden 0.00023 por cada grado centígrado de diferencia. Si la temperatura es inferior a 20 °C, se restan 0.00023 por cada grado centígrado de diferencia.

$$\eta_D^{20} = \eta_D^T + (0.00023)(T - 20^\circ\text{C})$$

El contenido de humedad de la muestra, con el índice de refracción corregido se obtiene de la tabla 15, ver Anexo 10.

### 3.3.4 DETERMINACIÓN DE pH.

Se preparó una disolución de miel de aproximadamente 1.0 g en 10 mL (se utilizó la misma disolución que en la determinación de cenizas). Posteriormente se colocó la disolución en un vaso de precipitado de 20mL y se midió el pH con la ayuda de un pH metro.



**Figura 19. Resumen del procedimiento para la determinación de pH**

## 3.4 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE OXITETRACICLINA POR HPLC

### 3.4.1 PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN

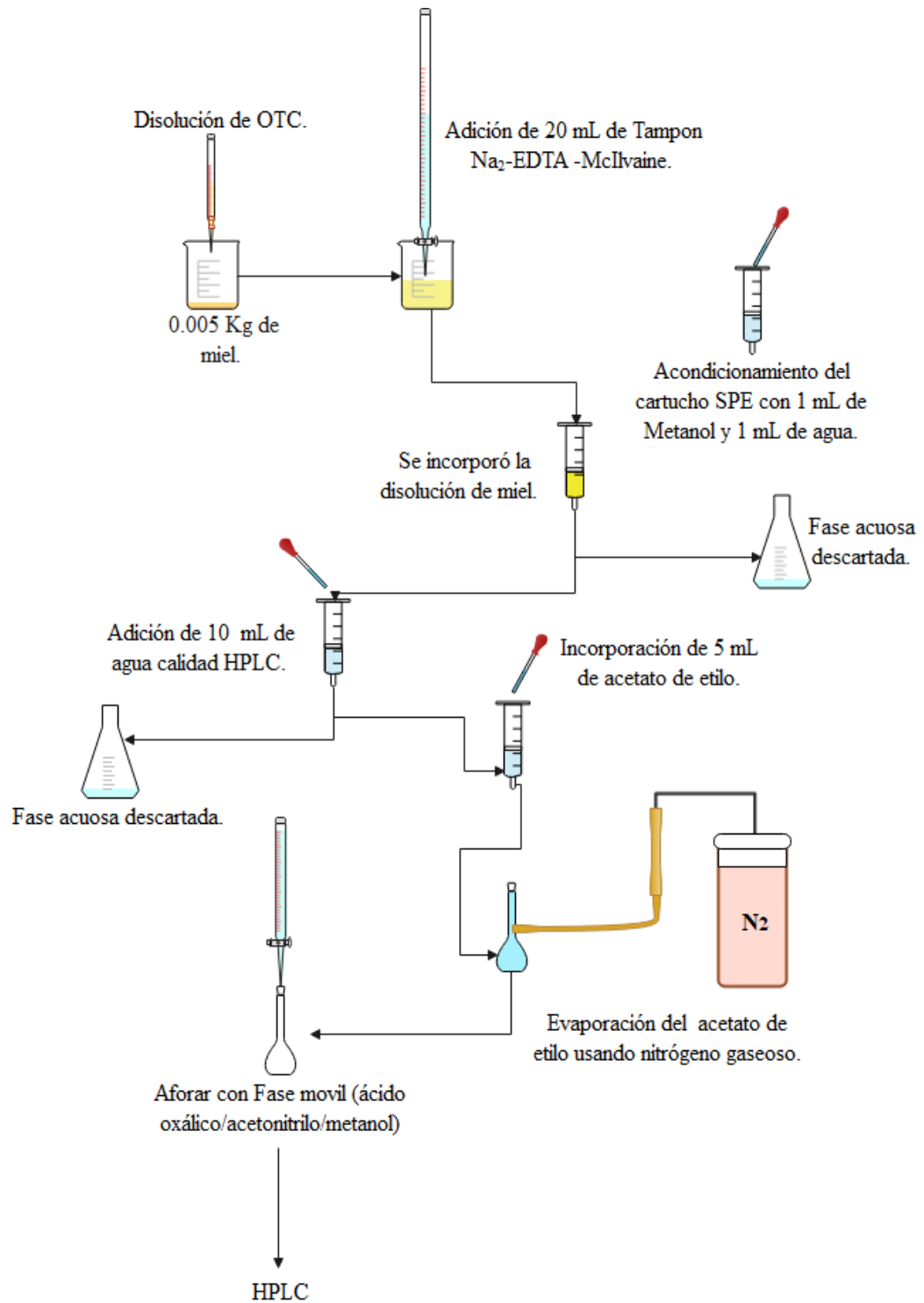
- De acuerdo con el procedimiento de Zhou,<sup>45</sup> y la Guía de Validación de Métodos Analíticos Mexicana,<sup>62</sup> se preparó una disolución madre de  $201.4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de clorhidrato de oxitetraciclina (0.95% de pureza), para lo cual se pesaron 21.2 mg de estándar de OTC, incorporándose a un balón volumétrico de 100 mL, al cual se le añadieron 50 mL de metanol hasta disolver. Una vez disuelto se procedió al aforo.
- Se tomaron distintos volúmenes de la disolución madre de OTC (0, 12.5, 17.5, 25, 50 y 125  $\mu\text{L}$ ) para la preparación de cada uno de los puntos de la curva de calibración. Dichas soluciones fueron preparadas por duplicados independientes mezclados en beakers de 30 mL, conteniendo 0.005 Kg de miel de abeja (Tabla 7).

**Tabla 7. Datos de la curva de calibración para cuantificar OTC.**

Puntos	Miel adicionada (Kg)	Volumen de disolución tomado ( $\mu\text{L}$ )	Concentración ( $\text{mg. L}^{-1}$ )
1	0.005	0.0	0.000
2	0.005	12.5	0.524
3	0.005	17.5	0.725
4	0.005	25.0	1.005
5	0.005	50.0	2.014
6	0.005	125.0	5.035

- Se preparó una disolución tampón ( $\text{Na}_2\text{-EDTA-McIlvaine buffer}$ ,  $0.1 \text{ mol. L}^{-1}$ ) disolviendo 11.8 g de ácido cítrico monohidratado, 13.72 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 33.62 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  en un litro de agua calidad HPLC, ajustando el pH  $4.0 \pm 0.05$ , con volúmenes de  $\text{HCl } 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$  o  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$ .<sup>46</sup>
- A continuación, se incorporó a cada muestra de miel, 20 mL de tampón (McIlvaine) y se agitó fuertemente hasta disolver.
- Posteriormente la disolución de miel fue transferida a un cartucho Chromabond® HLB de 3 mL previamente acondicionado con 1 mL de metanol y 1 mL de agua calidad HPLC.
- El cartucho de extracción en fase sólida (SPE) se lavó con 10 mL de agua y la muestra (OTC) se arrastró con 5 mL de acetato de etilo hasta un matraz de 5 mL.
- Luego, se evaporó el disolvente a temperatura ambiente bajo una corriente de nitrógeno, y finalmente se aforó hasta la marca con 5 mL utilizando fase móvil.
- El procedimiento anterior se aplicó para la determinación de OTC en las muestras de miel.





**Figura 20. Diagrama del proceso para la preparación de curva de calibración y tratamiento de muestras.**

### 3.4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El equipo de HPLC utilizado para la determinación de OTC en las muestras, se adecuó en las condiciones cromatográficas detalladas en la tabla 8.

**Tabla 8. Condiciones cromatográficas utilizadas en la determinación de OTC en muestra de miel de abeja**

Condiciones cromatográficas	Valores
Velocidad de flujo	0.600 mL. min <sup>-1</sup>
Fase móvil (72:13:15)	ácido oxálico/acetoneitrilo/metanol
Temperatura	30 °C
Longitud de onda	355 nm
Volumen de inyección	20 microlitros
Columna	Pinnacle C18 5 um 150x5.6mm

### 3.5 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 3.5.1 LINEALIDAD<sup>60,62</sup>

- Se midió la respuesta analítica de un blanco y se preparó una curva de calibración con 5 puntos para determinar el área cromatográfica producida por las disoluciones a diferentes concentraciones.
- Cada punto de la curva de calibración (incluido el blanco) se inyectó por triplicados y se calculó el promedio de las áreas bajo la curva de cada pico cromatográfico.
- Se determinó el coeficiente de correlación y se comparó con el criterio de aceptación establecido en la Guía de Validación del Organismo Salvadoreño de Acreditación y la Guía de Validación de Métodos Analíticos de México.
- Criterios de aceptación Intervalo de trabajo
  - a)  $r \geq 0.98$
  - b) El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad

### 3.5.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD<sup>62</sup>

- Se preparó tres niveles de concentración (0.725, 1.007, 5.035 mg. L<sup>-1</sup>) adicionando OTC a la matriz de miel libre antibiótico.
- Cada nivel fue inyectado por triplicado.
- Para el cálculo de la exactitud se utilizó el porcentaje de recobro, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada de oxitetraciclina a la miel, expresada en porcentajes.
- Se calculó el promedio aritmético( $\bar{y}$ ), la desviación estándar(S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC( $\mu$ ) del porcentaje de recobro.
- Criterio de aceptación
  - La norma mexicana establece que el IC( $\mu$ ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98-102% para los métodos cromatográficos. Por otro lado, la comisión europea establece un porcentaje de recobro de 70-120% y el OSA un porcentaje de 80-120%.
  - La norma mexicana y salvadoreña establece que el coeficiente de variación no debe ser mayor de 2% para métodos cromatográficos. Mientras, la comisión europea establece un coeficiente de variación menor al 20%<sup>7</sup>.

### 3.5.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN<sup>62</sup>

Según la normativa mexicana de validación, el Límite de detección (LD) y cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y desviación estándar de los blancos es determinada de la siguiente forma:

- Se prepararon tres concentraciones diferentes por dilución (0.524, 0.725, 1.005 mg. L<sup>-1</sup>), y se midió la respuesta analítica de la curva generada por los tres puntos; calculándose la concentración de los preparados por dilución, sin incluir los blancos. Se calculó  $b_1$  (pendiente),  $r^2$  (coeficiente de determinación) y el IC( $\beta_1$ ) (Intervalo de confianza para la pendiente).

- Seguidamente se prepararon únicamente 3 blancos (La norma establece la preparación de 5), midiéndose la respuesta analítica de cada uno y se calculó el promedio y desviación estándar (Sb) de las mediciones.
- Se calcularon el límite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC) y se consideraron los siguientes criterios de aceptación:  $r^2 \geq 0.98$  e  $IC(\beta_1)$ , no debe incluir el cero.

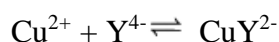
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUIMICOS

Se presentan los resultados obtenidos en el análisis de las 15 muestras de miel, donde se describen los cálculos utilizados para conocer la composición fisicoquímica de cada una de las mieles estudiadas.

#### 4.1.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se realizó la titulación de la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (74.904 g en 1000 mL) con la disolución de EDTA 0.1089 mol.  $\text{L}^{-1}$ , permitiendo la utilización de la disolución de  $\text{Cu}^{2+}$ , como patrón secundario. El punto de equivalencia se determinó mediante la titulación del  $\text{Cu}^{2+}$ . La reacción de titulación es la siguiente:



Siendo la estequiometría de la reacción 1:1, el punto de equivalencia obtenido fue de 14.0 mL y al titular 5.0 mL de la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se procede a realizar el cálculo de su concentración.

$$14.0 \text{ mL} \left( \frac{0.1089 \text{ mmol EDTA}}{1.0 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1.0 \text{ mmol EDTA}} \right) = 1.5246 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

$$[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = \left( \frac{1.5246 \text{ mmol}}{5.0 \text{ mL}} \right) = 0.3049 \text{ mol. L}^{-1}$$

Para la reacción de Fehling, se titularon 5.0 mL de disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de concentración  $0.3049 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , con la solución de miel (0.5 g en 100.0 mL de agua destilada), por lo que la cantidad de mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  que reacciona con los azúcares reductores de la miel son:

$$5.0 \text{ mL} \left( \frac{0.3049 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1.0 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mmol Cu}^{2+}}{1.0 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} \right) = 1.5246 \text{ mmol Cu}^{2+}$$

Tomando como ejemplo el volumen gastado en la muestra uno; se tiene, que se requirieron 14.8 mL de disolución de miel para hacer reaccionar en su totalidad los 1.5246 mmol  $\text{Cu}^{2+}$ .

Para calcular los mmoles de azúcares reductores que reaccionaron con los mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  se utilizó la relación estequiometria de 1 mmol de azúcar reductor por 5 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$ , posteriormente se calculan los miligramos de azucares reductores utilizando la masa molar de  $180.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ :

$$1.5246 \text{ mmol Cu}^{2+} \left( \frac{1 \text{ mmol de Azúcar red.}}{5 \text{ mmol Cu}^{2+}} \right) = 0.3049 \text{ mmol Azúcar red.}$$

$$0.3049 \text{ mmol de Azúcar red.} \left( \frac{180.16 \text{ mg de Azúcar red.}}{1 \text{ mmol Azúcar red.}} \right) = 54.93 \text{ mg Azúcar red.}$$

Una vez calculado los miligramos de azúcares reductores que corresponden a los 14.8 mL de disolución de miel, se calculan para los 100 mL de disolución preparados en total:

$$54.93 \text{ mg Azúcar red.} \left( \frac{100 \text{ mL de Azúcar red.}}{14.8 \text{ mL Azúcar red.}} \right) = 371.14 \text{ mg Azúcar red.}$$

Conociendo que en los 100.0 mL de disolución se disolvieron 500.9 mg de miel puede calcularse el porcentaje de azúcares reductores presentes en la miel:

$$\left( \frac{371.148 \text{ mg Azúcar red.}}{500.9 \text{ mg de miel}} \right) \times 100 = 74.10 \% \text{ Azúcar red.}$$

De igual manera se desarrollan los cálculos para las demás muestras de miel. Es de tomar en cuenta que en todos los casos se tomaron 5.0 mL de disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de

concentración  $0.3049 \text{ mol. L}^{-1}$ , por lo tanto, en todas las muestras los mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  titulados son 1.5246 y por consiguiente los mmoles titulantes de azúcares reductores son 0.3049.

**Tabla 9. Resultados obtenidos en la determinación de azúcares reductores**

Muestra	Disolución de miel (mg miel. $\cdot \text{L}^{-1}$ disolución)	Concentración (g miel. $\cdot \text{L}^{-1}$ disolución)	$V_{(\text{mL})}$ en punto de equivalencia	Porcentaje de azúcares reductores
1	500.9/100	5.009	14.80	74.10
2	500.9/100	5.009	14.90	73.60
3	500.5/100	5.005	14.40	76.21
4	500.8/100	5.008	15.00	73.12
5	500.8/100	5.008	15.50	70.76
6	501.1/100	5.011	15.60	70.27
7	500.8/100	5.008	15.30	71.69
8	500.4/100	5.004	14.60	75.19
9	501.1/100	5.011	15.30	71.65
10	501.2/100	5.012	14.70	74.56
11	501.3/100	5.013	14.60	75.05
12	501.2/100	5.012	14.90	73.56
13	501.4/100	5.014	15.10	72.55
14	501.9/100	5.019	15.10	72.48
15	503.1/100	5.031	15.00	72.79

Según la Norma Salvadoreña para Miel de Abejas (NSO 67.19.01:08) el porcentaje de azúcares reductores mínimo para miel de flores es del 60%. La Normativa del CODEX alimentario establece que el porcentaje de azúcares reductores para la miel en flores no debe ser menor al 65%. Todas las muestras de miel estudiadas poseen un porcentaje arriba del 70% por lo que cumplen con las normas.

#### 4.1.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

En la presente determinación, se midió la conductividad específica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) con la ayuda de un conductímetro. Para la muestra 1 se muestran los resultados de las mediciones y cálculos obtenidos:

Conductividad específica del agua ( $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$ ) =  $1.26 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

Conductividad específica de la disolución de miel ( $\chi_{\text{disolución}}$ ) =  $296.48 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

Conductividad específica de la miel ( $\chi_{\text{disolución}} - \chi_{\text{H}_2\text{O}}$ ) =  $295.22 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

En donde “ $\chi$ ”, es la conductividad específica ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y “A” el porcentaje de cenizas.

Por lo tanto, el valor del porcentaje de cenizas estará dado por la siguiente ecuación:

$$A = \frac{\chi - 0.14}{1.74}$$

Previo a calcular el porcentaje, debido a que la conductividad específica obtenida esta expresada en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  y esta debe expresarse en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , se realizó la conversión dividiendo entre 1000. Para este caso,  $295.22 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  equivalen a  $0.30 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

El cálculo respectivo para el porcentaje de cenizas para esta muestra de miel se muestra a continuación:

$$A = \frac{0.30 - 0.14}{1.74} = 0.09\%$$

Este mismo procedimiento se utilizó para los cálculos de todas las muestras.

**Tabla 10. Resultados obtenidos en la determinación de cenizas.**

Muestra	Concentración ( $\text{g}_{\text{miel}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{disolución}}$ )	Conductividad específica $\chi$ ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	$\chi_{\text{disolución}} - \chi_{\text{H}_2\text{O}}$ ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Conductividad específica ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	% de cenizas
1	100.046	296.48	295.22	0.30	0.09
2	100.080	244.12	242.86	0.24	0.06
3	100.048	180.20	178.94	0.18	0.02
4	100.100	211.48	210.22	0.21	0.04

5	100.032	269.28	268.02	0.27	0.07
6	100.066	612.00	610.74	0.61	0.27
7	100.074	379.44	378.18	0.38	0.14
8	100.116	161.16	159.90	0.16	0.01
9	100.014	143.48	142.22	0.14	0.00
10	100.016	195.16	193.90	0.19	0.03
11	100.030	221.00	219.74	0.22	0.05
12	100.050	259.08	257.82	0.26	0.07
13	100.162	333.88	332.62	0.33	0.11
14	100.244	367.20	365.94	0.36	0.13
15	100.048	419.56	418.30	0.42	0.16

La Norma Salvadoreña no reporta el porcentaje de cenizas, pero en el CODEX ALIMENTARIUS si establece que el porcentaje máximo es del 0.80 %. Por lo tanto, todas las mieles poseen un porcentaje de cenizas aceptable. La muestra con mayor porcentaje presenta un valor de 0.27%.

#### 4.1.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se colocó la muestra 3 en el refractómetro para obtener su índice de refracción. Debido a que en el momento de la medición se registró una temperatura entre los 28 °C y 29 °C, se realizó la corrección con respecto a la temperatura de 20 °C según los valores presentados a continuación.

- Temperatura superior a 20 °C - agregar 0. 00023 por °C
- Temperatura por debajo de 20 °C - restar 0. 00023 por °C

Una vez determinado el índice de refracción de la muestra 3, se procedió a la corrección

$$\eta_D^{20} = \eta_D^T + (0.00023)(T^\circ \text{ de trabajo} - 20^\circ\text{C})$$

$$\eta_D^{20} = 1.486 + (0.00023)(29^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C})$$



Una vez corregido el valor del índice de refracción, se busca en la tabla su valor correspondiente de porcentaje de humedad. Por lo tanto, se tiene que el porcentaje de humedad para la muestra 3 es de 19.4%. De igual manera se procedió a realizar el cálculo para las demás muestras de miel.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11.

**Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de humedad**

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Índice de refracción medido (<math>\eta</math>)</b>	<b>Índice de refracción corregido (<math>\eta</math>)</b>	<b>Porcentaje de humedad</b>
1	29	1.4915	1.4935	17.2
2	29	1.4885	1.4905	18.4
3	29	1.4860	1.4880	19.4
4	29	1.4925	1.4945	16.8
5	28	1.4885	1.4903	18.4
6	28	1.4905	1.4923	17.8
7	28	1.4930	1.4948	16.4
8	28	1.4895	1.4913	18.2
9	28	1.4920	1.4938	17.0
10	28	1.4880	1.4898	18.6
11	28	1.4915	1.4933	17.4
12	28	1.4910	1.4928	17.4
13	28	1.4930	1.4948	16.6
14	28	1.4930	1.4948	16.6
15	28	1.4935	1.4953	16.4

La miel sufre una etapa de maduración en la colmena y en el producto que ha completado este proceso, el porcentaje de humedad debe de ser inferior al 20% como se establece en el CODEX Alimentarius<sup>63</sup> y la norma salvadoreña de miel de abeja. Para el caso de las muestras estudiadas en esta investigación, se afirma que cumplen con el límite máximo establecido por las normativas.

Sin embargo, la muestra 3 se encuentra cerca del límite con 19.4%, mientras que la muestra 15 presenta el valor más alejado con 16.4% de humedad.

#### 4.1.4 DETERMINACIÓN DE pH

Se presenta las mediciones obtenidas para las 15 muestras de miel en la tabla siguiente.

**Tabla 12. Resultados obtenidos en la determinación de pH**

Muestra	Concentración (g miel. mL <sup>-1</sup> disolución)	pH
1	0.05002	4.04
2	0.05004	3.73
3	0.05002	3.72
4	0.05005	3.86
5	0.05001	3.96
6	0.05003	4.53
7	0.05003	4.43
8	0.05005	3.72
9	0.05000	3.73
10	0.05000	3.58
11	0.05001	3.77
12	0.05002	3.78
13	0.05008	3.99
14	0.05012	4.02
15	0.05002	4.24

El pH es la medida de la acidez de las sustancias, y para el caso de la miel, el ácido mayoritario es el ácido glucónico, el cual depende principalmente del tiempo transcurrido entre la toma del néctar por las abejas y la consecución de la densidad final de la miel en el panal, en cuyo momento la actividad de la enzima glucosaoxidasa es menor. También, existen en menor proporción otros ácidos como son el acético, butírico, láctico, cítrico, succínico, fórmico, málico, maleico y oxálico que contribuyen a la acidez.<sup>64</sup>

Se observa que el pH de todas las muestras de miel analizadas se encuentra en un rango de 3.53 a 4.53. Estos valores de pH por debajo de 5 están determinados por la cantidad de ácidos orgánicos en la miel, que son suministrados de las fuentes de alimento de las abejas; de aquí la relación entre el pH (parámetro no contemplado en las normativas de miel) y la acidez que es un parámetro de calidad de la miel.

## 4.2 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

### 4.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD

En la tabla 13 se muestra un resumen de las mediciones encontradas en la construcción de la curva de calibración, durante la evaluación de la linealidad del método; la cual, fue analizada a longitudes de onda de 360, 355 y 350 nm, observándose picos cromatográficos en un tiempo de retención de 6.20 minutos, utilizando un detector de arreglo de diodos. Mostrándose además los valores de área encontradas para los seis puntos de concentración (incluido el blanco), que sirvieron para la generación del coeficiente de correlación y determinación.

**Tabla 13. Valores correspondientes al tiempo de retención de áreas encontradas en los puntos de la curva de calibración de OTC evaluado en 360, 355 y 350 nm.**

\*Área detectada para puntos de concentración

\*\*Área promedio correspondiente a 3 inyecciones de la misma concentración.

Puntos	Concentración (mg. L <sup>-1</sup> )	Longitud de onda (nm)					
		360		355		350	
		Áreas*	Promedio de áreas**	Áreas	Promedio de áreas	Áreas	Promedio de áreas
1	0	4510	4732	3985	4205	4455	4190
		4878		4424		3842	
		4808		4206		4271	
2	0.524	27687	23101	26026	22922	20477	22949
		19670		15695		24367	
		21945		27046		24003	
3	0.725	32265	32362	33221	32194	33138	35047
		33565		31651		35426	
		31257		31711		36577	
4	1.005	44699	41874	45029	43860	45206	45897
		36913		44005		45092	
		44012		42546		47393	

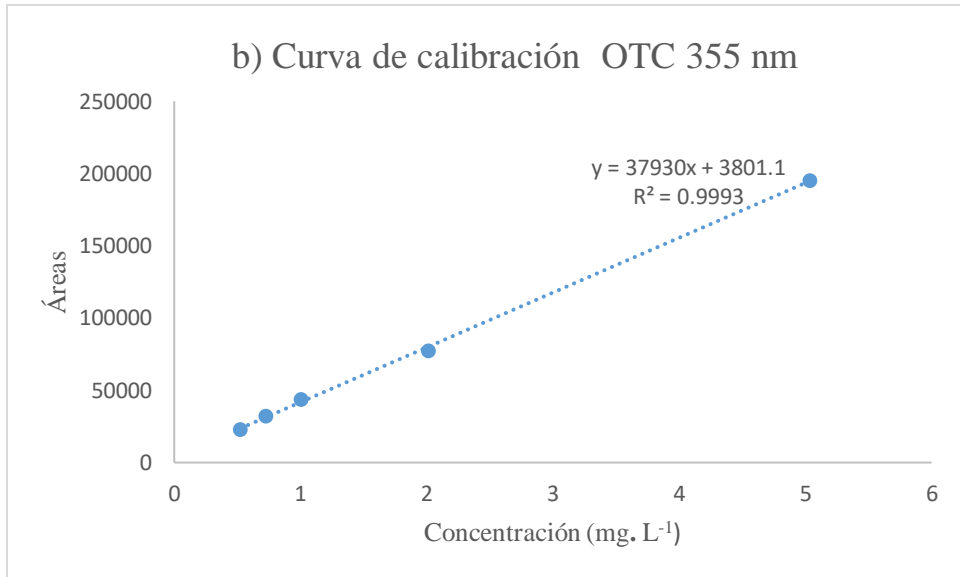
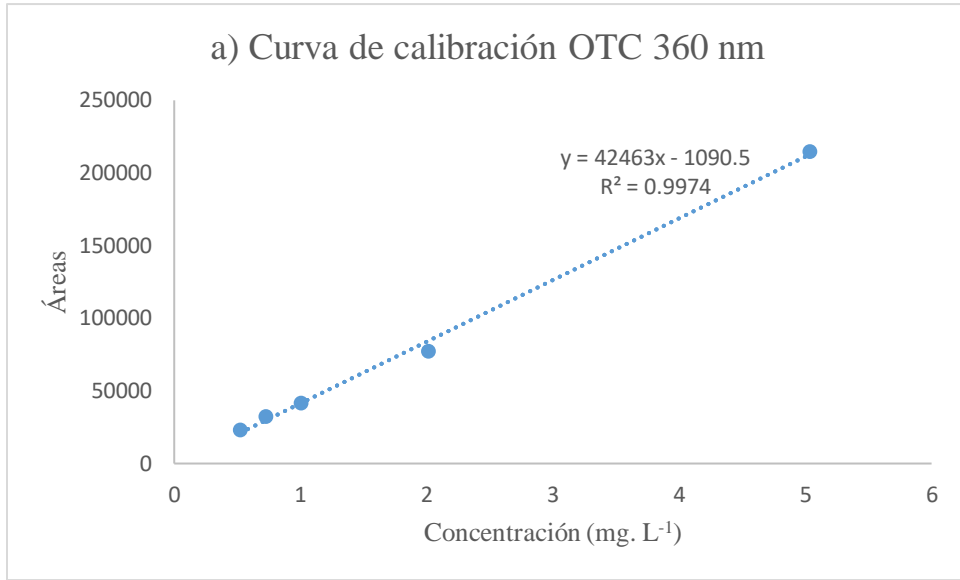
5	2.014	77144	77342	77098	77457	87096	87943
		77162		76968		87662	
		77718		78304		89071	
6	5.035	200904	214903	187964	195436	234226	222016
		197383		195345		238374	
		246423		202999		193449	

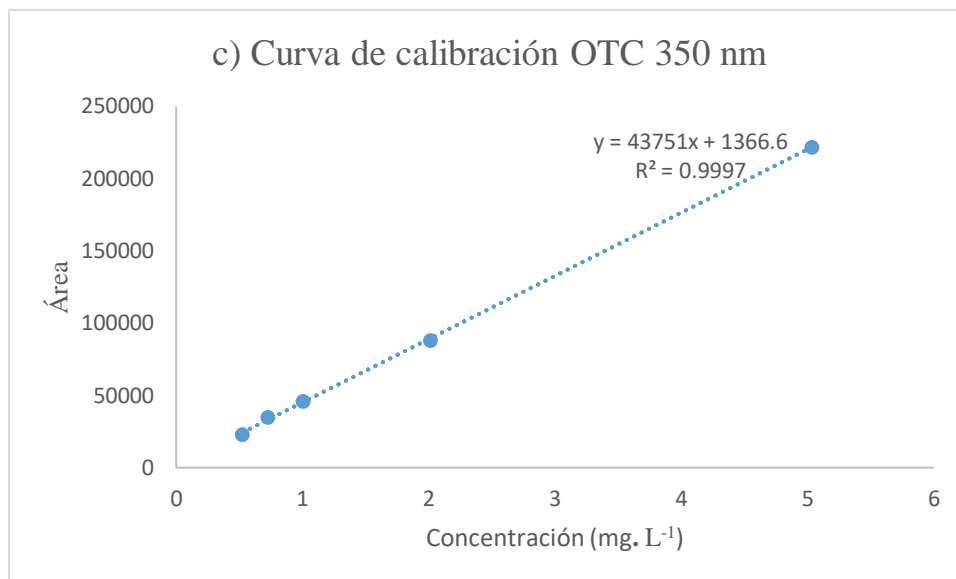
Las ecuaciones de regresión lineal correspondiente a la medición de la curva de calibración de oxitetraciclina a tres longitudes de onda con sus respectivos valores de coeficiente de determinación y correlación son presentadas en la tabla 14. Los valores de coeficientes de correlación ( $r$ ) presentan un valor mayor 0.99, cumpliendo con el criterio de aceptación  $r \geq 0.98$ , expresado por el Organismo Salvadoreño de Acreditación y la guía de Validación de Métodos Analíticos de México. Por tanto, se comprueba que las curvas evaluadas a las tres longitudes de onda poseen un comportamiento lineal, es decir, muestran una respuesta directamente proporcional a la concentración de cada analito en el rango de estudiado.

**Tabla 14. Ecuaciones de regresión lineal, coeficiente de determinación y de correlación a tres longitudes de onda 360, 355, 350 nm**

Longitud de onda (nm)	Ecuación de regresión	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	Coefficiente de correlación $r$ :
360	$y=42463x -1090.5$	0.9974	0.9986
355	$y=37930x+3801.1$	0.9993	0.9996
350	$Y=43751x+1366.6$	0.9997	0.9998

Al observar los gráficos de la figura 21 obtenidos en la evaluación de la curva de calibración mediante la aplicación de la estadística de mínimos cuadrados, estos reflejan un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) muy similar a tres longitudes de onda.





**Figura 21. Gráficos de la curva de calibración correspondiente a OTC**

#### 4.2.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD

Para determinar la exactitud, se realizaron estudios de recuperación. Tras la adición de oxitetraciclina a una muestra de miel libre de antibiótico (OTC) y diferente a la proporcionada por la empresa exportadora, se comparó la diferencia entre el valor teórico de la adición y el resultado encontrado en el análisis de las muestras. El porcentaje de recuperación se calculó en tres niveles, y se fortificaron con 0.725, 1.005 y 5.035 mg. L<sup>-1</sup>.

De esta manera, se menciona que el porcentaje de recuperación para la Comisión Europea 2002/657/CE debe de estar entre el 70-120%. Así mismo, el Organismo Salvadoreño de Acreditación, y la normativa mexicana, mencionan que el porcentaje de recuperación se encuentra entre el 80-120%. El valor promedio encontrado para el porcentaje de recuperación en esta investigación refleja más del 100%, a las tres longitudes de onda estudiadas, por tanto, este parámetro de validación (exactitud) es aceptable para los protocolos Salvadoreños y Europeos, pero no para la normativa mexicana que establece un valor de 98-102% para métodos cromatográficos.

Utilizando los valores de la concentración 0.752 mg. L<sup>-1</sup> se muestra el cálculo respectivo para la determinación de la exactitud:

$$R\% = \frac{0.750}{0.725} * 100 = 103.4$$

Este mismo procedimiento se utilizó para los demás cálculos expresados en la tabla 15.

**Tabla 15. Resultado del porcentaje de recuperación de OTC obtenidos.**

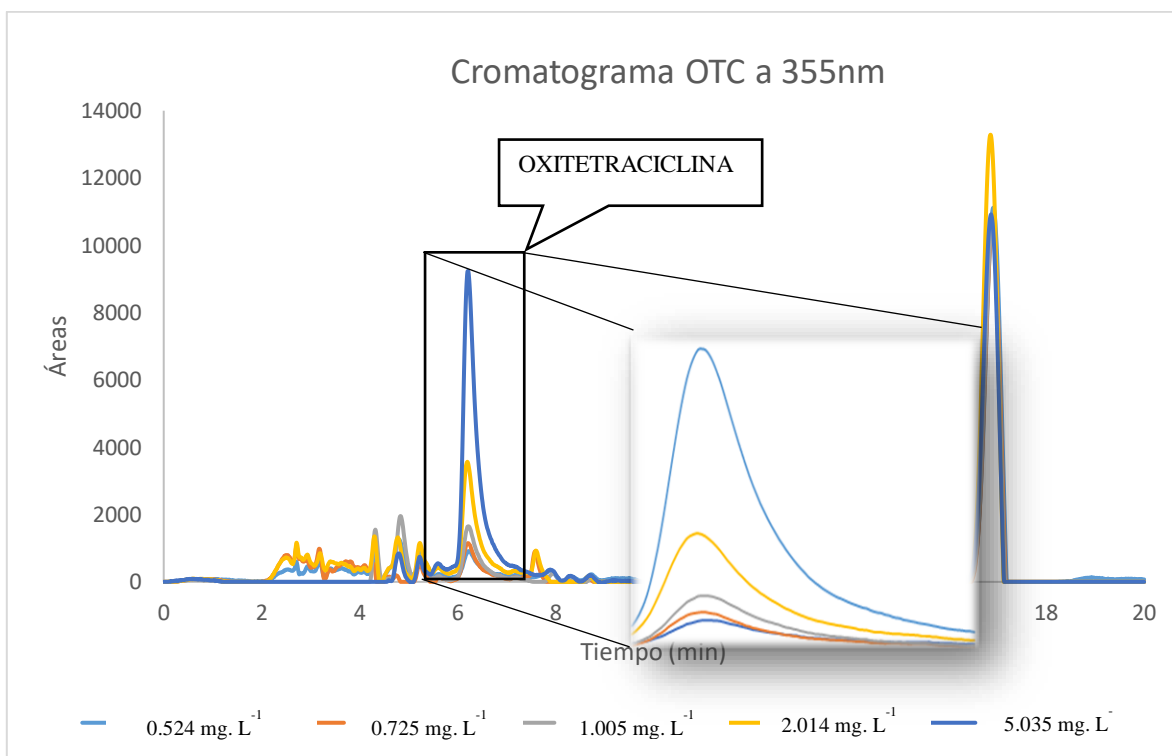
Concentración mg. L <sup>-1</sup>	λ = 360 nm			λ = 355 nm			λ = 350 nm		
	Área	R	%R	Área	R	%R	Área	R	%R
0.725	32265	0.75	103.4	33221	0.77	106.6	33138	0.71	98.0
	33565	0.78	108.1	31651	0.73	100.9	35426	0.76	105.2
	31257	0.73	100.5	31711	0.73	101.1	36577	0.79	108.9
1.007	44699	1.05	104.2	45029	1.08	107.7	45206	0.99	98.1
	39913	0.93	92.8	44005	1.06	105.0	45092	0.99	97.8
	44012	1.03	102.5	42546	1.02	101.2	47393	1.04	103.1
5.035	200904	4.77	94.8	187964	4.86	96.5	234226	5.33	105.9
	197383	4.69	93.2	195345	5.05	100.3	238374	5.43	107.8
	246423	5.86	116.4	202999	5.25	104.3	193449	4.40	87.3
	%R promedio		101.8	%R promedio		102.6	%R promedio		101.3
	S		7.7	S		3.5	S		6.8
	CV		7.52	CV		3.45	CV		6.70

R: Recuperación, %R: Porcentaje de Recuperación

Para la repetibilidad, se contempla en la norma mexicana y salvadoreña un coeficiente de variación no mayor de 2% para métodos cromatográficos. Mientras, la comisión europea establece un coeficiente de variación menor al 20%. Al comparar los coeficientes de variación obtenidos en el análisis, se decide trabajar con los datos encontrados a longitud de onda de 355 nm, puesto que el valor del CV es 3.45, comparado a los datos analizados a longitud de onda de 360 y 350 nm lo cuales presentan coeficientes de variación de 7.51 y 6.70 respectivamente

El coeficiente de variación indica cuan confiables son las estimaciones de las diferentes longitudes de onda. Al tener un menor coeficiente de variación, se concluye una mejor

precisión de los datos, por tal razón, se establece que la longitud de onda de 355 nm es la que permite establecer de mejor forma el monitoreo de la separación de OTC.



**Figura 22. Cromatogramas de OTC con 5 concentraciones diferentes a longitud de onda de 355 nm. Fase móvil: buffer-acetonitrilo-metanol (72:13:15), flujo 0.6 ml. min<sup>-1</sup>, volumen de inyección 20 µl, Pinnacle C18 5 um 150x5.6mm.**

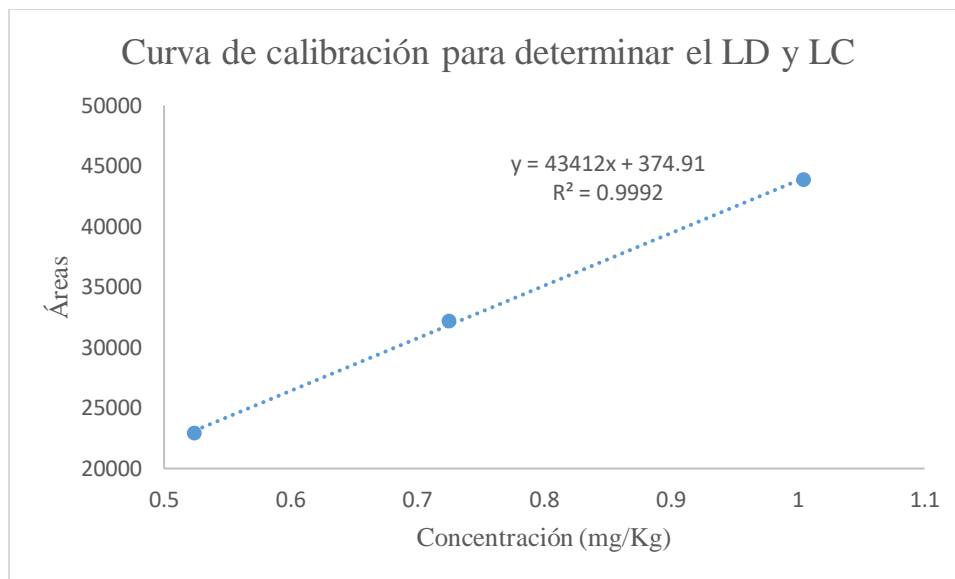
#### 4.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Tomando en cuenta que los parámetros de linealidad son parecidos para las tres longitudes de onda, y que la curva realizada a 355 nm muestra los mejores resultados para los parámetros de exactitud y repetibilidad, se calculó los límites de detección y de cuantificación; trabajando con el método de señal de blanco (3 repeticiones). Se obtuvo un límite de detección de 0.016 mg. Kg<sup>-1</sup> y un límite de cuantificación de 0.050 mg. Kg<sup>-1</sup>, tal como se muestra en la tabla 16.



**Tabla 16. Cálculo del promedio y desviación estándar de blancos para la evaluación del límite de detección y cuantificación a una longitud de onda de 355 nm**

Blanco	Áreas (UA)	Promedio	S <sub>b</sub>
1	3985	4205	219.5
2	4424		
3	4206		



**Figura 23. Curva de calibración para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación**

Se preparó una curva de calibración con las 3 concentraciones más bajas sin tomar en cuenta el blanco, y calcularon los parámetros básicos de regresión, que se resumen en la tabla 17.

**Tabla 17. Parámetros de curva de calibración para la evaluación del límite de detección y cuantificación a una longitud de onda de 355 nm**

Ecuación de regresión lineal	Coficiente de determinación ( $r^2$ )	Pendiente ( $b_1$ )
$Y=43412 X + 374.91$	0.9992	43412

El límite de detección y cuantificación se obtienen mediante el cálculo mostrado a continuación:

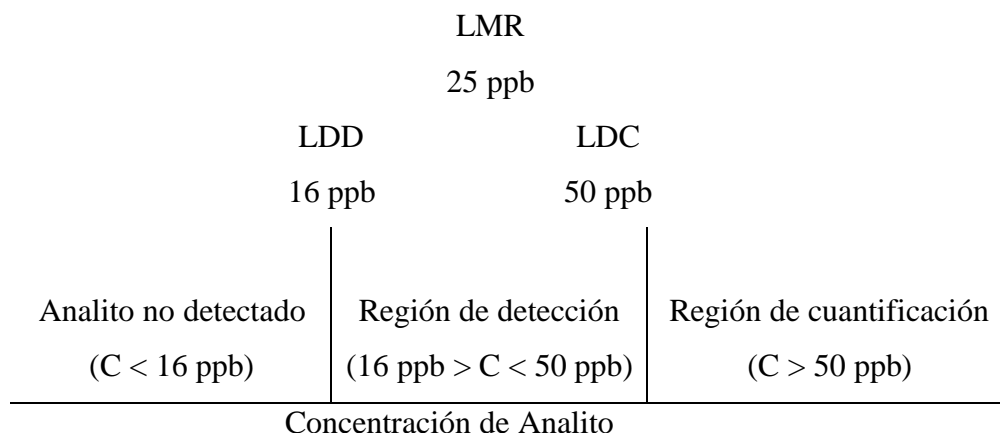
Ecuación 8. Límite de detección

$$L.D = \frac{3.3 * Sb}{b_1} \qquad L.D = \frac{3.3|219.5|}{43412} = 0.016 \text{ mg.kg}^{-1}$$

Ecuación 9. Límite de cuantificación

$$L.C = \frac{10 * Sb}{b_1} \qquad L.C = \frac{10|219.50|}{43412} = 0.050 \text{ mg.kg}^{-1}$$

Teniendo en cuenta la Norma Europea de miel, la cual, establece un LMR provisional de 25 partes por mil millones (ppb) para la oxitetraciclina en miel. Y el límite de detección de 16 ppb encontrado durante la investigación, se afirma que los resultados obtenidos al aplicar el método de validación condujeron a la detección de concentraciones de OTC por debajo de establecido en la legislación. El límite de detección permite comprobar que todas las muestras de miel estudiadas cumplen el requisito de LMR, establecido por la normativa europea. Sin embargo, el método de validación arroja un límite de cuantificación de 50 ppb, lo que restringe la cuantificación del antibiótico por debajo de este valor; es decir, imposibilita al método definir si una muestra cumple la norma en el rango de los 16 ppb a los 50 ppb.



**Figura 24. Intervalos de no detección, detección y cuantificación, definidos por límite de detección y límite de cuantificación.**

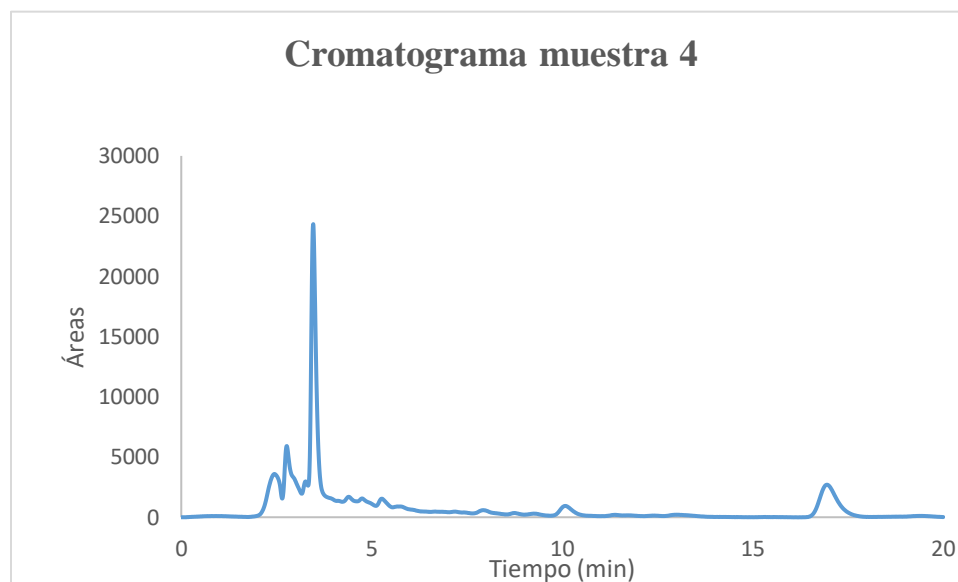
#### 4.2.3.1 RESULTADO DE ANÁLISIS DE MUESTRAS

El análisis de residuos de oxitetraciclina en 15 muestras de miel es resumido en la tabla 17, donde no se detectan residuos de OTC en la miel; o, en otras palabras, el valor de su concentración se encuentra por debajo del límite de detección del método utilizado en esta investigación experimental.

**Tabla 17. Resultados del análisis de muestras de miel.**

No	Código	Areas (UA)	Concentración (mg de OTC /Kg de miel)
1	MM1	1382	No detectable
2	MM2	6638	No detectable
3	MM3	2176	No detectable
4	MM4	1711	No detectable
5	MM5	5512	No detectable
6	MM6	4713	No detectable
7	MM7	1930	No detectable
8	MM8	1682	No detectable
9	MM9	1189	No detectable
10	MM10	1219	No detectable
11	MM11	2212	No detectable
12	MM12	7702	No detectable
13	MM13	5202	No detectable
14	MM14	2603	No detectable
15	MM15	1948	No detectable

En el cromatograma de la muestra cuatro, puede observarse la ausencia de área correspondiente a OTC, por lo que dicha muestra es aceptable para su distribución fuera de las fronteras de Centroamérica.



**Figura 25. Cromatogramas de OTC para muestra 4 a longitud de onda de 355 nm. Fase móvil: buffer-acetonitrilo-metanol (72:13:15), flujo 0.6 ml. min<sup>-1</sup>, volumen de inyección 20 µl, Pinnacle C18 5 um 150x5.6mm (resumen de condiciones cromatográficas).**

## 5. CONCLUSIONES

1. En todas las muestras de miel analizadas, el porcentaje de azúcares reductores se encuentra arriba del 70%, por lo que cumplen el requisito de la Norma Salvadoreña para la miel de abejas (NSO 67.19.01.08), CODEX ALIMENTARIUS y Normativa Europea de la miel, en donde se establece que el porcentaje mínimo de azúcares reductores para miel de flores es del 60%.
2. El porcentaje de cenizas no se encuentra contemplado en la Norma Salvadoreña, sin embargo, en el CODEX ALIMENTARIUS y la Norma Europea de miel, se establece que el porcentaje máximo es del 0.80%, por lo que las mieles analizadas poseen un porcentaje de ceniza aceptable; ya que, la muestra con mayor valor para este parámetro fisicoquímico es de 0.27%.
3. Tanto la Norma Salvadoreña de miel, el CODEX ALIMENTARIUS y la Norma Europea, establecen para la humedad en muestras de miel de abeja, un valor máximo de 20%, por lo tanto, todas las muestras estudiadas cumplen con el límite máximo requerido, sin embargo, es importante mencionar que la muestra 3 presentó un porcentaje de 19.4%, por lo que esa miel es más susceptible a fermentar.
4. El pH en las muestras de miel oscila entre los valores normales en un rango de 3.58 a 4.53. La acidez natural de la miel permite inhibir el crecimiento de microorganismo y conservar la miel. Valores altos de pH son indicativo de la adición de jarabes hidrolizados o de siropes de fructosa con fines fraudulentos.
5. Bajo las condiciones de alta sensibilidad del equipo de HPLC cuyo límite de detección arrojó el valor de 16 ppb y los parámetros de validación establecidos en esta investigación, se determinó que las mieles cosechadas en el departamento de Chalatenango no contienen residuos de oxitetraciclina a niveles detectables.
6. Debido a la naturaleza de la miel como matriz compleja, el proceso de extracción utilizando cartuchos SPE es un paso crítico para la eliminación de interferencias, y mejorar los resultados de recuperación en la investigación.

7. Las condiciones cromatográficas utilizadas en esta investigación servirán como procedimiento base para futuras investigaciones sobre la OTC en miel de abeja.
8. Según la Comisión Europea 2002/657/CE, el porcentaje de recuperación debe de estar entre el 70-120%. Así mismo, el Organismo Salvadoreño de Acreditación, menciona que el porcentaje de recuperación se encuentra ubicado entre el 80-120%. El valor promedio encontrado para el % de recobro de OTC en esta investigación refleja más del 100%, a las tres longitudes de onda estudiadas 360, 355, 350 nm los cuales fueron 101.8, 102.6 y 101.3, respectivamente; por lo tanto, existe concordancia entre el valor obtenido en la medida y el valor real de concentración en cada adición.
9. Los resultados obtenidos en la medición de la longitud de onda de 355 nm evidenciaron un coeficiente de variación de 3.45, al tener un menor CV en comparación con las otras longitudes de onda analizadas, se concluye una mejor repetibilidad para el método.
10. Los valores de coeficientes de correlación ( $r$ ) de las curvas de calibración presentan un  $r > 0.99$ , cumpliendo con el criterio de aceptación  $r \geq 0.98$ , expresado por el Organismo Salvadoreño de Acreditación y la guía de Validación de Métodos Analíticos de México.
11. Teniendo en cuenta la Norma Europea de miel, la cual, establece un LMR provisional de 25 partes por mil millones (ppb) para la oxitetraciclina en miel, así como el límite de detección de 16 ppb encontrado durante la investigación, se afirma que los resultados obtenidos al aplicar el método de validación condujeron a la detección de concentraciones de OTC por debajo de lo establecido en la legislación.
12. El límite de detección permite comprobar que todas las muestras de miel estudiadas cumplen el requisito de LMR, establecido por la normativa europea. Sin embargo, el método de validación arroja un límite de cuantificación de 50 ppb, lo que restringe la cuantificación del antibiótico por debajo de este valor.

13. La composición química de la miel de abeja puede alterarse debido a los factores de contaminación del medio ambiente. Sin embargo, las mieles estudiadas no presentan residuos de oxitetraciclina. Estos resultados indican que los apicultores no utilizan la OTC o cumplen con prácticas adecuadas en el uso de este medicamento.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Se estima conveniente seguir una línea de investigación sobre este producto de exportación en El Salvador, para la generación de información sobre la composición química de la miel, pues se desconoce a que sustancias químicas presentes en la miel pertenecen muchas señales obtenidas en los cromatogramas. Así mismo se brindaría un punto de vista científico a los apicultores de todo el país.
2. Debido a los pequeños volúmenes de trabajose recomienda que al trasladar la solución de miel al cartucho de SPE, se utilice una pipeta pasteur para asegurar la completa transferencia de la muestra.
3. Es recomendable almacenar a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  el estándar de oxitetraciclina y las disoluciones preparadas, con el fin de evitar la degradación del antibiótico.
4. Es recomendable el reposo de al menos dos días para las muestras después del proceso de extracción, para asegurar que la oxitetraciclina se estabilice y brinde una mejor respuesta durante la inyección en el HPLC.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. González, S., Tamayo, J., Vargas, L., y Duch, E. (2011). Permanencia de antibioticos en la miel de tahonal (*viguiera dentata*) y su impacto en algunos factores de calidad. *Revista mexicana de agronegocios*, 28(1), 567–574.
2. Ulloa, J., Mondragon, P., Rodriguez, R., Vazquez, J., y Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista fuente*, 2(4), 11-18.
3. Sánchez, W., Vásquez J., & Benítez S. (2006). *Estudio de mercado y viabilidad técnica operativa para la comercialización de miel de abeja en el cantón San Juan Loma Alta, municipio de Berlín, departamento de Usulután*. (Tesis de Pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
4. Grande, H., Martínez, F. (2017). *Impacto financiero del reglamento técnico salvadoreño para la apicultura*. (Tesis de Maestria). Universidad de El Salvador, El Salvador.
5. Viñas P., Balsalobre N., López C., y Hernández, M. (2004). Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *Journal of Chromatography A*, 1022(1), 125-129.
6. Pérez, E., y Iglesias, L. (2010). Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28(2), 122-130.
7. Requema, M. (2014). *Determinación de tetraciclinas en miel por HPLC-MS/MS. Validación del procedimiento analítico*. (Tesis de Maestria). Universitat politècnica de valència, España.
8. Dirección e innovación de calidad (DICA). (2020). *El 80% de la miel producida se exporta a UE*. Recuperado de <http://dica.minec.gob.sv/inventa/unidades/unidad-alimentos-y-bebidas/1914-el-80-de-la-miel-producida-se-exporta-a-ue.html>
9. Centre for Science And Environment. (2010). *Antibiotics in honey. Factsheet 2: Regulations: not working to regulate contaminants*. Recuperado de : [https://cdn.cseindia.org/attachments/0.13451000\\_1499509351\\_factsheet2.pdf](https://cdn.cseindia.org/attachments/0.13451000_1499509351_factsheet2.pdf)

10. Verde, M. (2014). Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 25-31.
11. Castro, A. (2014). *Evaluación en producción de miel de abeja mellifera (Apis Mellifera) manejado con media alza y excluidor de reina*. (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
12. Mendoza, A. (2009). *Aplicación del control estadístico a los análisis de antibióticos en miel de abeja*. (Tesis de Grado). Instituto politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, México.
13. Albino, F. (2007). Programa de la Unión Europea para el control de residuos en miel. Experiencia de un Laboratorio Nacional de Referencia Apícola en Italia. *Agro sur*, 35(1), 30-34.
14. Chicas Baños, D. (2014). *Determinación de parámetros fisicoquímicos en mieles y propóleos de distintos géneros de abejas por medio de técnicas electroanalíticas*. (Tesis de Pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
15. Martínez, D. y Argota, S. (2013). Diseño de una minicadena productiva para apicultura orgánica en San Andrés Islas de un Itinerario de ruta como herramienta de gestión e integración. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 14(2), 129-147.
16. Pierini, G. (2014). *Desarrollo de métodos analíticos para la evaluación de parámetros de calidad de propóleos*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Sur, Argentina.
17. Chinchilla, J. & Palencia, M. (2006). *Estrategia para el fortalecimiento de la apicultura en la zona centro occidental de El Salvador; caso práctico: Comisión Nacional Apícola de El Salvador (CONAPIS)*. (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
18. Ardón, C., Dueñas, K., & Mejía, T. (2017). *Estudio de factibilidad para la creación de un apiario para exportación de miel en la comunidad San José los Sitios, municipio de talnique, Departamento de La Libertad*. (Tesis de pregrado). Universidad de El

Salvador, El Salvador.

19. Vázquez, L. (2006). *Plan de negocios para el proyecto de producción y comercialización de miel de abeja ejecutado por el Centro Nacional de tecnología Agropecuaria y Forestal, en el Municipio de Moncagua, Departamento de San Miguel*. (Tesis de pregrado). Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador.
20. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2020). Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>
21. Secretaria de Integración Económica Centroamericana (SIECA). (2020). Recuperado de <http://www.sec.sieca.int/>
22. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2009). Miel de Abejas, Especificaciones. NSO 67.19.01:08. Segunda Actualización. El Salvador.
23. White J., Doner W. (1980). Honey composition and properties. Agriculture Handbook, 82-91.
24. Jimenez, E. (2017). *Procesamiento y vida en anaquel de miel de abejas peruanas*. (Trabajo de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
25. Velásquez Reales, J.A.(2014). *Aplicación de técnicas electroquímicas en el control de calidad de miel*. (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
26. Haro, A. (2004). *Elaboración de Una Mezcla de Miel Crema de Abeja (Apis Mellifera L.) Con Harina de Piñones de Araucaria Araucana ((Mol) Koch)*. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
27. Guevara, N. (2017). *Determinación de oxitetraciclina, en muestras de miel de áreas de explotaciones apícolas de la provincia de Pichincha-Ecuador, mediante la técnica Elisa*. (Tesis de pregrado). Universidad Central Del Ecuador, Ecuador.
28. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2020). *Manual de buenas prácticas de producción Agrícola*. Recuperado de [https://www.mieldemalaga.com/data/manual\\_buenas\\_practicas\\_produccion%20\\_miel.mex.pdf](https://www.mieldemalaga.com/data/manual_buenas_practicas_produccion%20_miel.mex.pdf)

29. Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A. y Ansari, M. (2012). Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminant of honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal*, 930849.
30. Dupuy, A. (2016). *Farmacocinética de oxitetraciclina en dosificación oral múltiple en cerdos. Análisis PK- PD*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
31. Ngando, E. (2017). *Control del proceso de inversión de la sacarosa en la Fabricación de Jarabes*. (Tesis de pregrado). Universitat Politècnica de València, España.
32. De la vega, J. (2007). Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en miel. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
33. Avallone, C., Montenegro, S. Gruszycki, A., Baez, M., Tauguinas, A., Cravzov, A., y Glibota, G.. (2003). *Alteraciones fisicoquímicas de los principales parámetros de la miel cuando es utilizada como materia prima de alimentos*. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
34. Zandamela, E. (2008). *Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique*. (Tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, España.
35. Sgariglia, M., Soberón, J., Sampietro, D., Vattuone, M. (2010). *Cromatografía : Conceptos Y Aplicaciones*. *Rev Arakuku*. (1):1-6.
36. UPAC. (1993). *Nomenclature for Chromatography, pure & Applied Chemistry*. 65(4), 818-872.
37. Skoog D., West D., Holler F. (2015). *Fundamentos de Química Analítica (Novena edición* Ed. McGraw-Hill).
38. Méndez, M. (2008). *Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura*. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Chile.
39. García, A., Yusá, D. (2016). HPLC Instrumental. Universitat Politècnica de València, España.

40. Página oficial de Shimadzu (2020). *Sistema de cromatografía UHPLC Nexera Quaternary*. Recuperado de <https://www.medicalexpo.es/prod/shimadzu/product-71044-722780.html>
41. Cañas, A. (2016). *Determinación de fármacos de uso veterinario en matrices de origen animal, utilizando como estrategia analítica la extracción por sorción con disco rotatorio y técnicas cromatográficas para su aplicación en estudios de farmacocinética y de depleción de residuos*. (Tesis doctoral). Universidad de Chile, Chile.
42. Torres, C. (2012). *Encapsulación de oxitetraciclina en nano partículas poliméricas y nanoemulsiones aceite/agua: Un ensayo para su futura administración a salmónidos*. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
43. Carmona, I. (2015). *Determinación de antibióticos en fuentes de abastecimiento de agua superficial del área metropolitana, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV-F*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
44. Harris, C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Recuperado de [https://books.google.com.sv/books?id=H\\_8vZYdL70C&pg=RA1PA611&dq=Harris,+C.+\(2007\).+An%C3%A1lisis+qu%C3%ADmico+cuantitativo+silanol&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwir1qS1vpHyAhXFZzABHZR1CmwQ6AEwAHoECAMQAg#v=onepage&q=Harris%2C%20\(2007\).%20An%C3%A1lisis%20qu%C3%ADmico%20cuantitativo%20silanol&f=false](https://books.google.com.sv/books?id=H_8vZYdL70C&pg=RA1PA611&dq=Harris,+C.+(2007).+An%C3%A1lisis+qu%C3%ADmico+cuantitativo+silanol&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwir1qS1vpHyAhXFZzABHZR1CmwQ6AEwAHoECAMQAg#v=onepage&q=Harris%2C%20(2007).%20An%C3%A1lisis%20qu%C3%ADmico%20cuantitativo%20silanol&f=false)
44. Harris, C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Recuperado de <https://books.google.es/books?id=H8vZYdL70C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
45. Zhou J, Xue X, Li Y, et al. (2008). Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chem*, 115(3):1074-1080.
46. Romero, F. (2014). *Estudio preliminar de posibles biomarcadores del cáncer de próstata en orina*. (Tesis de grado). Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

47. Hurtado, N. (2017). *Comparación entre metodologías analíticas por HPLC con detectores de arreglo de diodos y fluorescencia para la determinación de eritromicina en plasma de salmonidos*. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
48. Jimenez, R. (2007). *Técnicas cromatográficas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
49. Carmona, F. (2006). *Desarrollo y validación de un método de extracción en fase sólida para la determinación de plaguicidas cationicos (cuats) en alimentos*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
50. Pena A, Pelantova N, Lino CM, Silveira MIN, Solich P. (2005). Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *J Agric Food Chem*. 53(10):3784-3788.
51. Water™. (2010). Oasis Sample Extraction Products: Chemistry and formats. Recuperado de <https://www.waters.com/nextgen/pr/en/library/application-notes/2010/oasis-sample-extraction-products-chemistry-and-formats.html?hcb=1>
52. Li R, Yuan Q, Zhang Y, Ling J, Han T (2011). Hydrophilic interaction chromatographic determination of oxytetracycline in the environmental water using silica column. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 34(7):511-520.
53. Gibbs H, Pérez G, Szigety E, Viau J, Tintori, M. (2014). ¿Cómo estimar la concentración de azúcar en gaseosas? Una introducción a la refractometría. *Rev Eureka sobre enseñanza y Divulg las ciencias*, 11(2):254-262.
54. Ramón J, Sánchez B. (2002). *Refractómetros e interferómetros*. Colección de instrumentos científicos de la Universitat de València, España.
55. Equilibrios y volumetrías de oxidación-reducción. (2012). Recuperado de <https://www.um.es/documents/4874468/11830096/tema-8.pdf/eee4b9f8-898f-4f94-bed3-315fafa02d87>
56. Murat, O., Dietrich, E., Mohammed, H y Petroianu A. (2009). Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Medical Research Reviews*, 31 (1),

93-117.

57. Armas, M., Oramas, I., Martínez, M., Tornés, V., Bañobre, L., Gonzáles, G. Fernández, M. y Hernández, E. (1998). Validación de técnicas utilizadas en el control de la caldiad. *Rev Cubana Farm*, 32(2):106-12.
58. Iraheta, J., (2017). *Propuesta de validación de método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cloranfenicol colirio*. (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
59. Moreno, A. & Morillo, C. (2015). *Calidad y seguridad en el Laboratorio*. Editorial Síntesis. España
60. Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA). (2017). *Validación de métodos analíticos fisicoquímicos*. El Salvador.
61. Benavides, B. (2020). *Sistematización: "Resultados e impactos del parque apícola en el departamento de Chalatenango*. Chalatenango, El Salvador: Asociación Cooperativa de Comercialización, Producción, Ahorro y Crédito de los apicultores de Chalatenango, R.L.
62. Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biologos, A.C. (2002). *Métodos Analíticos: Guía de validación*. México.
63. FAO/OMS. 1995. *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento*. (novena edición).
64. Periago, M., Navarro, I., Alaminos, A., y . (2016). Quality parameters in different botanical origins of honey produced in the alpujarra. *An Vet Murcia*. 71(32):59-71.
65. Peña, A. (2011). *Estudio de Sistemas de extracción en fase sólida para su aplicación en la determinación del plaguicida dimeotoato*. (Tesis de pregrado). Universidad politécnica de Valencia, España.

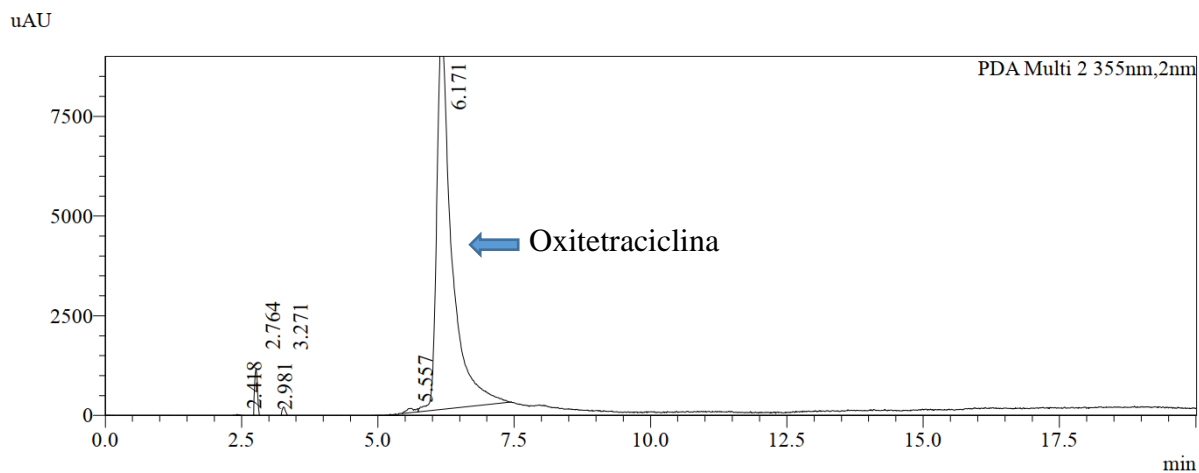
## 8. ANEXOS

### Anexo1. Tabla Chataway

TABLA

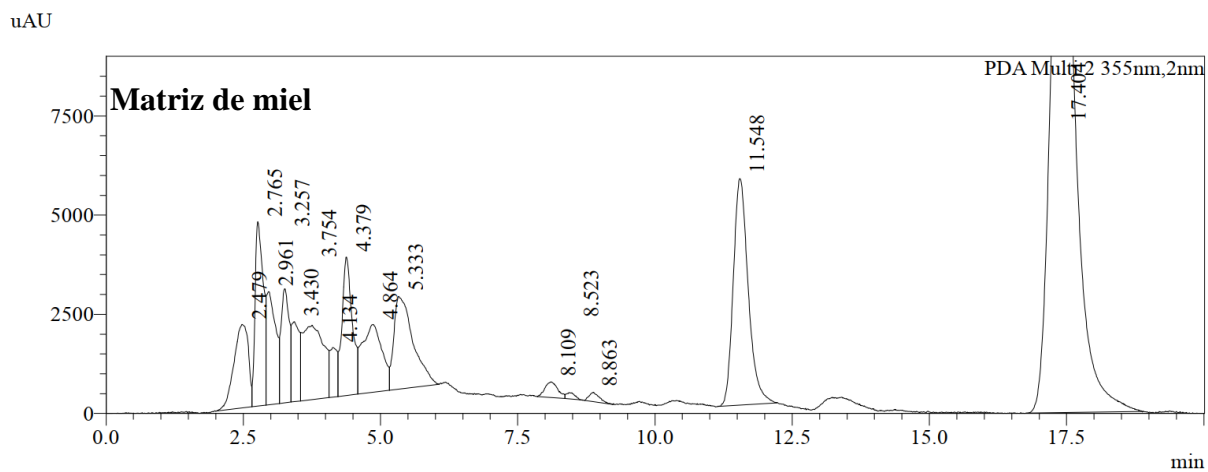
Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad	Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad	Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad
1.5044	13.0	1.4935	17.2	1.4830	21.4
1.5038	13.2	1.4930	17.4	1.4825	21.6
1.5033	13.4	1.4925	17.6	1.4820	21.8
1.5028	13.6	1.4920	17.8	1.4815	22.0
1.5023	13.8	1.4915	18.0	1.4810	22.2
1.5018	14.0	1.4910	18.2	1.4805	22.4
1.5012	14.2	1.4905	18.4	1.4800	22.6
1.5007	14.4	1.4900	18.6	1.4795	22.8
1.5002	14.6	1.4895	18.8	1.4790	23.0
1.4997	14.8	1.4890	19.0	1.4785	23.2
1.4992	15.0	1.4885	19.2	1.4780	23.4
1.4987	15.2	1.4880	19.4	1.4775	23.6
1.4982	15.4	1.4875	19.6	1.4770	23.8
1.4976	15.6	1.4870	19.8	1.4765	24.0
1.4971	15.8	1.4865	20.0	1.4760	24.2
<b>1.4966</b>	<b>16.0</b>	1.4860	20.2	1.4755	24.4
<b>1.4961</b>	<b>16.2</b>	1.4855	20.4	1.4750	24.6
1.4956	16.4	1.4850	20.6	1.4745	24.8
1.4951	16.6	1.4845	20.8	1.4740	25.0
1.4946	16.8	1.4840	21.0	-	-
1.4940	17.0	1.4835	21.2	-	-

### Anexo 2. Cromatograma correspondiente a inyección de OTC (5 mg. L<sup>-1</sup>) sin matriz.

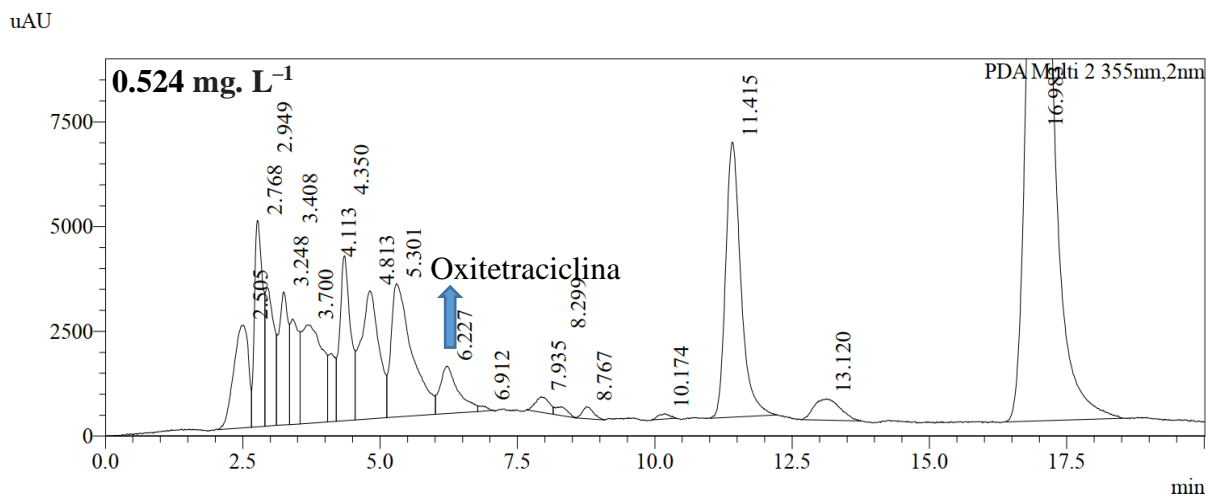




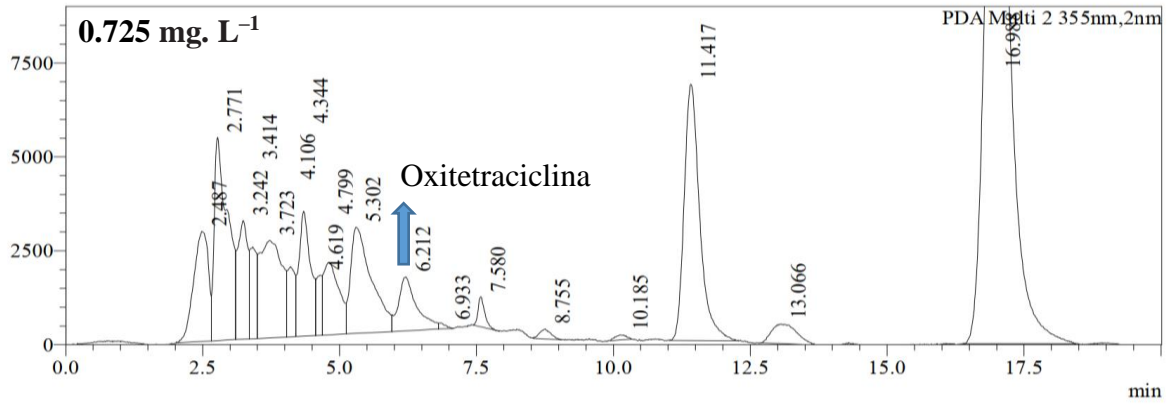
### Anexo 3. Cromatograma de análisis de miel libre de OTC utilizada en la construcción de la curva de calibración.



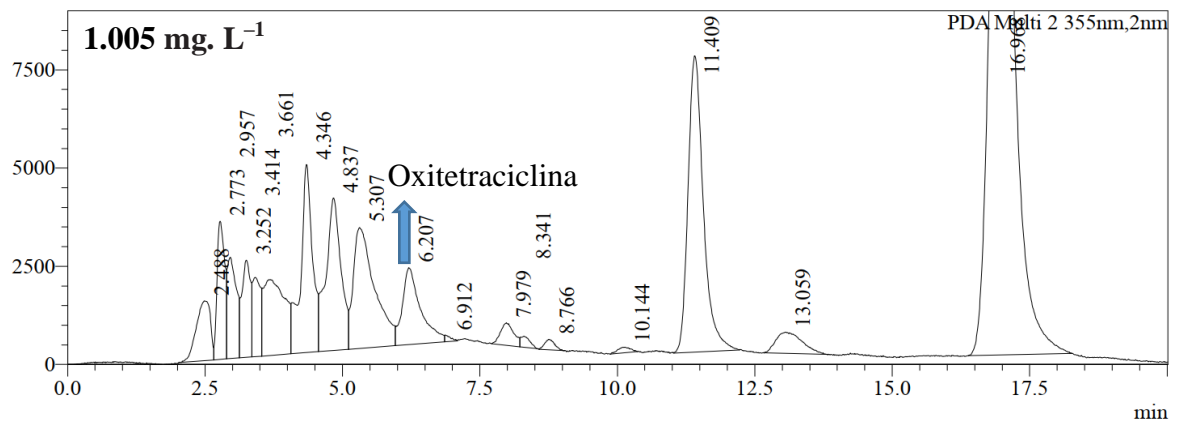
### Anexo 4. Cromatogramas correspondientes a curva de calibración



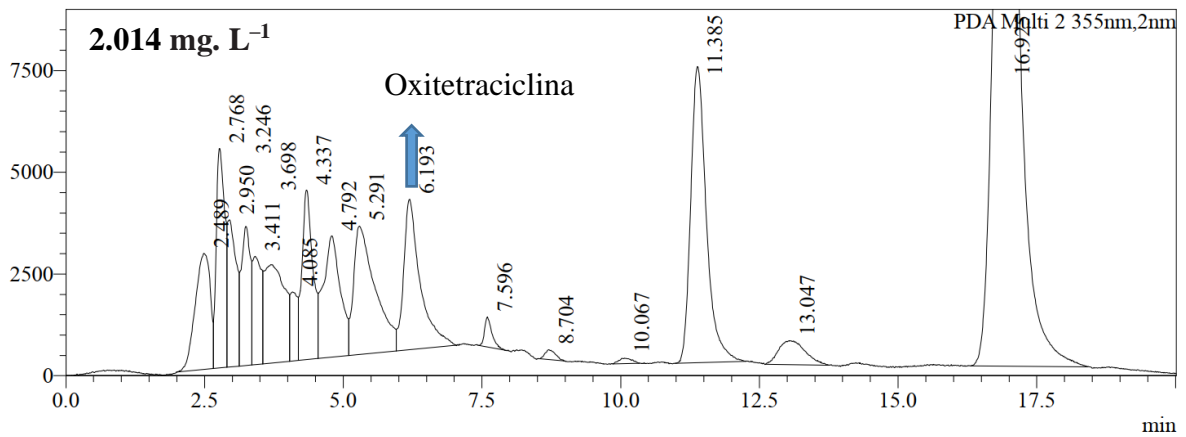
uAU



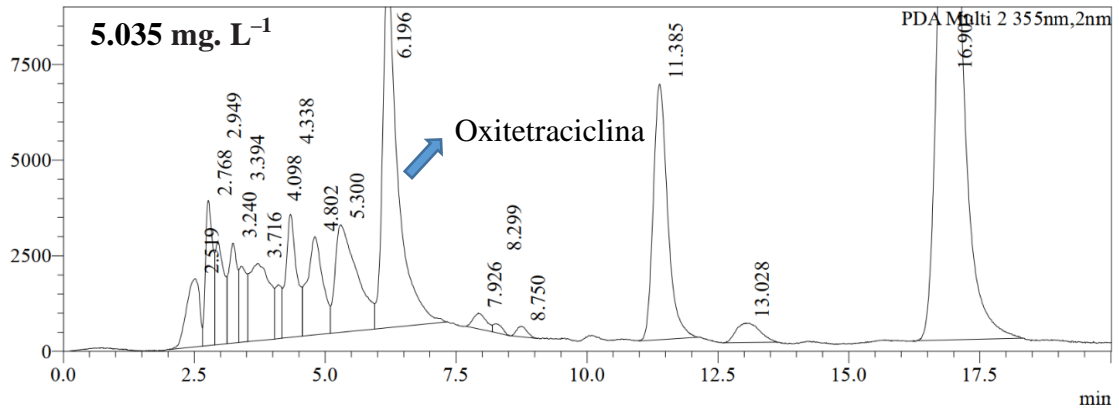
uAU



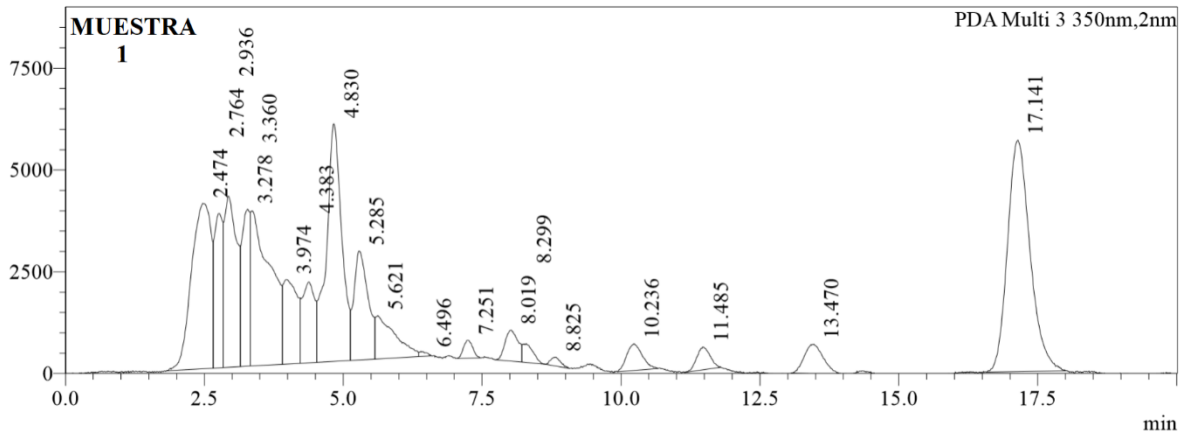
uAU

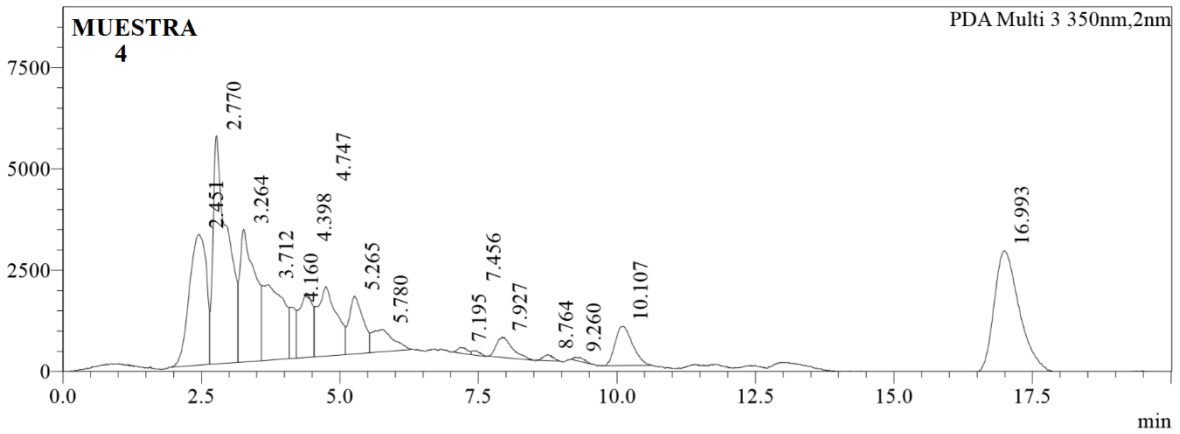
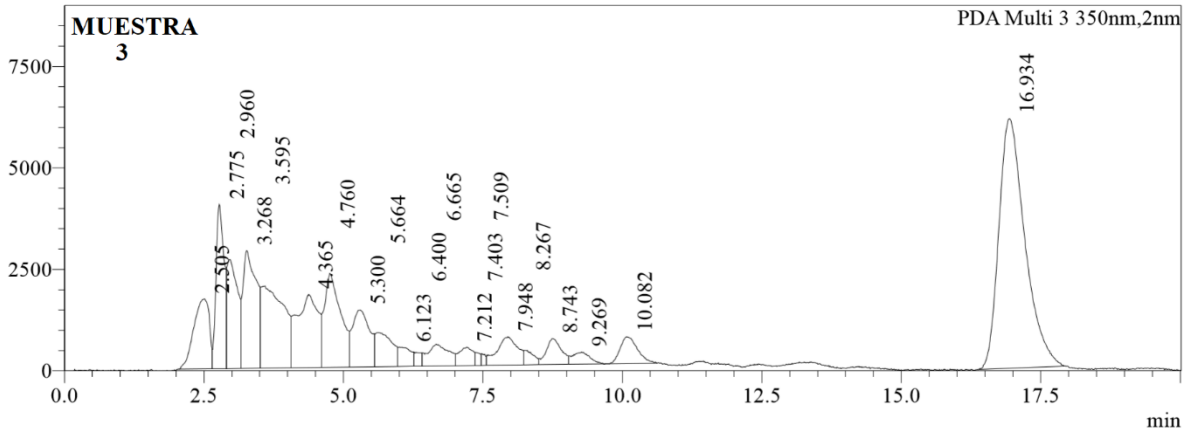
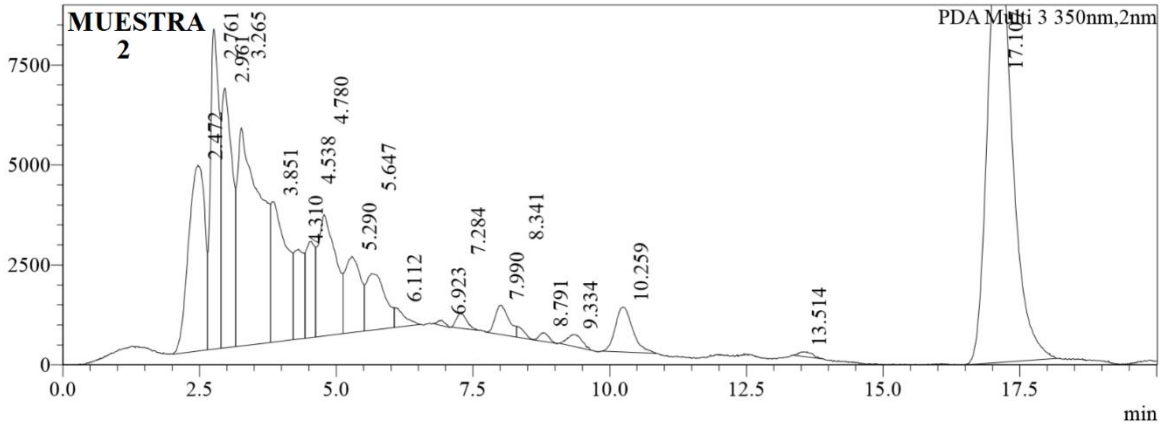


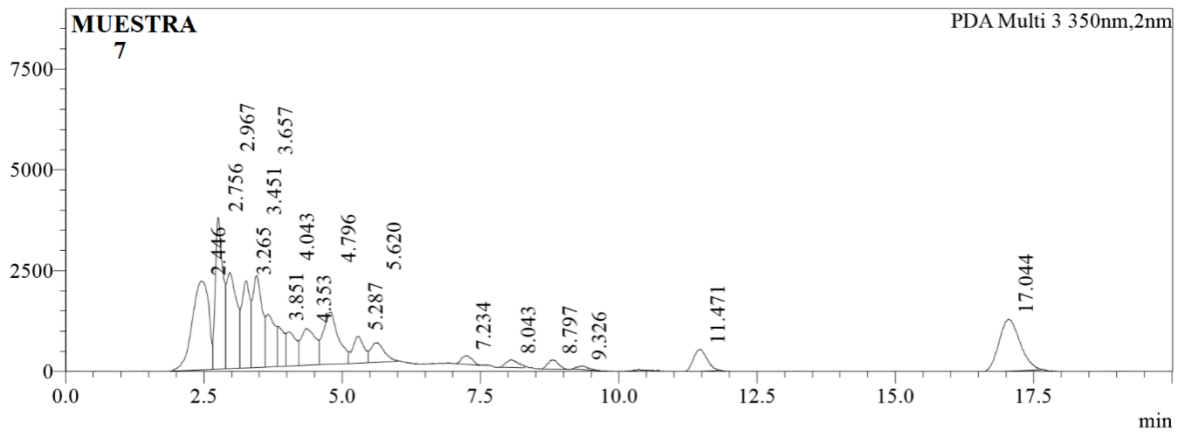
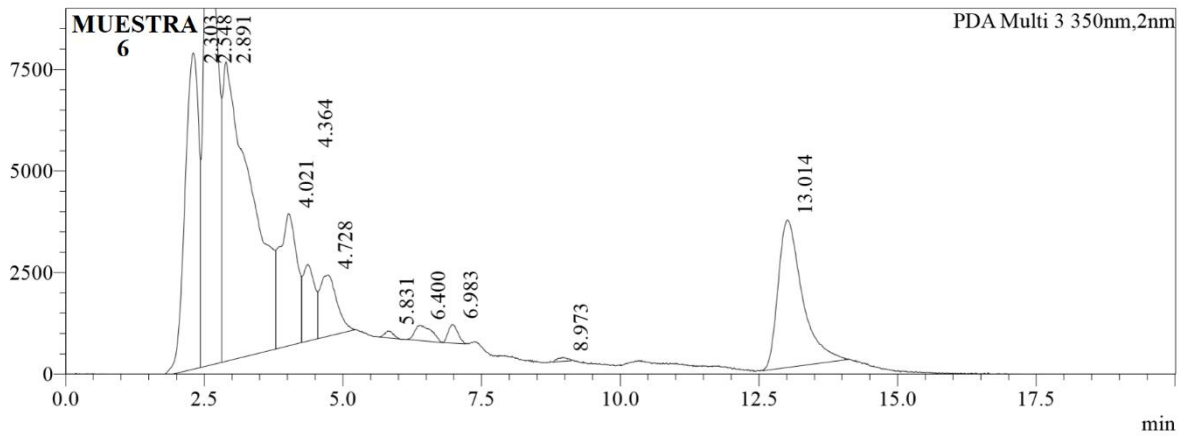
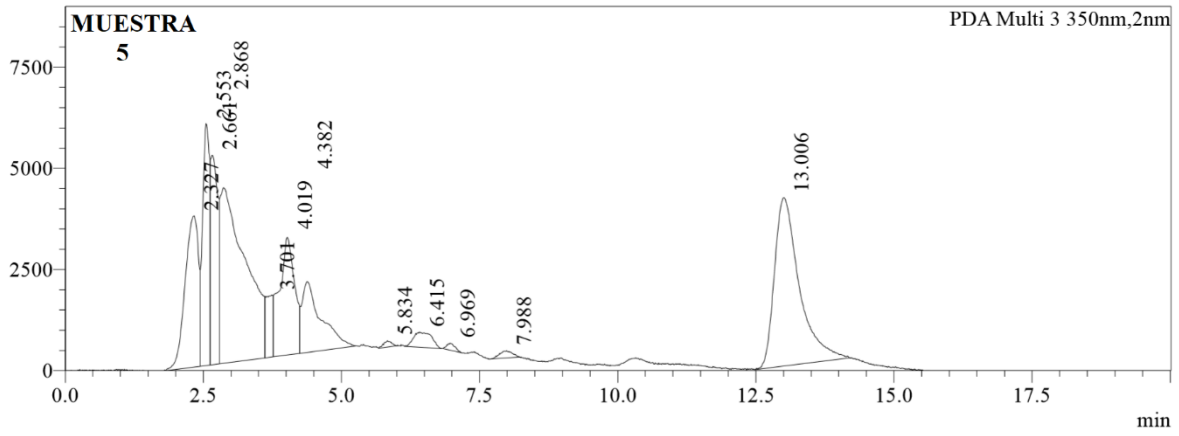
uAU

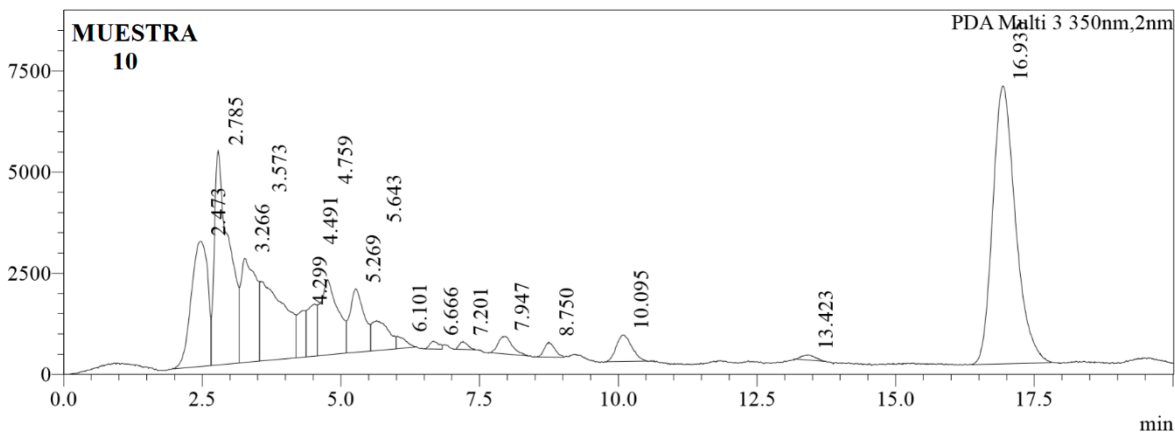
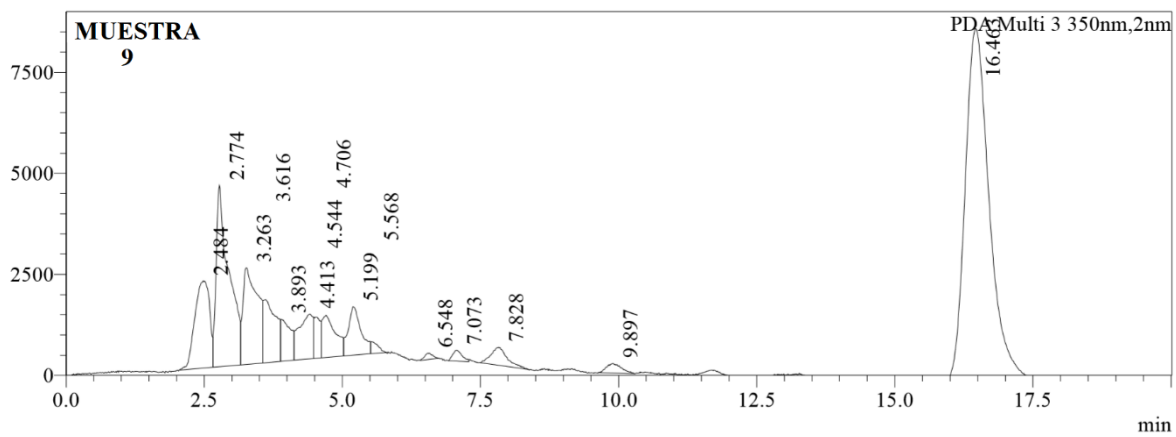
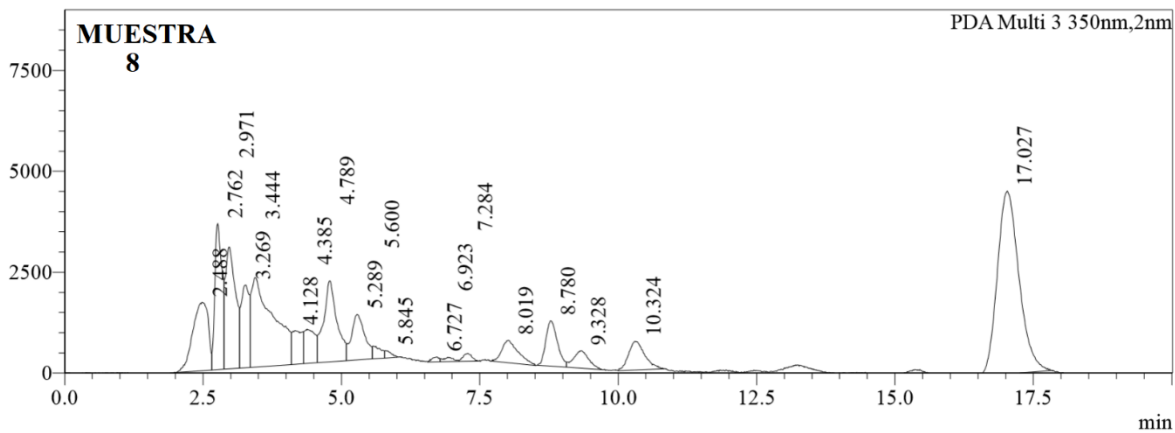


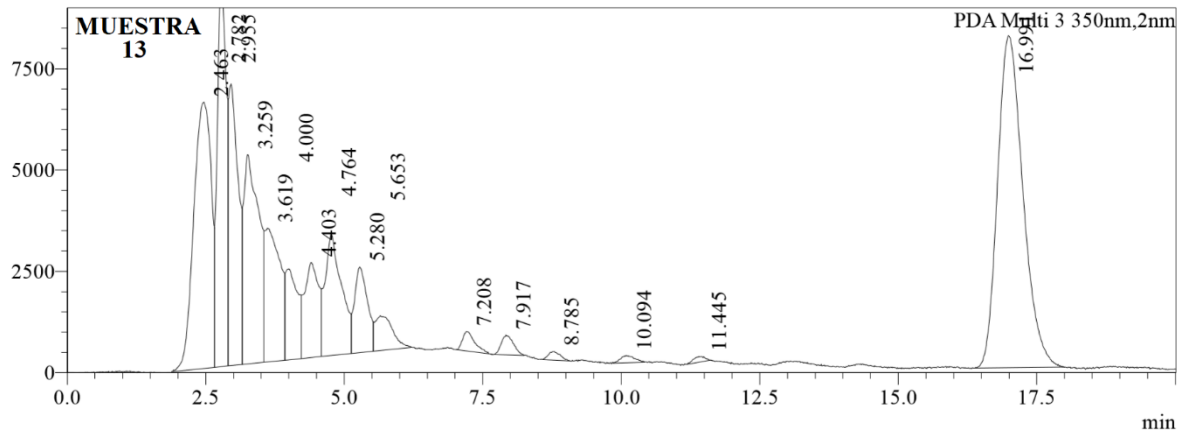
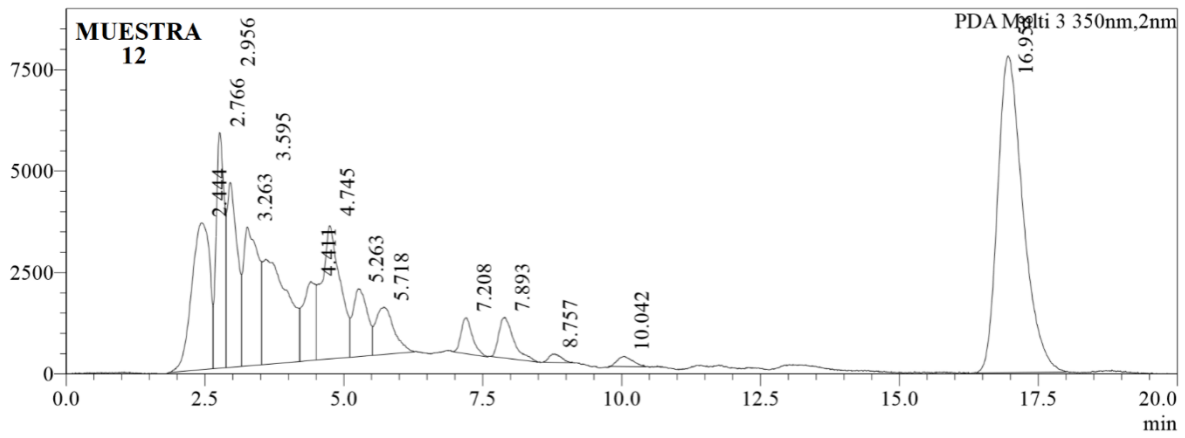
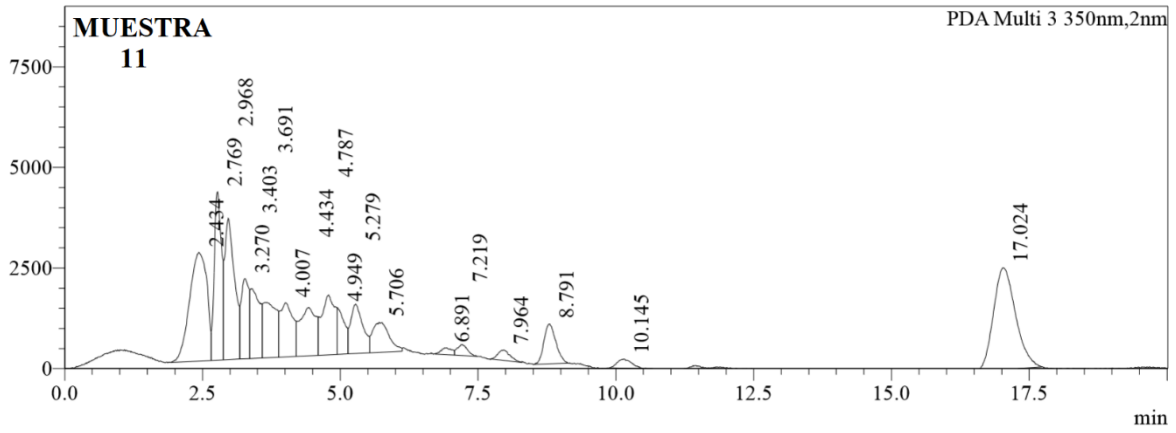
### Anexo 5. Cromatograma correspondiente a muestras de miel analizadas

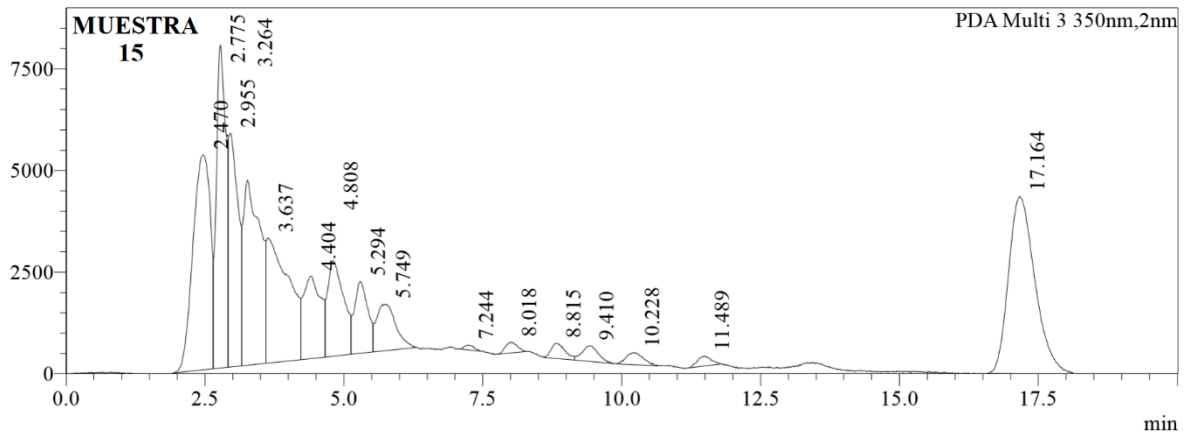
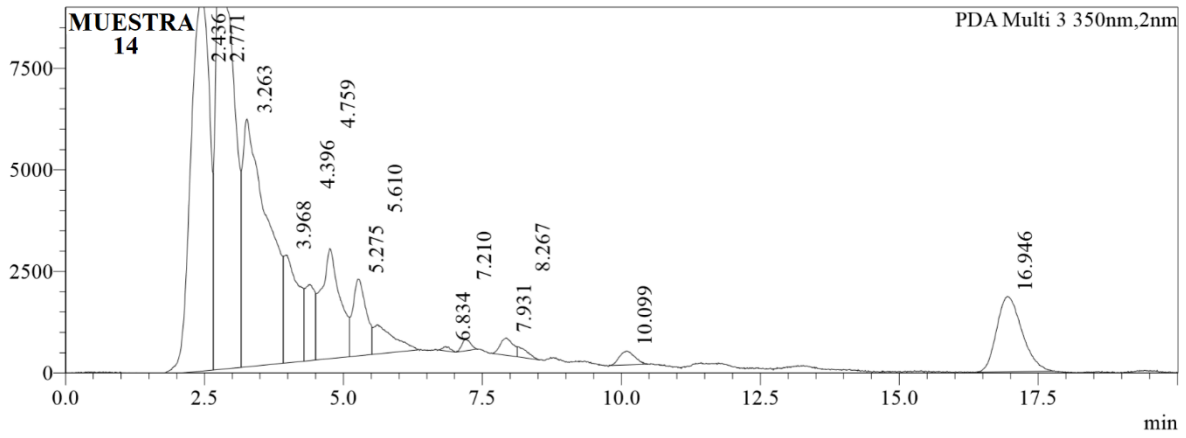














## Anexo 6. Certificado de calibración de balanza analítica utilizada

**cim**  
Centro de Investigaciones de Metrología

**Certificado de Calibración**  
CERTIFICATE OF CALIBRATION

Nº de Certificado: **CB-003/17**

Se refiere a:  
El referido

Instrumento: Balanza Electrónica  
Instrument

Marca: Mettler Toledo  
Manufacturer

Modelo: AE240S

Número de Serie: 1 113 511 304  
Serial number

Número de Identificación: CIM 34.001  
ID number

Fecha de la calibración: 2017-07-18  
Calibration date

Lugar de la Calibración: Laboratorio de Masa CIM  
Calibration Site

Destinatario: Centro de investigaciones de Metrología  
Receiver

Dirección: Final 25 avenida norte, San Salvador, El Salvador  
Address

Solicitado: Centro de investigaciones de Metrología  
Applied for

Fecha de Emisión: 2017-11-14  
Date of Issue

**COPIA**

Aprobó: *[Signature]*  
Approved by  
Ing. Claudia Alejandrina Estrada  
Directora Técnica

Este certificado consta de 4 hojas.

Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador, Centro América  
Teléfono: 2590-5362  
Página Web: www.cim.gob.sv, Correo Electrónico: info@cim.gob.sv

Hoja 1 de 4  
P-CIM-19-F7 V3

Las reproducciones parciales de este Certificado no son válidas, dado que ello puede dar lugar a interpretaciones equivocadas. Este Certificado consta de la cubierta y de las páginas adicionales necesarias. La autoridad de la emisión de este documento puede ser verificada en el directorio electrónico www.cim.gob.sv con el Número de Certificado.

**cim**  
Centro de Investigaciones de Metrología

Nº de Certificado: **CB-003/17**

**Certificado de Calibración**  
CERTIFICATE OF CALIBRATION

El Centro de Investigaciones de Metrología CERTIFICA: que a solicitud del Centro de Investigaciones de Metrología, y aplicando el procedimiento interno I.2-CIM-P20 "INSTRUCCIÓN TÉCNICA PARA LA CALIBRACIÓN DE INSTRUMENTOS DE PESAJE DE FUNCIONAMIENTO NO AUTOMÁTICO", se calibró la balanza electrónica descrita en la Hoja 1, con las características metrologías siguientes:

Máxima capacidad: 200 g  
Mínima división: 0,1 mg  
Rango calibrado: 0 g a 200 g

Los resultados obtenidos en la prueba son los siguientes:

**Prueba de Excentricidad:** consiste en determinar los errores que se comentan al no colocar la carga en el centro del plato de la balanza.  
Carga de prueba: 70 g  
Diferencia máxima de excentricidad: 0,4 mg

**Prueba de Repetibilidad:** consiste en determinar la desviación estándar de la balanza.  
Carga de prueba: 100 g, 200 g  
Desviación Estándar: 0,05 mg, 0,07 mg

**Prueba de Errores de Indicación:** consiste en determinar los errores de la balanza en todo su rango de trabajo. La tabla siguiente muestra los valores nominales con los correspondientes errores de las variables discretas:  $Corrección = -Error$

Carga nominal	Error E (mg)	U(E) (mg) k=2
1 mg	0,0	0,14
2 mg	0,0	0,14
5 mg	-0,1	0,14
10 mg	0,0	0,14
20 mg	0,0	0,14
50 mg	0,0	0,14
100 mg	0,1	0,14
200 mg	0,0	0,14
500 mg	0,0	0,14
1 g	0,0	0,14

**COPIA**

Este certificado consta de 4 hojas. La reproducción parcial del mismo puede dar lugar a interpretaciones equivocadas de sus resultados, por lo que se recomienda evitarla.

Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador, Centro América  
Teléfono: 2590-5362  
Página Web: www.cim.gob.sv, Correo Electrónico: info@cim.gob.sv

Hoja 2 de 4  
P-CIM-19-F7 V3

**cim**  
Centro de Investigaciones de Metrología

Nº de Certificado: **CB-003/17**

**Certificado de Calibración**  
CERTIFICATE OF CALIBRATION

Carga nominal	Error E (mg)	U(E) (mg) k=2
2 g	0,1	0,14
5 g	0,1	0,15
10 g	0,0	0,15
20 g	0,1	0,16
50 g	0,1	0,23
100 g	0,2	0,37
200 g	0,3	0,70

**COPIA**

**Gráfico de errores de indicación del Instrumento de Pesaje**

La calibración fue realizada a una temperatura promedio de 21,7 °C y a una humedad relativa promedio de 54,8 %.

Este certificado consta de 4 hojas. La reproducción parcial del mismo puede dar lugar a interpretaciones equivocadas de sus resultados, por lo que se recomienda evitarla.

Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador, Centro América  
Teléfono: 2590-5362  
Página Web: www.cim.gob.sv, Correo Electrónico: info@cim.gob.sv

Hoja 3 de 4  
P-CIM-19-F7 V2

**cim**  
Centro de Investigaciones de Metrología

Nº de Certificado: **CB-003/17**

**Certificado de Calibración**  
CERTIFICATE OF CALIBRATION

La trazabilidad de los resultados está garantizada por los patrones de trabajo CIM 31.001 con certificado de calibración CM-003/17 y CIM 31.002 con certificado de calibración CM-004/17 del Centro de Investigaciones de Metrología.

La incertidumbre combinada fue calculada tomando en cuenta las contribuciones de los patrones del laboratorio, la experimental y la resolución de la balanza. La incertidumbre expandida se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura de k=2, el cual corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente 95 %.

El presente certificado solo ampara a las mediciones reportadas en el momento, en el lugar y con las condiciones ambientales en que se realizó la calibración.

San Salvador, 14 de noviembre de 2017.

**COPIA**

Calibró: *[Signature]*  
Calibrated by: Ing. Eusebio Pineda Campos  
Metrología/Laboratorio de Masa


Aprobó: *[Signature]*  
Approved by: Ing. Claudia Alejandrina Estrada  
Directora Técnica

Este certificado consta de 4 hojas. La reproducción parcial del mismo puede dar lugar a interpretaciones equivocadas de sus resultados, por lo que se recomienda evitarla.

Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería y Arquitectura  
Final 25 Avenida Norte, San Salvador, El Salvador, Centro América  
Teléfono: 2590-5362  
Página Web: www.cim.gob.sv, Correo Electrónico: info@cim.gob.sv

Hoja 4 de 4  
P-CIM-19-F7 V3

## Anexo 7. Información de los cartuchos SPE

 MACHEREY-NAGEL

**CHROMABOND® / CHROMAFIX® / CHROMABOND® LV  
CHROMABOND® MULTI 96 / CHROMABOND® FLASH**

Products for sample preparation (SPE)

Important hints for use:  
CHROMABOND® and CHROMAFIX® products which have been especially developed for solid phase extraction (SPE), present rapid, efficient and economical systems for sample preparation. They have to be used following generally accepted principles and techniques for sample preparation. If you do not have knowledge of these working procedures, please contact our Customer Service Center.  
MACHEREY-NAGEL does not assume any responsibility for damages due to improper application of our products or due to application of our products in other fields of application. The user has to ensure that the products used are suitable for the planned applications.

CHROMABOND® columns and CHROMAFIX® cartridges are ready-to-use products for one single use. Before, during and after use manipulations of these products such as removal of frits or of the adsorbent contained in these columns are not allowed. Particularly the column housing must not be used or reused for any other application. This may cause damage to health or people, which are in the sole responsibility of the user.  
Application on the human body is strictly forbidden. The user is liable of all damages resulting from such application.  
After use the products have to be disposed of by the user in accordance with state of the art techniques and local regulations.


Produkte zur Probenvorbereitung (SPE)

Hinweise zur Verwendung:  
Die speziell für die SPE entwickelten CHROMABOND®- und CHROMAFIX®-Produkte stellen schnelle, wirksame und kostengünstige Systeme zur Probenvorbereitung dar. Sie sind einzusetzen nach den allgemein bekannten Prinzipien und Arbeitstechniken der Probenvorbereitung. Sollten Ihnen diese nicht bekannt sein, informieren Sie sich bitte bei unseren Verkaufsberatern oder bei unserem Customer Service Center.  
Für Folgeschäden, die aus einer unsachgemäßen Verwendung unserer Produkte oder durch den Einsatz unserer Produkte in einem anderen Anwendungsgebiet entstehen, übernimmt MACHEREY-NAGEL keine Verantwortung. Der Anwender hat sicherzustellen, dass die verwendeten Produkte für die von ihm durchgeführten Untersuchungen geeignet sind.

CHROMABOND®-Säulen und CHROMAFIX®-Kartuschen sind Fertigprodukte, die für den einmaligen Gebrauch bestimmt sind. Vor, während und nach der Verwendung dürfen keine Manipulationen an den Produkten vorgenommen werden, wie etwa Entfernen der Fritten oder des in den Säulen enthaltenen Sorbens. Insbesondere sind die Säulenkörper nicht für andere Anwendungen Zweck zu entfremden und nicht zu anderen oder weiteren Verwendungen wiederzuverwenden. Dieses kann zu Sach- und Gesundheitsschäden führen, die allein in der Verantwortung des Anwenders liegen.  
Eine Anwendung am menschlichen Körper ist strengstens untersagt. Der Anwender haftet selbst für alle Schäden, die hieraus entstehen.  
Nach der Verwendung sind die Produkte nach dem Stand der Technik und den landesspezifischen Anforderungen durch den Kunden zu entsorgen.

Version 1-10/10

[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)

	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6-8 · 52355 Düren · Germany			
DE / International:	CH:	FR:	US:	
Tel.: +49 24 21 969-0	Tel.: +41 62 388 55 00	Tel.: +33 388 68 22 68	Tel.: +1 484 821 0984	
Fax: +49 24 21 969-199	Fax: +41 62 388 55 05	Fax: +33 388 51 76 88	Fax: +1 484 821 1272	
E-mail: <a href="mailto:info@mn-net.com">info@mn-net.com</a>	E-mail: <a href="mailto:sales-ch@mn-net.com">sales-ch@mn-net.com</a>	E-mail: <a href="mailto:sales-fr@mn-net.com">sales-fr@mn-net.com</a>	E-mail: <a href="mailto:sales-us@mn-net.com">sales-us@mn-net.com</a>	2/2



**Certificate of analysis**

Phase: **CHROMABOND® HLB**  
 Sorbent-LOT: 0418/1

**Technical Data**

Material: porous adsorptive resin based on poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)  
 Description: white powder

Parameter	Specification	Result
Pore Diameter (Å):	55 - 75	69
Surface Area (m <sup>2</sup> /g):	650 - 850	720
Particle Size – 50 % Volume (µm):	50 - 70	56
Capacity (mg caffeine/g sorbent):	> 170	291

The packing quantity varies ± 5 % referred to the amount given on the label or in the catalogue.

**Confirmation**

Hereby we confirm that the above mentioned product has successfully passed our quality control system in accordance with ISO 9001:2008 and meets the specific quality criteria.

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Visit our Online Application Database: [www.mn-net.com/apps](http://www.mn-net.com/apps)

3000 free chromatography applications – without registration

... find Your application!

[www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6-8 · 52355 Düren · Germany

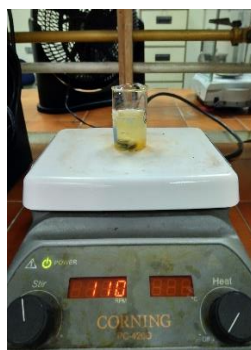
DE / International:	CH:	FR:	US:
Tel.: +49 24 21 969-0	Tel.: +41 62 386 55 00	Tel.: +33 388 68 22 68	Tel.: +1 484 821 0984
Fax: +49 24 21 969-199	Fax: +41 62 386 55 05	Fax: +33 388 51 76 88	Fax: +1 484 821 1272
E-mail: <a href="mailto:info@mn-net.com">info@mn-net.com</a>	E-mail: <a href="mailto:sales-ch@mn-net.com">sales-ch@mn-net.com</a>	E-mail: <a href="mailto:sales-fr@mn-net.com">sales-fr@mn-net.com</a>	E-mail: <a href="mailto:sales-us@mn-net.com">sales-us@mn-net.com</a>

1/2

### Anexo 8. Procedimiento de preparación de muestra de miel.



Pesar 0.005 kg de miel



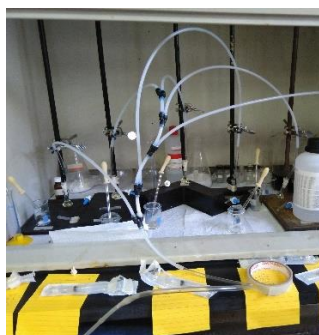
Mezclar fuertemente con disolución tampón  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine.



Incorporar la disolución en el cartucho SPS



Muestra aforada con fase móvil (72:13:12 ácido oxálico/acetonitrilo/metanol)



Sistema para evaporar el acetato de etilo del balón de 5 mL.



Depositar la muestra en balón de 5 mL utilizando acetato de etilo.



Muestra analizada en el HPLC

## **Anexo 9. Preparación de disoluciones estandarizadas.**

### A) Preparación de una disolución patrón de EDTA 0,1 mol. L<sup>-1</sup>

Se pesaron 3.7213 g de la sal disódica, y se introdujeron en un matraz de 100 mL, a continuación, se añadieron 50 mL de agua desionizada, y se agitó hasta la disolución completa (este proceso duro unos 16 minutos o más). Posteriormente se incorporó agua hasta el aforo del matraz.

- Estandarización

Para la estandarización se pesaron, 0,1302 g del cinc metálico limpio, seguidamente se introdujeron en un erlenmeyer y se disolvió en 4 mL de ácido clorhídrico concentrado. Una vez disuelto el cinc, se agregaron 80 ml de agua desionizada y se neutralizó con hidróxido de sodio al 10% (p/v) hasta que se observó un precipitado blanco permanente. A continuación, se añadieron 10 mL de disolución reguladora de pH = 10 y una pequeña cantidad de la disolución sólida del NET y se valoró con EDTA hasta que el indicador viró del color rojo vinoso inicial a un azul puro.

### B) Determinación de la concentración de cobre (II) con EDTA

Se pesó 74.904 g de sulfato de cobre, y se preparó un 1 L de disolución de sulfato de cobre. A continuación, se tomaron 10 mL de esta disolución y se estandarizó con la disolución de EDTA 0.1 mol. L<sup>-1</sup> preparado en el apartado A. La aparición de una coloración violeta indicó el punto final.

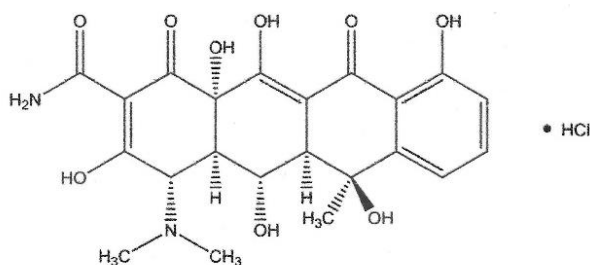
## Anexo 10. Certificado de pureza 95% Oxitetraciclina.

# Certificate of Analysis

ISO GUIDE 34  
ANAB Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025  
ANAB Cert# AT-1467

## OXYTETRACYCLINE HYDROCHLORIDE CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



**CERTIFIED PURITY: 95.0%**,  $U_{CRM} = \pm 0.4\%$   $k = 2$   
(Mass Balance/as is basis, as  $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$ )

**NOMINAL PACKAGE SIZE:** 1g

**CATALOG #:** PHR1325

**LOT #:** LRAA9119

**CERTIFICATE VERSION:** LRAA9119.1

**ISSUE DATE:** 18 September 2015

*Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot changes or the availability of new data.*

*Check our website at: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) for the most current version.*

**CRM EXPIRATION:** 31 December 2020 (Proper Storage and Handling Required).

**RECEIPT DATE:** \_\_\_\_\_

Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

**STORAGE:** Store in a Freezer/Protect from Light, keep container tightly closed.  
Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

**CHEMICAL FORMULA:**  $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$

**MW:** 496.9

**PHYSICAL DESCRIPTION:** Yellow powder in amber vial **CAS #:** 2058-46-0

**HAZARDS:** Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

**SIGMA-ALDRICH**

Page 1 of 7

**INSTRUCTIONS FOR USE:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. This material is intended for R&D use only. Not for drug, household or other uses.

**TRACEABILITY ASSAY**

Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards  
 Specification: NLT 835µg/mg of Oxytetracycline (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

**METHOD: HPLC (ref.: Oxytetracycline Hydrochloride, EP7)**

Column: Hamilton PRP-1, 4.1 x 250mm, 5µm

Mobile Phase A: 30g/L t-Butyl Alcohol + 60mL/L Phosphate buffer (pH:7.5) + 50mL/L

Tetrabutylammonium hydrogren sulfate (10g/L in Water, pH: 7.5) + 10mL/L

Edetate sodium (0.4g/L in Water, pH:7.5) in Water

Mobile Phase B: 100g/L t-Butyl Alcohol + 60mL/L Phosphate buffer (pH:7.5) + 50mL/L

Tetrabutylammonium hydrogren sulfate (10g/L in Water, pH: 7.5) + 10mL/L

Edetate sodium (0.4g/L in Water, pH:7.5) in Water

Gradient:

Time (min)	% A	% B
0-8	65	35
8-17	65-25	35-75
17-21	25-65	75-35

Flow Rate: 1mL/min

Column Temperature: 60°C

Injection: 20µL

Detector: 254nm

**ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)**

ASSAY VALUE

**878µg/mg**

vs. USP LOT

**F1H290**

Labeled Content = None

Assigned Content = 925µg/mg\*

**ASSAY vs. EP CRS (as is basis)**

ASSAY VALUE

**878µg/mg**

vs. EP BATCH

**4.1**

Labeled Content = None

Assigned Content = 893µg/mg \*

### ASSAY vs. BP CRS (as is basis)

**ASSAY VALUE**

**878µg/mg**

**vs. BP BATCH**

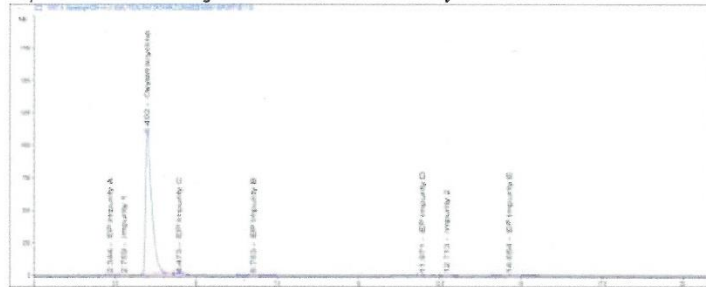
**2866**

Labeled Content = None

Assigned Content = 841µg/mg\*

\*The assigned content of the USP Reference Standard, EP CRS, and BP CRS was determined by assay against the Oxytetracycline (Lot J1J172, 900µg/mg) USP Reference Standard

Representative Chromatogram from Lot: LRAA9119 Analysis



### PURITY DETERMINATION BY MASS BALANCE

#### CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS

METHOD: HPLC (ref.: Oxytetracycline Hydrochloride, EP7)

See Assay

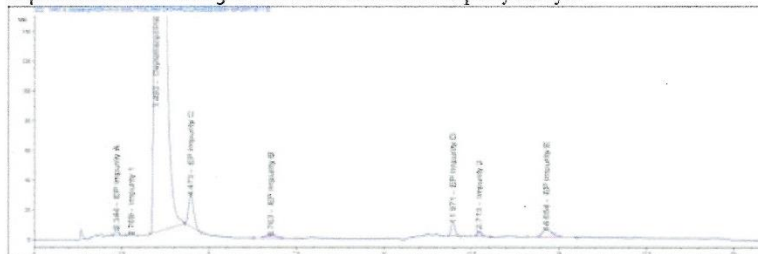
Impurities Detected:

Impurity A:	0.3%	Impurity 1:	0.09%
Impurity C:	1.4%	Impurity B:	0.4%
Impurity D:	0.2%	Impurity 2:	0.1%
Impurity E:	0.4%		

Total Impurities: 3.0%



Representative Chromatogram from Lot: LRAA9119 Impurity Analysis



#### RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Residual Solvents <467>, USP35)

Column: SPB-624

Carrier gas: He

Flow: 10.2mL/min

Split Ratio: 1:5

Injection/Temperature: 1µl/250°C

Temperature Program: 40°C for 5min, 8°C/min to 200°C, hold 5min

Solvents Detected: None

#### WATER DETERMINATION

Method: Karl Fisher titration, after drying under vacuum at 60°C

Mean of three measurements, Water Content = 1.8%

#### LOSS ON DRYING/VOLATILES

Method: Under vacuum at 60°C

Mean of three measurements, Loss = 0.2%

#### RESIDUE ANALYSIS

Method: Sulfated Ash

Sample Size: ~1g

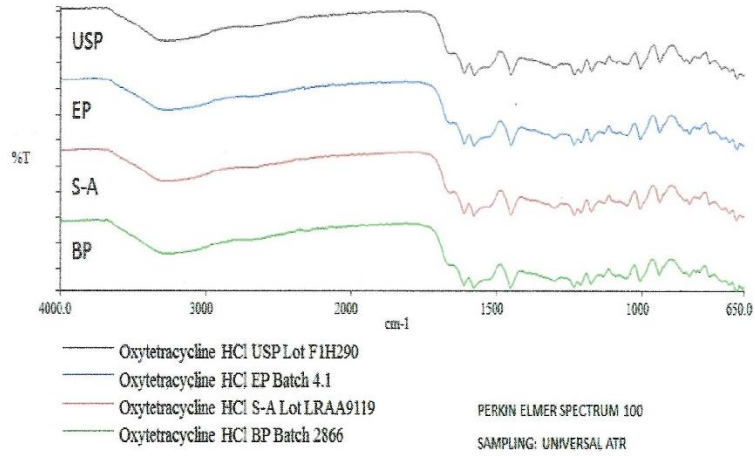
Mean of three measurements, Residue = 0.01%

#### CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE [1.00% - Impurities (normalized)]

**95.0%**  $U_{cm} = \pm 0.4\%$ ,  $k = 2$   
(as is basis)

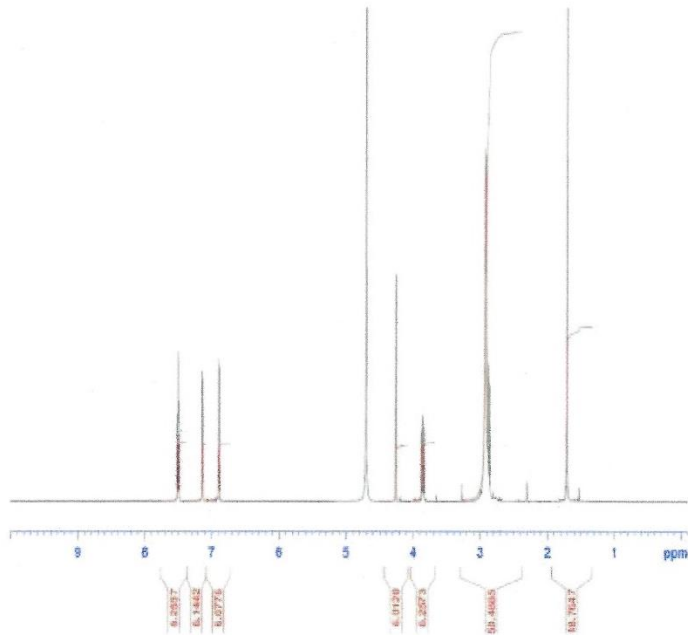
## IDENTIFICATION TESTS

**INFRARED SPECTROPHOTOMETRY** (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)



**<sup>1</sup>H NMR** (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)

PHR1325 Oxytetracycline Hydrochloride in D<sub>2</sub>O



Consistent with structure

## ELEMENTAL ANALYSIS (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)

Exeter Analytical 440 Elemental Analyzer

Combustion method

%	Theoretical	Result 1	Result 2	Mean
C	53.18	51.79	51.67	51.73
H	5.07	5.43	5.40	5.42
N	5.64	5.50	5.50	5.50

## OPTICAL ROTATION

Specification:  $-188^{\circ}$  to  $-200^{\circ}$

Perkin Elmer Polarimeter 343

Wavelength: 589nm

Concentration:  $\sim 1\text{g}/100\text{mL}$

Cell Path: 100mm

Mean of three Measurements =  $-193.93^{\circ}$

## HOMOGENEITY ASSESSMENT

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical Method: HPLC

Sample size:  $\sim 40\text{mg}$

## UNCERTAINTY STATEMENT

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty ( $U_{\text{cm}}$ ) corresponding to the 95% confidence interval.  $U_{\text{cm}}$  is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor  $k$ , which is obtained from a  $t$ -distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

## STABILITY ASSESSMENT

Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis.

Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.



---

Operations Manager



---

QA Supervisor

APPENDIX

Original Release Date: 18 September 2015