



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

TEMPERATURA DE FUSIÓN COMO PARÁMETRO INDICADOR DE LA PRESENCIA DE PARAFINA EN CERA DE ABEJA

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y LA CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: NOELIA COOMONTE ALONSO

TUTOR/A ACADEMICO: M^º ISABEL ESCRICHE ROBERTO
COTUTOR/A: MARISOL JUAN BORRÁS

Curso Académico: 2019-2020

VALENCIA, JULIO 2020

TEMPERATURA DE FUSIÓN COMO PARÁMETRO INDICADOR DE LA PRESENCIA DE PARAFINA EN CERA DE ABEJA

Noelia Coomonte Alonso, Isabel Escriche Roberto¹, Marisol Juan Borrás¹

RESUMEN

El elevado coste de la cera de abeja está fomentando su adulteración, siendo las parafinas sintéticas las sustancias más utilizadas para ello por sus propiedades fisicoquímicas y bajo precio. Esto preocupa cada vez más al sector apícola, ya que lleva consigo un descenso de la producción de miel, y por tanto del beneficio económico. La determinación de la temperatura de fusión (T_{mf}) mediante capilar es uno de los parámetros más utilizados para demostrar su autenticidad; sin embargo, el error y variabilidad en los resultados obtenidos por este procedimiento es considerable. Por ello, la Calorimetría Diferencial de Barrido, se está contemplando como una buena alternativa al método clásico, ya que puede dar información sobre la T_{mf} de la cera, de forma más objetiva y precisa. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la efectividad de la técnica DSC para detectar la adición de parafinas en cera de abeja. Para ello, se analizaron 4 parafinas con distintos puntos de fusión, una cera de referencia y diferentes mezclas de estas para simular adulteración. Además, se analizaron ceras puras de diferentes orígenes geográficos para evaluar la variabilidad de los parámetros analizados. Las T_{mf} y T_{cf} (temperatura de cristalización) y otras temperaturas de transición vítrea asociadas, obtenidas mediante DSC, han resultado efectivas para identificar la adición de parafina a cera de abeja, en muestras simuladas. Aunque los resultados son prometedores en muestras de ceras adulterada nivel de laboratorio, es necesario continuar el estudio analizando ceras comerciales.

Palabras clave: cera, parafina, adulteración, temperatura.

ABSTRACT

The high cost of beeswax is promoting its adulteration. The most used substances for this are synthetic paraffins due to their physicochemical

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n Valencia 46022.

properties and low price. This increasingly worries the beekeeping sector, since it brings with it a decrease in the production of honey, and therefore the economic benefit. The determination of the melting temperature (T_m) using a capillary is one of the most widely used parameters to demonstrate its authenticity; however, the error and variability in the results is considerable. For this reason, Differential Scanning Calorimetry is being considered as a good alternative to the classical method, since it can give information on the T_m of wax in a more objective and precise way. The present work aims to evaluate the effectiveness of the DSC technique to detect the addition of paraffins in beeswax. For this, 4 paraffins with different melting points, a reference wax and different mixtures of these were analyzed to simulate adulteration. In addition, pure waxes from different geographical origins were analyzed to assess the variability of the analyzed parameters. The T_m and T_c (crystallization temperature) and other associated glass transition temperatures, obtained by DSC, have been effective in identifying addition of paraffins to beeswax in simulated samples. Although the results are promising in laboratory-level adulterated wax samples, it is necessary to continue the study analyzing commercial waxes.

Key words: wax, paraffin, adulteration, temperature.

RESUM

L'elevat cost de la cera d'abella està fomentant la seua adulteració, sent les parafines sintètiques les substàncies més utilitzades per a això per les seues propietats fisicoquímiques i baix preu. Això preocupa cada vegada més al sector apícola, ja que porta amb si un descens de la producció de mel, i per tant del benefici econòmic. La determinació de la temperatura de fusió (T_m) mitjançant capil·lar és un dels paràmetres més utilitzats per a demostrar la seua autenticitat; no obstant això, l'error i variabilitat en els resultats obtinguts per aquest procediment és considerable. Per això, la Calorimetria Diferencial d'Escombratge, s'està contemplant com una bona alternativa al mètode clàssic, ja que pot donar informació sobre la T_m de la cera, de forma més objectiva i precisa. El present treball té com a objectiu avaluar l'efectivitat de la tècnica *DSC per a detectar l'addició de parafines en cera d'abella. Per a això, es van analitzar 4 parafines amb diferents punts de fusió, una cera de referència i diferents mesclades d'aquestes per a simular adulteració. A més, es van analitzar ceres pures de diferents orígens geogràfics per a avaluar la variabilitat dels paràmetres analitzats. Les T_m i T_c (temperatura de cristallització) i altres temperatures de transició vítria associades, obtingudes mitjançant *DSC, han resultat efectives per a identificar l'addició de parafina a cera d'abella, en mostres simulades. Encara que els resultats són prometedors en mostres de ceres adulterada nivell de laboratori, és necessari continuar l'estudi analitzant ceres comercials.

Paraules clau: cera, parafina, adulteració, temperatura.

INTRODUCCIÓN

La cera de abeja es un producto natural producido por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) como secreción de sus glándulas cereras, situadas en la zona ventral de su abdomen. Es una secreción líquida, que al contacto con el aire, se endurece dando lugar a un producto sólido, altamente insoluble en agua y con una estructura parcialmente cristalina, que a temperatura ambiente se organiza formando una estructura ortorrómbica (Gaillard et al., 2013). La cera en el panal protege a la cría en desarrollo, permite almacenar alimentos y tiene, además, importantes propiedades termorreguladoras.

Actualmente, la cera de abeja es un producto muy demandado que cuenta con una producción mundial de unas 60000 toneladas (Bernal et al., 2005). Esto se debe a los múltiples usos que tiene en diferentes áreas como la medicina, farmacia, cosmética y apicultura, entre otros (Gómez, 2002; Tulloch, 1980). En España, es especialmente este último sector el que más la utiliza ya que los apicultores proveen de láminas de cera a las abejas con el objeto de facilitarles la construcción del panal y de esta forma, aumentar el rendimiento en la producción de miel.

La cera de abeja está constituida por una mezcla compleja de más de 300 componentes, siendo los más abundantes los ésteres (67 g/100g). Entre ellos, se encuentran los monoésteres e hidroximonoésteres lineales con longitudes de cadena de C40-C48 y los ésteres complejos que contienen ácido o dioles. También destacan por su abundancia los hidrocarburos (14 g/100g), con una longitud de cadena predominante de C27-C33 (principalmente heptacosano, nonacosano, pentacosano y tricosano), los ácidos grasos libres (12 g/100g) de C24-C32, los alcoholes grasos libres (1 g/100g) de C28-C35, así como otros constituyentes (6 g/100g). Esta composición puede variar entre las diferentes familias y razas de abejas, ya que la producción de cera está estrechamente relacionada con la genética y dieta de las abejas (Farmacopea Europea, 2008; Fratini et al., 2016).

La cera de abeja es un producto de origen natural, al que no se le admite la incorporación de aditivos ni adulterantes. Sin embargo, su elevado coste está dando lugar a un aumento de la actividad fraudulenta. En este contexto, son las parafinas las sustancias más utilizadas para adulterar la cera de abeja debido a que por sus propiedades fisicoquímicas (inertes, incoloras e indoras) se mezclan bien con ella, además se trata de un producto con una amplia disponibilidad y bajo precio (L. Svecnjak et al., 2015). Este hecho preocupa cada vez más a los sectores consumidores de este producto y muy especialmente al sector apícola, ya que una cera adulterada puede llegar a ser rechazada por la abejas, llegando incluso a abandonar el panal. Esto puede motivar un importante descenso en la producción de la miel y por tanto del beneficio económico.

Por ello, en la cera de abeja que se comercializa es de vital importancia garantizar la ausencia de componentes extraños a ella. Con esta finalidad, la Farmacopea Europea propone la determinación de diversos parámetros

basados en sus características fisicoquímicas (Farmacopea Europea, 2008) (Tabla 1).

TABLA 1. Criterios de composición de la cera de abeja empleados en pruebas de autenticidad (Farmacopea Europea, 2008).

Parámetro	Valor
Punto de fusión	61-65 °C
Contenido de agua	<1 %
Índice de refracción (A 75°C)	0.4398-1.4451
Número de ácido (mg KOH/g)	12-22
Número de éster (mg KOH/g)	70-90
Relación éster/ácido	3.3-4.3
Densidad (g/L)	0.950-0.965
Número de saponificación (mg KOH/g)	87-102
Impurezas mecánicas, aditivos	Ausencia

Diversos autores como (Bernal et al., 2005; Waś et al., 2015) reportaron cambios en las propiedades fisicoquímicas de la cera de abeja cuando a ésta se le adicionaba parafina, que se tradujeron en una disminución de la densidad, del valor de ácido, número de saponificación e índice de yodo.

La medida de la temperatura de fusión mediante capilar es el procedimiento recomendado en la anterior citada Farmacopea y, por ello, es ampliamente utilizado para identificar adulteraciones en la cera de abeja, ya que esta temperatura puede variar cuando la cera no es pura. Aplicando este procedimiento, se han reportado distintos valores en ceras de distintas procedencias: 61-63°C, regiones de España (Bernal et al., 2005); 64-66°C, Estados Unidos (Bisson S, 1940), 60-65°C, Europa, Asia y África (Tulloch, 1980), 61.5-63.5°C, Etiopia (Tesfaye, 2016) y 61-65°C, regiones de Europa (Bogdanov, 2016). Sin embargo, es de destacar que el error de este método y la variabilidad de los resultados es considerable, ya que se ve afectado por la subjetividad del analista. Además, las parafinas que se utilizan para adulterar la cera de abeja son cada vez más sofisticadas debido a que se fabrican específicamente para que sus temperaturas de fusión sean lo más semejantes a ella.

En este contexto, la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica prometedora para el análisis de cera de abeja ya que es un material multicomponente con propiedades térmicas peculiares, que serán determinantes en su temperatura de fusión (Buchwald et al., 2008). Esta técnica permite analizar las transiciones de fase de diferentes compuestos obteniendo una huella digital térmica de los mismos. Cuando la muestra experimenta una transformación física, como es una transición de fase, se

necesitará que fluya una determinada cantidad de calor a dicha muestra en comparación a la necesaria para mantener a la misma temperatura una “muestra de referencia”. Esto se traduce en la obtención de curvas de fusión o termogramas (Kodre et al., 2014).

Para materiales multicomponentes como la cera de abeja, el número de picos obtenidos en el termograma, así como su ubicación están relacionados con la naturaleza de los componentes químicos que tiene (ésteres, ácidos grasos...etc.). Concretamente, se ha reportado que para *Apis mellifera*, esta curva de fusión sale de la línea base a temperaturas sobre los 39°C y regresa a la base alrededor de los 64°C, lo que indica que los enlaces intermoleculares se van rompiendo mucho antes de que la cera de abeja se encuentre totalmente fundida (Buchwald et al., 2005). Por lo tanto, los termogramas obtenidos se pueden usar para evaluar la pureza de una muestra polimérica, ya que la incorporación en ésta de trazas de contaminantes o adulterantes podría tener consecuencias sobre sus propiedades térmicas (Buchwald et al., 2008). Por ello, la técnica de DSC se está contemplando cada vez más como una buena alternativa a los métodos clásicos del capilar en la evaluación de las características de fusión de las ceras, incluyendo la cera de abeja. Además, DSC presenta la ventaja de ser una técnica respetuosa con el medio ambiente (no usa disolventes), que requiere poca muestra en cada análisis (del orden de 10 mg), y además es versátil, rápida, y muy repetitiva (Dahimi et al., 2014).

Por todo ello, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la efectividad de la técnica DSC [mediante el cálculo de temperaturas de fusión (T_m) y temperaturas de cristalización (T_c)] para detectar la adición de parafinas en cera de abeja. Además, se determinará la influencia del origen geográfico de las ceras en la variabilidad de ambos parámetros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

La Tabla 2 muestra la información de las diferentes muestras analizadas: 1 cera de referencia (Fluka, ref: 14367) (que sirvió como base para conocer las temperaturas de fusión y cristalización de la cera de abeja pura sin adulterar); 11 ceras de distintos orígenes geográficos (Argentina, Honduras, Cuba, Mozambique, China, España) y 4 parafinas, con diferente punto de fusión: mp55 (Guinama bloque, ref: QC-00163669), mp58 (Guinama perlas, ref: QC-00180483), mp 58-62 (Aldrich, ref: 327212) y mp>65 (Aldrich, ref: 411663]. Las 4 parafinas se mezclaron al 25 y al 50% con la cera de referencia simulando distintos niveles de adulteración. Por ejemplo, los códigos citados en la Tabla 2 para las muestras con parafina de punto de fusión de 55 °C serían: P55(p100) [parafina pura]; P55(c50-p50) [50 % cera de referencia y 50 % parafina]; P55(c75-p25) [75 % cera de referencia y 25 % parafina].

TABLA 2. Codificación de las muestras utilizadas: tipos de parafinas, simulaciones de adulteraciones, y ceras de abeja de diferentes orígenes.

Código muestra (simulación adulteración)	Tipo de Parafina	de g <i>parafina</i>/ 100g muestra	Código ceras	Orígenes geográficos
Cref		0	I16066-Arg	Argentina
Cref		0	I16091-Hon	Honduras
Cref		0	I17035-Cub	Cuba
P55(p100)	mp55	100	I17041-Moz-Nam	Mozambique-Nampula
P58(p100)	mp58	100	I17051-Moz-Sof	Mozambique-Sofala
P59(p100)	mp59	100	I17011-Chi	China
P65(p100)	mp>65	100	I19101-Eco	China (Ecológica)
P55(c50-p50)	mp55	50	I17007-Esp	España (Apícola Gandía 2015)
P58(c50-p50)	mp58	50	I17012-Esp	España (Valencia)
P59(c50-p50)	mp59	50	I17005-Esp-bu	España (Melazahar muy buena)
P65(c50-p50)	mp>65	50	I18001-Esp-ult	España (Melazahar muy buena)
P55(c75-p25)	mp55	25		
P58(c75-p25)	mp58	25		
P59(c75-p25)	mp59	25		
P65(c75-p25)	mp>65	25		

Equipo utilizado

Se utilizó un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC Mettler Toledo (Mettler Toledo DSC1, Suiza) con nitrógeno como gas de purga (99.9% de pureza a 20ml/min). El equipo fue calibrado con indio ($\Delta H_f=28.5$ J/g) y zinc ($\Delta H_f=103.7$ J/g). Las temperaturas de fusión (T_{mf}) y cristalización (T_{cf}) de cada muestra se obtuvieron usando el software Mettler Toledo DSC STARE SW 12.00. El análisis de cada muestra se realizó por triplicado.

Preparación de la muestra

En cada determinación se pesaba 10 mg de muestra (con precisión de 3 cifras decimales) en balanza analítica (Mettler Toledo modelo XS205, Suiza). Cada muestra se depositaba en un crisol de aluminio de 40 μ L (ME-26763, AL-CRUCIBLES 40 μ L) y posteriormente se sellaba herméticamente antes de

introducir en el horno del DSC. Para la muestra de referencia se utilizaba un crisol vacío sellado herméticamente.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tipo de parafina y del nivel de adulteración sobre las temperaturas de transición vítrea de la cera de abeja se ha realizado una ANOVA (95%) multifactorial para estos dos factores. También se realizó un ANOVA factor “origen geográfico” para evaluar el efecto de la procedencia de diferentes ceras. En ambos casos, se utilizó el test Tukey con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. El programa utilizado fue Statgraphics Centurion XVII para Windows (versión 17.2.04). Además, con la finalidad de tener una visión global del comportamiento de las variables analizadas se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) mediante el software Unscrambler X.10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Definición de las condiciones del método analítico

El primer paso en la realización del presente estudio fue definir las condiciones idóneas del método, para lo que se realizaron tres pruebas:

PRIMERA PRUEBA.

Se ensayaron rampas de calentamiento de 25 a 75°C, seguidas de rampas de enfriamiento de 75 a 25°C, considerando dos velocidades 1°C/min y 5°C/min. Se eligieron estas condiciones en base a la información reportada por Gaillard et al., 2011 en cera de abeja (rampas de temperatura de 20 a 70°C a 1°C/min), y por Dahimi et al., 2014 en adulteración de grasas comestibles (rampas desde los 50 a -70°C a 5°C/min). Como resultado de estas pruebas, se descartó la velocidad de 5°C/min ya que en los termogramas se enmascaraban algunas de las transiciones de fase.

SEGUNDA PRUEBA.

Se observó una cierta disparidad entre repeticiones (Figura 1), atribuida a que la muestra no siempre tocaba el fondo del crisol. Este hecho se consideró

que podía influir en la velocidad de fusión de las ceras. Por ello, se decidió añadir una rampa final de temperatura de 25 a 75°C en la que la muestra ya se habría fundido previamente. Las condiciones seleccionadas en esta prueba fueron: calentamiento de 25°C a 75°C, enfriamiento de 75 a 25°C y por último un calentamiento de 25 a 75°C.

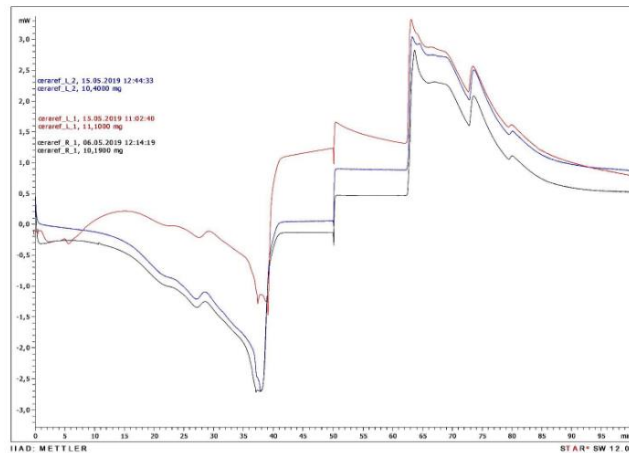


FIGURA 1. Imagen que refleja la heterogeneidad de tres termogramas de una misma muestra (calentamiento de 25 a 75°C seguido de enfriamiento de 75 a 25°C a 1°C/min).

TERCERA PRUEBA. MÉTODO DEFINITIVO.

Los resultados obtenidos con las condiciones de la segunda prueba fueron satisfactorios, pero se quiso simplificar el procedimiento para hacerlo más rápido. Por ello, se decidió comenzar a una temperatura de 75°C (con la muestra en estado de fusión), para evitar los problemas de heterogeneidad comentados anteriormente. De esta manera, el método definitivo fue: una primera rampa de enfriamiento de 75 a 25°C, seguida de una rampa de calentamiento de 25 a 75°C, todo ello a una velocidad de 1°C/min.

Efecto del tipo de parafina en las temperaturas de transición

La Figura 2 representa, como ejemplo, imágenes de termogramas obtenidos para los 4 tipos de parafinas objeto de estudio.

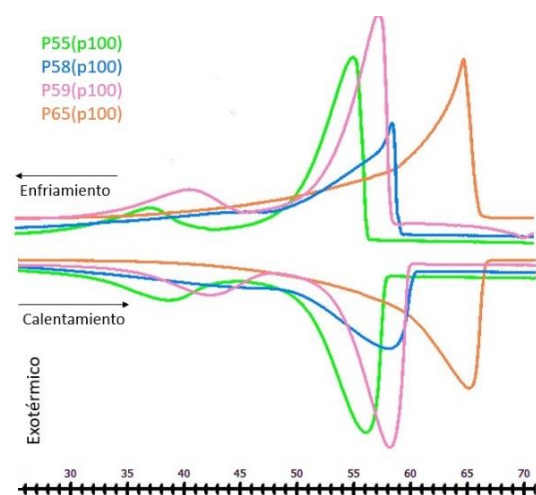


FIGURA 2. Termogramas de las diferentes parafinas estudiadas.

La Tabla 3 muestra las temperaturas de transición (media y desviación típica) obtenidas para ellas, así como el resultado del ANOVA para T_{m3} , T_{mf} (temperatura de fusión final) y T_{cf} (temperatura de cristalización final). Se observan diferencias significativas para estas tres temperaturas en función del tipo de parafina. El punto de fusión de la parafina P55(p100) (57.9°C) está por debajo del valor aceptado para la cera de abeja ($61\text{-}65^{\circ}\text{C}$), mientras que el de P65(p100) (66.79°C), está por encima de él. Las dos restantes parafinas (P58(p100) y P59(p100)), son muy parecidas compartiendo incluso, el mismo grupo homogéneo para la T_{m3} ; sin embargo, mostraron valores significativamente distintos para T_{mf} , e incluso, para la temperatura de cristalización.

TABLA 3. Temperaturas de transición (media y desviación típica) de las parafinas obtenidas mediante DSC.

Muestra	T_{m1}	T_{m3}	T_{mf}	T_{c1}	T_{cf}
P55(p100)	38.72(0.06)	55.26(0.79) ^a	57.97(0.05) ^a	37.37(0.21)	54.67(0.15) ^a
P58(p100)		58.06(0.05) ^b	60.41(0.02) ^b		57.89(0.07) ^b
P59(p100)	42.31(0.15)	58.02(0.03) ^b	59.96(0.05) ^c	40.78(0.24)	56.85(0.13) ^c
P65(p100)		65.12(0.08) ^c	66.79(0.10) ^d		64.18(0.07) ^d
ANOVA		327.08 ^{***}	10020 ^{***}		3871 ^{***}
F-ratio					

Esta situación queda patente en los termogramas de la Figura 1. La parafina P58(p100) solo presenta una transición de fase tanto en la fusión como en la cristalización, mientras que la P59(p100) presenta dos.

Efecto de la adición de parafinas sobre las temperaturas de transición de la cera de abeja

Con la finalidad de estudiar el efecto de la adición de parafinas sobre las temperaturas de transición de la cera de abeja, las 4 parafinas anteriormente analizadas, fueron mezcladas al 25 y al 50% con la cera de referencia, para simular diferentes niveles de adulteración. La Figura 3 muestra, como ejemplo, termogramas de cera adulterada en un 25% con cada una de las parafinas. En ella se aprecian grandes diferencias en el termograma de cera adulterada, con respecto al mostrado para la cera de referencia. Cuando se adultera la cera, se llega a enmascarar alguna de las transiciones de fase, tanto de fusión como de cristalización.

La Tabla 4 muestra las temperaturas asociadas a las diferentes transiciones de fase halladas en la cera de referencia y en las mezclas.

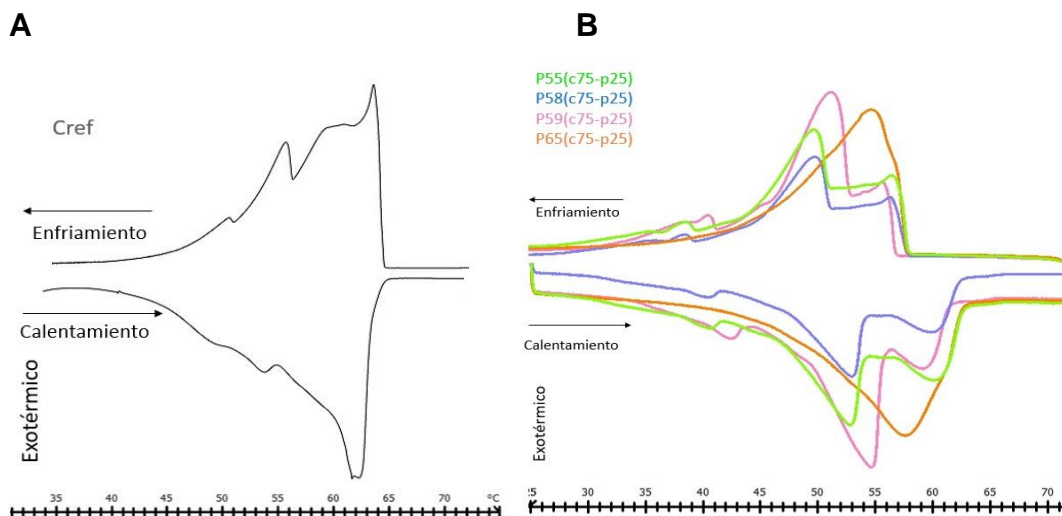


FIGURA 3. Termograma característico de cera referencia (A) y termogramas de cera referencia adulterada al 25% con diferentes tipos de parafinas (B).

TABLA 4. Temperaturas asociadas a las diferentes transiciones de fase halladas en la cera de referencia y en la mezcla de esta con parafinas. Los resultados se han expresado como valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar.

	Tm1	Tm2	Tm3	Tmf	Tc1	Tc2	Tc3	Tcf
Cref	44.97(0.32)	51.69(0.13)	62.7(0.25)	64.64(0.11)	44.93(0.07)	51.4(0.06)	55.86	61.9(0.03)
P55(p100)	38.72(0.06)		55.26 (0.79)	57.97(0.05)	37.37(0.21)			54.67(0.15)
P55(c50-p50)	38.36(0.22)	47.63(8.70)	57.44(0.06)	58.61(0.08)	39.53(0.08)	52.48(0.39)		55.97(0.15)
P55(c75-p25)	40.37(0.28)	52.99(0.26)	60.16(0.33)	62.94(0.18)	40.21(0.12)	52.39(0.23)		59.63(0.12)
P58(p100)			58.06(0.05)	60.41(0.02)				57.89
P58(c50-p50)	45.46(0.16)		56.01(0.05)	59.49(0.07)	45.26(0.07)			55.50(0.07)
P58(c75-p25)	40.75(0.28)	53.06(0.12)	60.54(0.11)	63.4(0.31)	40.05(0.09)	51.99(0.14)		59.41(0.34)
P59(p100)	42.31(0.15)		58.02(0.03)	59.96(0.05)	40.78(0.24)			56.85(0.13)
P59(c50-p50)	42.03(0.17)	54.32(0.07)	58.1(0.07)	59.29(0.16)	41.98(0.05)	54.03(0.15)		56.81(0.17)
P59(c75-p25)	42.28(0.04)	54.34(0.21)	59.57(0.07)	62.38(0.04)	42.19(0.22)	53.26(0.12)		58.85(0.83)
P65(p100)			65.12(0.08)	66.79(0.10)				64.10(0.07)
P65(c75-p25)		57.25(0.31)	61.37(0.04)	63.16(0.15)		56.73(0.54)		59.73(0.07)
P65(c50-p50)			59.73(0.3)	62.86(0.11)		54.95(0.36)		60.6(0.29)
ANOVA F-ratio								
A: parafina,			A:493***	A:1814***				A:479***
B: %mezcla,			B:273**	B:1317***				B:166***
AB: interacción			AB:174***	AB:542***				AB:146***

Los resultados se han expresado como valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar. En la mayoría de las muestras se han podido identificar 4 temperaturas de fusión (T_{m1} , T_{m2} , T_{m3} y T_{mf}) y 4 de cristalización (T_{c1} , T_{c2} , T_{c3} y T_{cf}). Esto se debe a que la cera no es un material monofásico, por el contrario, es un material complejo, tal y como se ve reflejado en los termogramas. En ellos, se observan varias transiciones de fase asociadas a las diferentes formas polimórficas de los lípidos. Como era de esperar, en todos los casos las temperaturas de cristalización finales (T_{cf}) son ligeramente inferiores a sus correspondientes temperaturas finales de fusión (T_{mf}) (Tanleque et al., 2019).

Para la cera de referencia, tanto el termograma como las temperaturas asociadas al mismo concuerdan con lo reportado anteriormente en otros estudios (Gaillard et al., 2011; Alberto, 2019). Estos autores también obtuvieron 4 transiciones durante el calentamiento que se confirmaron durante el enfriamiento, situándose la temperatura de fusión completa en 66.2°C y 64.49°C , respectivamente.

En el caso de las mezclas con las parafinas, con la mezcla de P58 y P59 con cera en un 50%, las temperaturas T_{mf} y T_{cf} llegan a disminuir aproximadamente un 7-10%, situándose por debajo del valor inicial de la parafina, especialmente para P59, mientras que con la mezcla al 25% la disminución es menos acusada (aproximadamente del 2-5%). Por otro lado, la mezcla con P55(p100) causó una disminución mayor que las anteriores (9.5% al 50% y 2-4% al 25%), mientras que P65 fue la parafina que menos afectó las temperaturas de transición.

Se realizó un ANOVA (95%) multifactorial considerando los factores tipo de parafina (A: 55, 58, 59, 60) y porcentaje de mezcla (B: 25%, 50%) para las temperaturas T_{m3} , T_{mf} y T_{cf} puesto que estas transiciones fueron las únicas identificadas en todas las muestras, los restantes parámetros quedaban enmascarados por la adición de la parafina. Tanto T_{m3} , como T_{mf} y T_{cf} variaron significativamente ($***p < 0.001$) con relación al tipo de parafina y al porcentaje de mezcla, siendo T_{mf} el parámetro más afectado (valor más alto de F). La interacción de ambos parámetros fue significativa en todos los casos. Por otro lado, la observación de los grupos homogéneos del ANOVA para los parámetros mencionados reveló que las muestras adulteradas con P58(p100) y P59(p100) comparten grupo para el parámetro T_{cf} , mientras que para los parámetros T_{m3} y T_{mf} la totalidad de las muestras pertenecen a grupos distintos.

La Figura 4 muestra el gráfico de interacciones resultante del ANOVA para T_{mf} y T_{cf} . En ambos casos, el cruce de las líneas en la gráfica indica una interacción entre el porcentaje de mezcla (% de parafina añadido a la cera) y el tipo de parafina según su temperatura de fusión. El gráfico muestra que en general, los valores de T_{mf} y T_{cf} son menores cuanto mayor es el % de parafina añadido, pero no siempre es así, ya que, como se ha señalado, influye el tipo de parafina. La muestra de cera adulterada con P65(p100) en un 50% posee una T_{cf} más elevada que cuando se añade en un 25%.

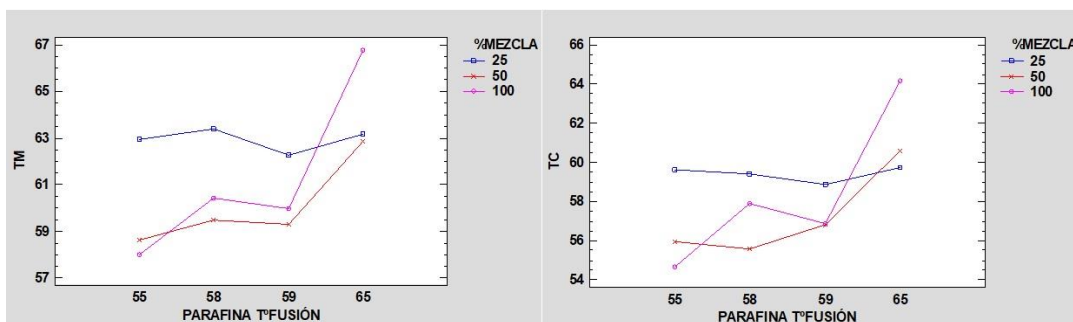


FIGURA 4. Gráfico de interacciones para Tmf y Tcf.

Con la finalidad de tener una visión global del efecto de la adición de parafina sobre las temperaturas de transición de la cera de abeja, se realizó un análisis PCA (Análisis de Componentes Principales) considerando de manera conjunta todas las variables. La Figura 5 muestra el Biplot PCA de este análisis, en el que dos componentes explicaron el 87% de la varianza total (PC1=57% y PC2=30%). El componente PC1 diferencia las muestras según el tipo de parafina adicionada.

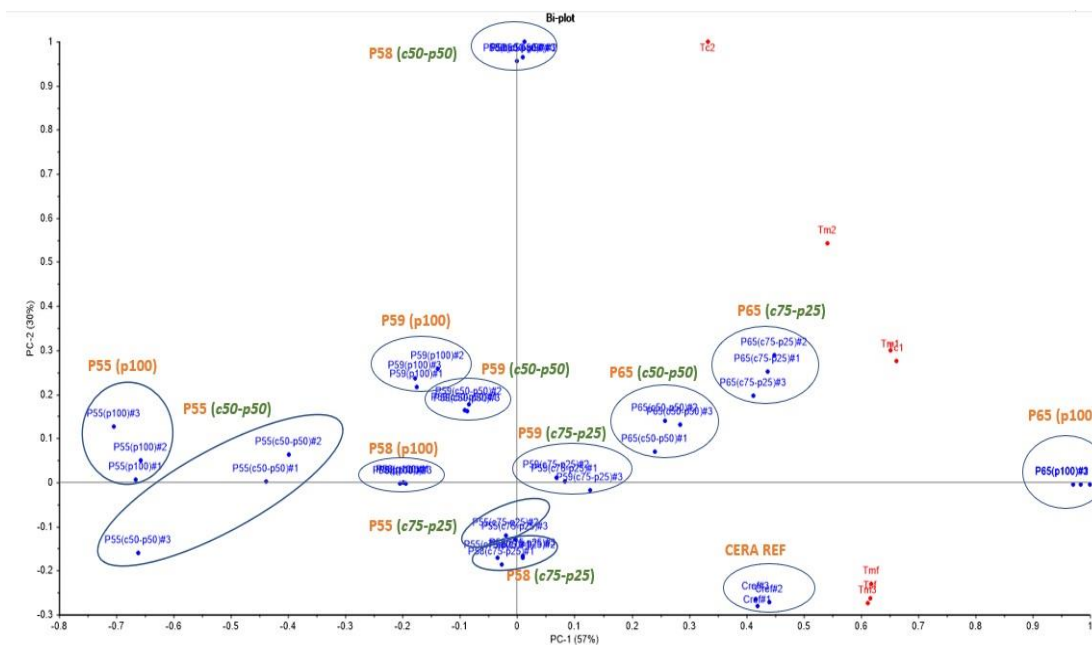


FIGURA 5. PCA-Biplot; score: muestras de cera adulterada y cera de referencia y loading: variables de temperaturas de transición vítrea obtenidas.

En el cuadrante derecho se sitúa la muestra de cera de referencia junto con la P65(p100), así como las muestras de cera adulteradas utilizando esta parafina. Como se ha señalado anteriormente, la parafina de 65°C de punto de fusión causa una variación muy pequeña en las temperaturas de transición vítrea de la cera de abeja y por lo tanto las ceras adulteradas en un 25 y 50% con esta parafina son las muestras más semejantes (misma posición en el eje) a ella.

En el otro extremo (cuadrante izquierdo) se sitúan las muestras con los valores menores de las variables analizadas, que se corresponden con la parafina pura de 55 (P55(p100) y su mezcla al 50% con cera (P55(c50-p50))

Las mezclas con parafina pura de 58 y de 59 (P58(p100) y P59(p100)) se sitúan muy próximas, en la zona central del gráfico debido a su similitud.

Efecto de la procedencia de la cera de abeja sobre las temperaturas de transición vítrea

En el presente trabajo, se han analizado 13 ceras puras de diferentes orígenes geográficos. La Figura 6 muestra como ejemplo, alguno de los termogramas obtenidos para estas muestras. Se observa cierta similitud entre ellos, aunque no en todos los casos se detectó el mismo número de temperaturas de transición vítrea. La Tabla 5 muestra los resultados (media y desviación típica) correspondientes a todas las muestras analizadas, así como los resultados del ANOVA (95%) realizado para el factor origen en aquellos parámetros de los que fue posible obtener datos en la totalidad de las muestras (Tm3, Tmf, Tc3 y Tcf). Todos ellos, se vieron afectados de manera significativa, aunque en diferente medida, por el origen de la cera (**p<0.001).

Las pequeñas diferencias halladas entre los distintos orígenes son debidas a que la cera es un material biológico que puede verse influido por numerosos factores como la subespecie de abeja, su forma de anidación y el hábitat en el que se desarrolla. Todo ello puede afectar a las propiedades estructurales (rigidez, resistencia y tenacidad) y térmicas (Buchwald et al., 2008) de la cera. Además, en las propiedades térmicas también podría influir la presencia de sustancias extrañas, como acaricidas o antibióticos, que se concentran gradualmente en el proceso de reciclado (Serra Bonvehí y Orantes Bermejo, 2012). Aunque se han invertido muchos esfuerzos en conseguir técnicas para “limpiar” la cera de abeja, ninguno de ellos ha dado resultado. Por lo tanto, la demanda del mercado de una cera libre de desechos sugiere la necesidad de explorar nuevas fuentes de distintos orígenes y estudiar sus propiedades y diferencias.

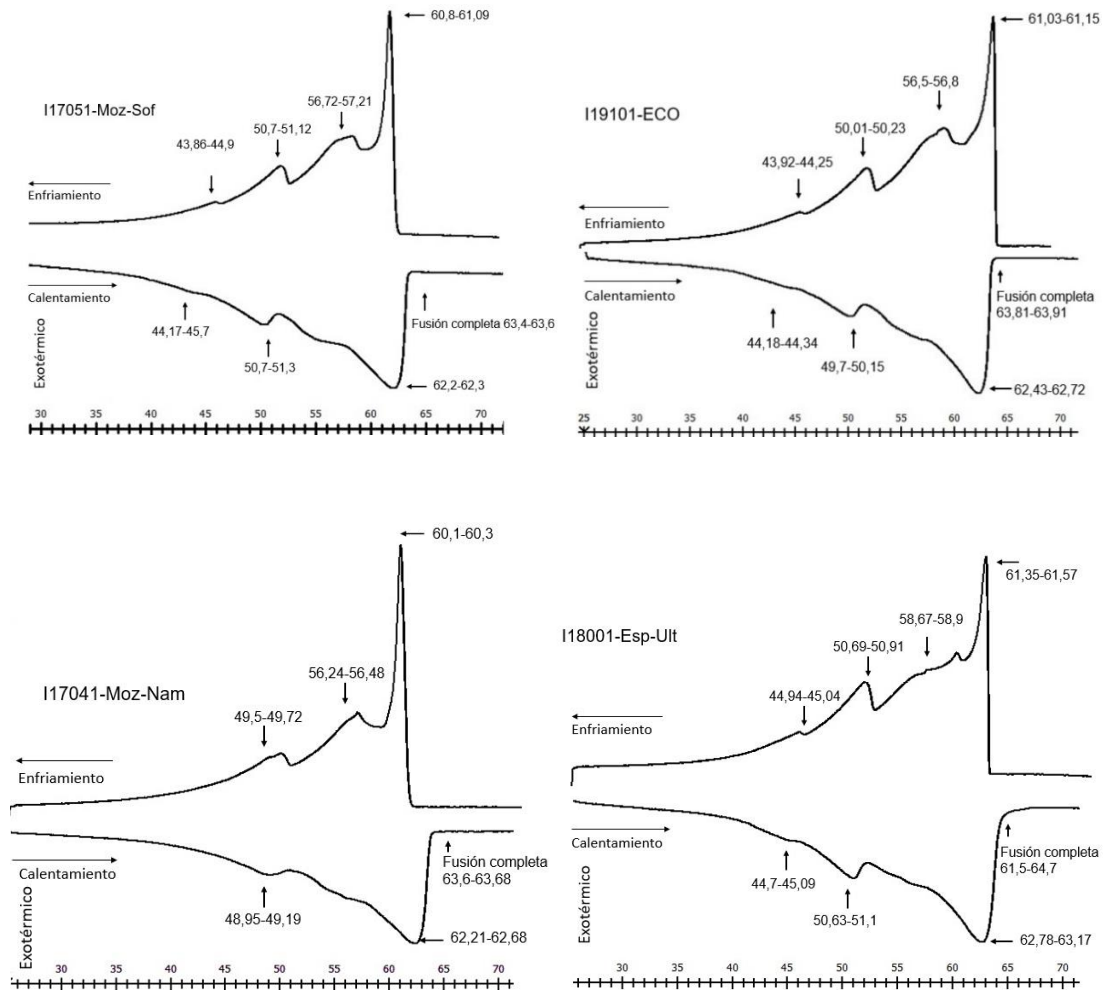


FIGURA 6. Ejemplos de termogramas obtenidos en muestras de cera de diferentes procedencias

El rango de fusión completa obtenido en todas las muestras varió entre 63.04°C y 65.65°C lo que es coherente con los rangos observados anteriormente por otros autores (65.62°C (Yao y Wang, 2012), 66.2°C (Gaillard et al., 2011), 64.4°C (U.Knuutinen y A. Norman, 2000)).

Las muestras de Mozambique (I17051-Moz-Sof, I17041-Moz-Nam) resultaron similares y comparten grupo homogéneo respecto a dos parámetros de temperatura (T_{m3} y T_m), aunque sus termogramas resultaron ligeramente diferentes. A su vez, las ceras de Mozambique resultaron similares a la cera procedente de Argentina. Particularmente, la cera I17051-Moz-Sof comparte grupo homogéneo con la cera procedente de Argentina (I16066-Arg) en 3 de los 4 parámetros analizados.

TABLA 5. Temperaturas de transición vítrea (media y desviación típica) obtenidas en las ceras de diferentes orígenes.

MUESTRA	Tm1	Tm2	Tm3	Tmf	Tc1	Tc2	Tc3	Tcf
I17007-ESP-M	43.27(0.12)	51.56(0.08)	61.29(0.12) ^b	63.42(0.19) ^b		50.21(0.04)	54.26(0.09) ^a	60.01(0.04) ^b
I16066-ARG		51.07(0.46)	62.06(0.24) ^c	63.68(0.24) ^{bc}		51.13(0.15)	56.92(0.42) ^{de}	60.40(0.30) ^{cd}
I170011-CHI		52.32(0.15)	61.11(0.09) ^b	64.19(0.07) ^{de}		52.65(0.02)	55.24(0.41) ^b	60.17(0.09) ^{bc}
I17012-ESP	46.44(0.09)	51.46 (0.26)	63.31(0.24) ^g	64.71(0.60) ^f	46.58(0.17)	51.25(0.08)	55.41(0.20) ^b	61.52(0.05) ^{ih}
I17035-CUB	45.94(0.05)	51.31(0.03)	62.76(0.06) ^{ef}	64.55(0.09) ^{ef}	46.75(0.01)	51.29(0.05)	57.41(0.00) ^f	61.10(0.01) ^{fg}
I17051-MOZ-SOF	45.21(1.10)	50.84(0.58)	62.44(0.26) ^d	63.55(0.07) ^{bc}	46.75 (1.36)	50.82 (0.67)	57.24(0.53) ^{ef}	60.67(0.49) ^{de}
I17041-MOZ-NAM		49.06(0.12)	62.46(0.23) ^d	63.78(0.15) ^{bc}		49.56(0.14)	56.36(0.12) ^c	60.22(0.11) ^{bc}
I18001-ESP-ULT	44.92(0.20)	50.94(0.27)	62.98(0.19) ^f	64.64(0.11) ^f	44.97(0.05)	50.79(0.11)	58.71(0.17) ^h	61.46 (0.20) ^{gh}
I17005-ESP-BU		52.00(0.06)	62.46(0.05) ^d	65.65(0.07) ^g		52.12(0.03)	57.54(0.15) ^{fg}	60.93(0.20) ^{ef}
I16091-HON	44.53(0.38)		60.69(0.15) ^a	63.04(0.06) ^a	44.95(0.10)		57.92(0.11) ^g	58.15(0.30) ^a
I19101-ECO	44.25(0.08)	49.95 (0.18)	62.57(0.14) ^{de}	63.86(0.05) ^{cd}	44.11(0.17)	50.12(0.10)	56.73(0.12) ^{cd}	61.07(0.06) ^f
ANOVA F RATIO			62.89 ^{***}	33.57 ^{***}			71.11 ^{***}	55.81 ^{***}

Por último, con la finalidad observar desde una perspectiva global el comportamiento de todas las muestras (cera pura de referencia, ceras adulteradas con parafina a diferentes concentraciones y ceras de diferentes orígenes geográficos) con relación a sus temperaturas de transición vítrea, la Figura 7 muestra el biplot del análisis PCA realizado en el que dos componentes explicaron el 90% de la varianza total (PC1=68% y PC2=22%). Se observa claramente la agrupación de las muestras siguiendo el patrón anterior, quedando agrupadas las muestras adulteradas según el tipo de parafina. Además, la totalidad de las ceras (la de referencia y las de distintas procedencias) quedan perfectamente separadas de las muestras que simulaban adulteración (25 y 50%). Esto confirma la eficacia de la técnica de DSC para diferenciar cera adulterada de la cera pura.

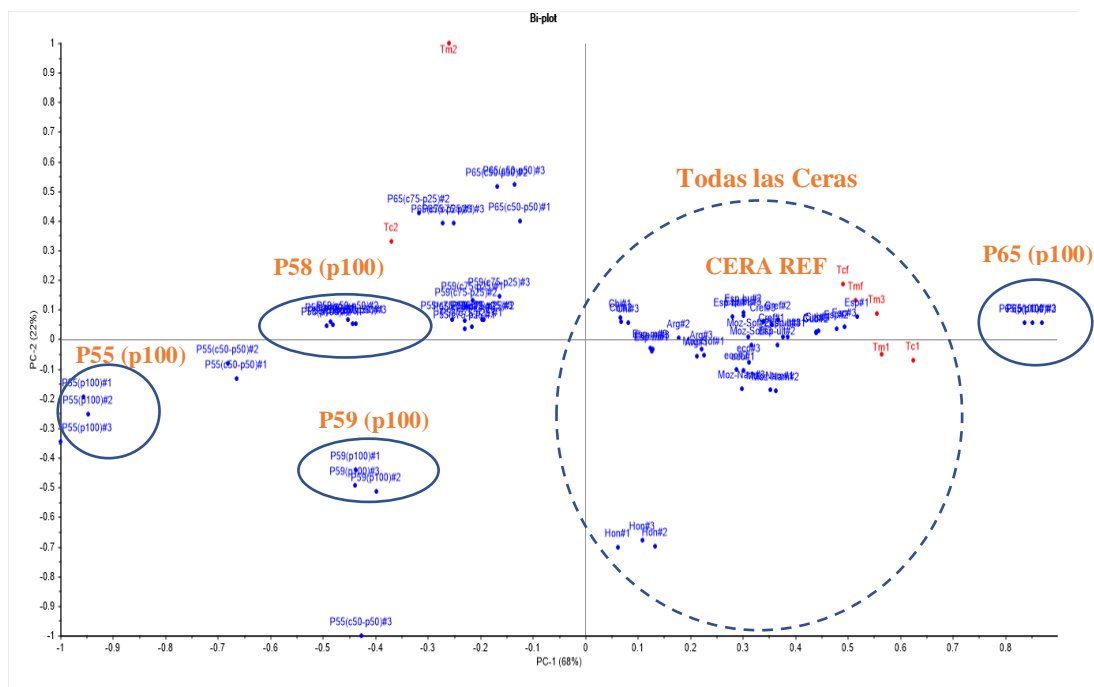


FIGURA 7. Biplot PCA de los dos componentes principales de todas las variables de temperatura calculadas en las muestras de cera adulterada, cera de referencia, y ceras de diferentes orígenes geográficos.

CONCLUSIONES

Las temperaturas de fusión, temperaturas de cristalización y otras temperaturas de transición vítrea asociadas, obtenidas mediante la técnica de DSC, han resultado efectivas para identificar, en muestras simuladas, la adición de parafinas a cera de abeja. Además, esta diferenciación se ha

demostrado incluso, considerando tanto ceras puras de referencia comercial, como ceras puras procedentes de diferentes países del mundo. Aunque los resultados son prometedores a nivel de laboratorio, es necesario continuar el estudio analizando otras muestras de ceras presentes en el mercado.

REFERENCIAS

Talenge Alberto, F.J. 2019. Características diferenciadoras de mieles y ceras de abeja del Norte y Centro de Mozambique. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Bernal, J. L.; Jiménez, J. J.; Del Nozal, M. J.; Toribio, L. y Martín, M. T. 2005. Physico-chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(3), 158-166.

Bisson S, C. 1940. Investigations on the physical and chemical properties of beeswax.

Bogdanov, S. 2016. Beeswax: Composition and Control. *Beeswax Book*, 1-18.

Buchwald, R.; Breed, M. D; Greenberg, A. R. 2008. The thermal properties of beeswaxes: Unexpected findings. *Journal of Experimental Biology*, 211(1), 121-127.

Buchwald, R., Greenberg, A. R.; Breed, M. D. 2005. A biomechanical perspective on beeswax. *American Entomologist*, 51(1), 39-41.

Dahimi, O., Rahim, A. A.; Abdulkarim, S. M.; Hassan, M. S.; Hashari, S. B. T. Z., Siti Mashitoh, A; Saadi, S. 2014. Multivariate statistical analysis treatment of DSC thermal properties for animal fat adulteration. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 158, 132-138.

Farmacopea Europea, [en línea]. Dirección URL: <<http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf>>. [Consulta: 5 de Sep. 2019]

Fratini, F.; Cilia, G.; Turchi, B.; Felicioli, A. 2016. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Elsevier B.V., 9(9), 839-843.

Gaillard, Y.; Girard, M., Monge, G.; Burr, A.; Ceretti, E. D.; Felder, E. 2013. Superplastic behavior of rosin/beeswax blends at room temperature. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(5), 2713-2719.

Gaillard, Y.; Mija, A.; Burr, A.; Darque-Ceretti, E.; Felder, E; Sbirrazzuoli, N. 2011. Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. *Thermochimica Acta*. Elsevier B.V., 521(1-2), 90-97.

Kodre, K.; Attarde, S.; Yendhe, P.; Patil, R.; Barge, V. 2014. Differential Scanning Calorimetry: A Review. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(3), 11-22.

L. Svecnjak.; G. Baranovic.; M. Vincekovi.; S. Prdun.; D. Bubalo. 2015. An Approach For Routine Analytical Detection", 59(2), 37-49.

Serra Bonvehi, J. y Orantes Bermejo, F. J. 2012. Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 132(1), 642-648.

Tesfaye, B. 2016. Analysis of Physico-Chemical Properties of Beeswax Produced in Bale Natural Forest, South-Eastern Ethiopia. *European Journal of Biophysics*, 4(5), 42.

Tulloch, A. P. 1980. Beeswax Composition and Analysis.

Ulla Knuutinen y A; Norman. 2000 "Wax analysis in conservation objects by solubility studies, FTIR and DSC", [en línea] *15th World Conference on Nondestructive Testing Roma (Italy) 15-21 October 2000*. Dirección URL: <<https://www.ndt.net/article/wcndt00/papers/idn555/idn555.htm>>. [Consulta: 10 de Oct. 2019]

Waś, E.; Szczęśna, T; Rybak-Chmielewska, H. 2015. Application of gas chromatography with the mass detector (GC-MS) technique for detection of beeswax adulteration with paraffin. *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 143-152.

Yao, L.; Wang, T. 2012. Textural and physical properties of biorenewable «waxes» Containing partial acylglycerides. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(1), 155-166.