

00524
84



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación electroquímica de HMF
{5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído}
en miel de abeja.

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

DANIEL JUÁREZ MENDOZA



MEXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Daniel Juárez Mendoza

FECHA: 25 - Noviembre - 2003

FIRMA: [Firma]

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Luz Elena Vera Ávila
Vocal	Profa. Francisca Iturbe Chiñas
Secretario	Prof. Octavio Reyes Salas
1er. Suplente	Prof. Juan Ramírez Balderas
2º. Suplente	Profa. Ruth Esther Villanueva Estrada

Sitio en donde se desarrolló el tema

Lab. 114, Depto. de Química Analítica

DEPg, Facultad de Química, U.N.A.M. Ciudad Universitaria

Asesor: Dr. Octavio Reyes Salas

Supervisor técnico: Profa. Selma Sosa Sevilla

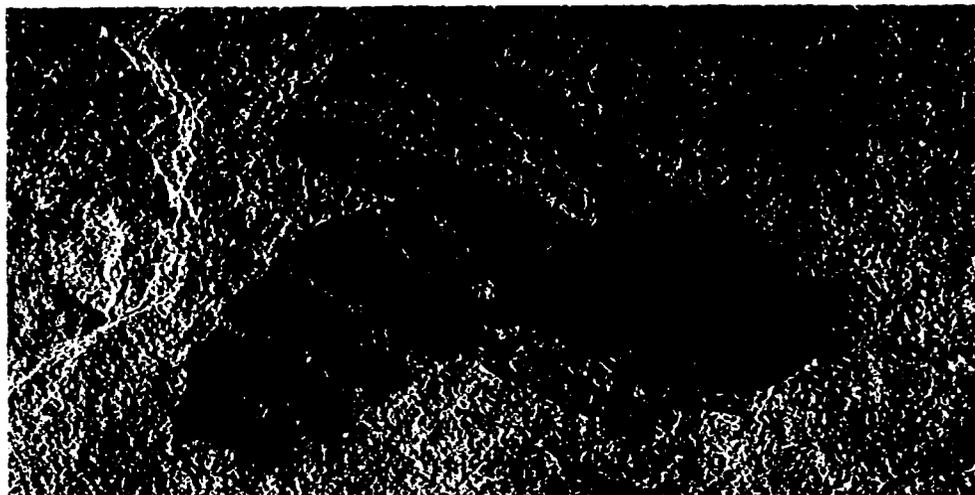
Sustentante: Daniel Juárez Mendoza

O. Reyes S.
Selma Sosa Sevilla
[Firma]

A:

Juan Juárez Villegas y Ma. de la Paz Mendoza Soria

Cuando muere, todo el mundo debe dejar algo detrás. Un hijo, un libro, un cuadro, una casa, un par de zapatos o un jardín plantado. Algo que tu mano tocará de un modo especial, de modo que tu alma tenga algún sitio a donde ir cuando tú mueras, y cuando la gente mire ese árbol o esa flor, que tú plantaste, tú estarás allí. No importa lo que hagas en tanto que cambies algo respecto a como era antes de tocarlo, convirtiéndolo en algo que sea como tú después de que separes de ellos tus manos. La diferencia entre el hombre que se limita a cortar el césped y un auténtico jardinero está en el tacto. El cortador de césped igual podría no haber estado allí, el jardinero estará allí para siempre.



FÓSIL DE ABEJA.
Originario de Florissant, Colorado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A

ÍNDICE

	Paginas
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.	3
2.1. Historia de la apicultura.	4
2.2. Producción de miel de abeja en México.	9
2.3. La miel de abeja.	11
2.4. Control de calidad de la miel de abeja.	15
2.4.1. Criterios específicos de calidad.	17
2.4.2. Contenido de azúcares y conductividad específica como nuevos estándares de calidad para la miel.	23
2.5. Métodos actuales para la cuantificación de HMF en miel de abeja.	26
2.6. Identificación fisicoquímica del HMF.	28
2.7. Monografía de la química del HMF.	31
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.	37
3.1. Objetivos.	40
CAPÍTULO 4. PARTE EXPERIMENTAL.	41
4.1. Material.	42
4.2. Resumen de la metodología.	44
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	47
5.1. Estudio electroquímico del HMF.	48
5.1.1. Influencia del tipo de electrodo.	48
5.1.2. Dominio de electroactividad.	48

5.1.2. Dominio de electroactividad.	48
5.1.3. Limite de detección y linealidad del método.	51
5.1.4. Estudio termodinámico.	53
5.2. Determinación de HMF en las muestras de miel.	54
5.2.1. Sistema miel-electrolito soporte.	54
5.2.2. Determinación de la concentración de HMF en la miel.	64
5.3. Estudios adicionales para la miel.	65
5.3.1. Determinaciones fisicoquímicas.	65
5.3.2. Estudio palinológico.	66
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.	67
6.1. Perspectivas.	70
ANEXOS.	71
Anexo A.	72
Anexo B.	72
Anexo C.	73
Anexo D.	76
Anexo E.	78
BIBLIOGRAFÍA.	79

6

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

**Anoche cuando dormía
soñé ¡bendita ilusión!
que una colmena tenía
dentro de mi corazón;
y las doradas abejas
iban fabricando en él,
con las amarguras viejas,
blanca cera y dulce miel.**

Antonio Machado



PAPIRO Y ABEJA
Símbolos del Alto y Bajo Egipto
Bajo relieve
Luxor

1-A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

La miel de abeja es una mezcla compleja formada en su mayor parte de fructuosa y glucosa. En condiciones normales, la miel conserva sus cualidades durante varios años; sin embargo, el exceso de humedad o una exposición prolongada al calor la degradan ocasionando la formación de 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (HMF), que se forma a partir de los azúcares que contiene¹⁻⁴. Debido a esto, prácticamente en todos los países del mundo se considera el contenido de HMF como uno de los principales indicadores de calidad para la miel⁵⁻⁶.

Las técnicas de análisis químico que se realizan actualmente para cuantificar el contenido de HMF en la miel de abeja se basan en la espectrofotometría (visible o ultravioleta) y en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), que se acopla a un detector de espectrometría de masas, de ultravioleta o de índice de refracción⁷⁻⁸. Estas técnicas comprenden, además de varios pasos para el tratamiento de la muestra, el uso de materiales y equipo que aumentan el costo y el tiempo del análisis.

El desarrollo de un método electroquímico para la cuantificación directa del HMF que permita un buen límite de detección, en el cual no sea necesario un tratamiento complicado de las muestras y sea más rápido y económico que los actuales, presenta una alternativa atractiva.

La base para desarrollar este método electroquímico está en función de las propiedades fisicoquímicas y electroquímicas del HMF y de la miel de abeja.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

**Yo sé que los amantes son abejas,
que en el jardín que aumentan sus amores
labran panales dulces, sin temores
no mezclan el acibar de sus quejas.**

Tirso de Molina

2.1. HISTORIA DE LA APICULTURA.

La apicultura es una actividad muy antigua. Durante la prehistoria se limitaba únicamente a la caza de los nidos de las abejas. Como testimonio de esto, tenemos la existencia de pinturas rupestres, por ejemplo, la que se encuentra en el interior de la Cueva de la Araña en Valencia, España⁹, en la cual se representa a un hombre rodeado de abejas y extrayendo miel de un panal (figura 1).

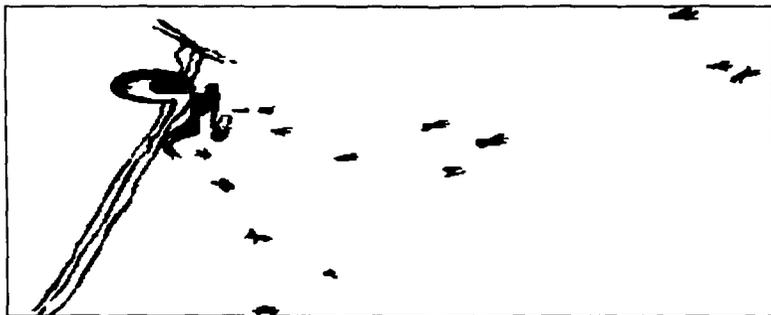


Fig. 1. Pintura mesolítica (15,000 a. C.)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El cultivo de las abejas con la finalidad de obtener miel y otros productos surgió en Europa, en la parte baja del Valle del Guadalquivir, durante la edad de bronce (4,500 años a.C.), en donde una población de origen africano llamada tartesios practicaba un tipo de apicultura rudimentaria. Los fenicios, con quienes mantenían relaciones comerciales, llevaron la apicultura a otros pueblos del Oriente entre los que se encontraban los babilonios, los hebreos y los egipcios.

Los antiguos egipcios criaban abejas y comerciaban con la miel y la cera a lo largo de la costa oriental de África. La representación gráfica de abejas en varias tumbas de los faraones demuestra que la miel desempeñó un importante papel en el antiguo Egipto, además, fue un ingrediente básico para la momificación. En las tumbas de Luxor (1,450 a.C.), por ejemplo, existen pinturas que muestran la extracción de miel de la colmena y el envasado en vasijas (figura 2).

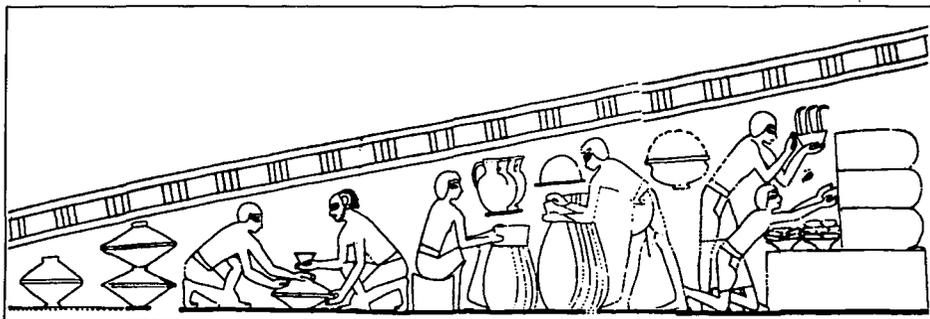


Fig. 2. Pintura mural en la tumba 100, Luxor

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Temas similares se encuentran también en las paredes del Templo del Sol de Ne-user-re (2,400 a.C.), en las que se representan apicultores trabajando con las colmenas y llenando ánforas con miel. Varios de estos recipientes fueron hallados en perfectas condiciones en una tumba egipcia sellada hace 3,500 años, comprobándose que después de 35 siglos, la miel que contenían aún conservaba la pureza y frescura semejante a la recién extraída del panal (figura 3)⁹.



Fig. 3. Bajo relieve del templo de Ne-user-re (Museo Egipcio de Berlín)

De Egipto, la apicultura pasó a Grecia y después a Roma. En Grecia, la miel se consumía abundantemente por la población y era empleada también para embalsamar. Los romanos la utilizaban por sus propiedades medicinales, asimismo como cicatrizante y antiséptico. Debido a la expansión del Imperio Romano la apicultura se extendió al resto de Europa, de donde pasaría, más tarde al continente Americano.

Historia de la apicultura en México¹⁰.

En México, la apicultura se ha practicado desde la época prehispánica; los mayas producían y comerciaban con la miel en el área de Centroamérica. En esta comunidad mesoamericana no existían las especies del género *apis*, sino que se cultivaban diferentes variedades del género *Melipona* (abejas melíferas tropicales,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sociales y sin aguijón) en particular la especie *Melipona beecheii* Bennett, cultivada todavía hoy en Yucatán y que en lengua maya se le conoce como Xuna'an-Kab.

Se cree que inicialmente los mayas se limitaban a robar la miel de las colmenas silvestres; después, comenzaron a cortar los troncos donde estaban los nidos, los trasladaban a su vivienda y los cuidaban hasta el momento de la cosecha. La apicultura representó para los mayas una actividad económica, social y religiosa de gran importancia como se simboliza en un fragmento de la pagina 104 del Códice Tro-Cortesianus⁹ (figura 4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig.4. Fragmento del Códice Tro-Cortesianus en el que se muestra al dios abeja Ah Mucen Kab sosteniendo un panal y al símbolo maya de la abeja.

Al llegar los españoles al nuevo continente en el siglo XVI, no introdujeron a la abeja común europea (*Apis mellifera*), ya que siempre consideraron la producción y venta de miel y de cera como un monopolio español.

Debido a las actividades religiosas, en América se incrementó el uso de cera, siendo difícil satisfacer esta demanda desde España; por tal motivo, la cera de abeja producida en la península de Yucatán y en Campeche por la especie *Melipona beecheii* se comercializó a través del puerto de Veracruz hacia otros lugares de la colonia española.

Debido a la estructura económica de la Nueva España, nunca se introdujo la abeja europea en las regiones mayas.

La llegada de la abeja europea a México no fue directa; es posible que se realizara desde Cuba entre los años de 1760 y 1770 pero sólo a la región central del país.

La abeja europea se trajo a Yucatán desde Estados Unidos a fines del siglo XIX; la especie que se introdujo fue *Apis mellifera Mellifera*; La abeja italiana *Apis mellifera Ligustica* fue traída a México posteriormente.

La apicultura moderna se basa en la abeja europea, en particular en la especie *A. m. Ligustica* y en la tecnología de marcos móviles que se inició en México a principios del siglo XX.

2.2. PRODUCCIÓN DE MIEL DE ABEJA EN MÉXICO¹¹.

Desde la llegada a México de la abeja europea, la apicultura se convirtió en una actividad industrial de gran importancia económica para el país. En 1991 México, con una producción de 69,495 toneladas de miel ocupó la cuarta posición mundial después de la URSS, China y los Estados Unidos.

Con la desintegración de la Unión Soviética, México ascendió en 1992 al tercer lugar mundial con 63,886 toneladas. Sin embargo, comenzó así una disminución en la producción, descendiendo al noveno lugar en 1995 con 49,228 toneladas después de China, Estados Unidos, Argentina, Rusia, Turquía, India, Bielorrusia y Ucrania. Pero a partir del año de 1996 comenzó un nuevo ascenso en la producción, lo que ha mantenido al país entre la tercera y la quinta posición, llegando a 55,783 toneladas en el año 2001. La mayor parte de la producción de miel en México se concentra en cinco estados: Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán, teniendo este último el primer lugar nacional.

En cuanto al rendimiento por colmena, se estima que el promedio nacional fue de 25 Kg en 1995 y de 30 Kg en el año 2002, lo que, comparado con el rendimiento superior a 40 Kg de otros países es relativamente bajo.

Durante el año 2000 el precio promedio de miel fue de 16,901 pesos la tonelada en miel sin procesar. En México se consumen en promedio 270 g de miel por persona al año, mientras que otros países tienen consumos superiores a un kilogramo por persona, lo que permite pensar en una futura expansión del mercado interno.

Exportación de miel ¹¹.

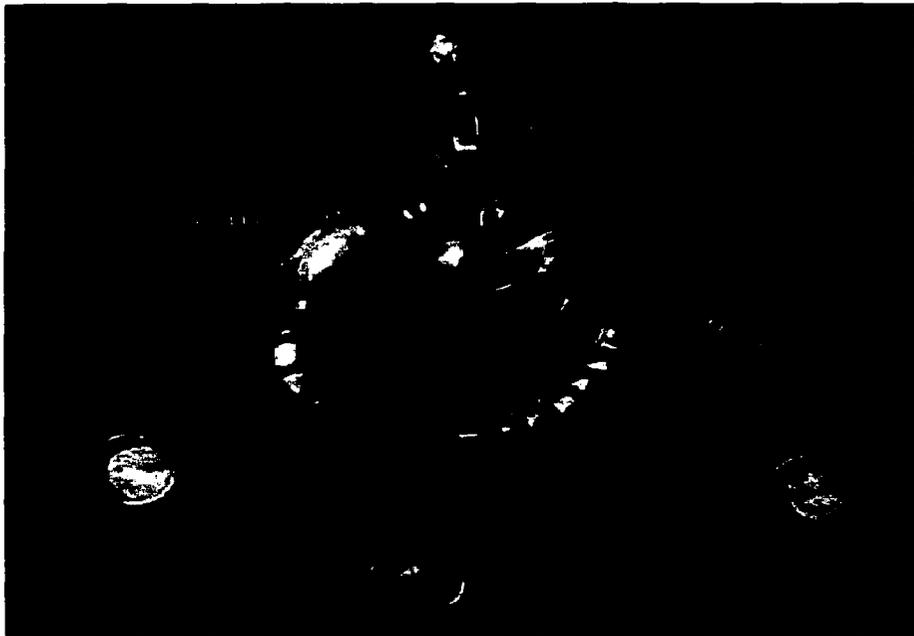
En 1995 México exportó 25,700 toneladas de miel manteniendo la tercera posición mundial después de China y Argentina, esto a pesar de haber disminuido en un 50% las ventas al exterior con respecto al año de 1991. En promedio, se exportaron 35,000 toneladas anuales durante el periodo de 1991 a 1995, con un valor de 1,007 dólares por tonelada.

Principalmente México ha exportado a Alemania, al Reino Unido y a Estados Unidos, que de manera conjunta reciben más del 90 % de la exportación total. México había sido el principal proveedor del mercado alemán hasta 1993; sin embargo, en 1994, con el 24% ya no ocupó el primer lugar pues fue superado por Argentina con el 27%.

La exportación de México hacia Estados Unidos ha sufrido altibajos, ya que en 1990 se tenía el 21% del mercado, y en 1994 solo se logró el 6%. De tal forma, China, Argentina y Canadá pasaron a representar prácticamente la totalidad de las adquisiciones estadounidenses en estos años.

México, por lo general, vende mieles a granel, clasificadas por color aunque no siempre por floración, y la consecuencia negativa son precios relativamente bajos para los productores. Sin embargo, las ventas se incrementaron a partir del año 2000 llegando a 30,000 toneladas, lo que le ha permitido a México mantenerse entre la tercera y cuarta posición como exportador.

Cabe mencionar que la miel mexicana tiene una ligera plusvalía en Europa con respecto a la miel Argentina y más aún con respecto a la China.



PENDIENTE DE ORO MOSTRANDO DOS ABEJAS.
Originario de Mallia, Creta 2000-1700 a.C.
Museo Arqueológico de Heraklion

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10-A

2.3. LA MIEL DE ABEJA.

Según la norma mexicana NMX-F-036-1997 la miel "es la sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones o de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales; de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición".

Según su origen botánico las mieles se dividen en:

Mieles monoflorales: en cuya composición predomina el néctar de una especie vegetal determinada (de entre las varias que la componen), de la cual toma el nombre y donde el polen de dicha especie debe ser predominante. Mieles de alta calidad son las elaboradas a partir de la flor de azahar y de trébol.

Mieles multiflorales: en su composición entra el néctar de varias especies vegetales sin que ninguna de ellas pueda considerarse predominante.

Mieles de mielada: no proceden del néctar de flores, sino de secreciones de otras partes vivas de la planta como las hojas o los frutos.

Elaboración de la miel por las abejas.

La abeja recolecta con su trompa pequeñas gotas de néctar que se encuentran en las glándulas secretoras de la flor, el néctar es depositado en una pequeña bolsa elástica que la abeja tiene separada del aparato digestivo, donde se mezcla con enzimas (invertasas) procedentes de las glándulas salivales que inician el proceso de formación de la miel. Para llenar la bolsa se necesita el aporte del néctar de 1000 a 1500 flores, en caso de necesitarlo la abeja toma algo del néctar

almacenado en la bolsa para su alimentación, pero la mayor parte va a la colmena, donde lo regurgitará pasándolo de boca en boca a otras obreras, fenómeno conocido como trofalaxia. Las abejas continúan el proceso al enriquecer el néctar con más enzimas, hasta que finalmente lo depositan en celdillas. La transformación bioquímica que lleva a la formación de miel se acompaña de una deshidratación progresiva, por evaporación del agua, lo que consiguen las abejas gracias a una enérgica ventilación producida por sus alas. Posteriormente cierran la celdilla con cera (operculación) para su almacenamiento definitivo. La invertasa sigue actuando sobre el néctar una vez almacenado.

La miel se recoge normalmente una o dos veces al año; para ello, primero hay que desopercular las celdillas que la contienen y extraerla por centrifugación.

Composición general de la miel.

En la tabla siguiente se da un ejemplo de los principales componentes de la miel *

Componentes	en 100 g de miel	Concentración
Energía	302 Kcal.	
Hidratos de carbono	78 g	
Proteínas totales	2.2 g	
Agua	17 g	
Grasas totales	0	
Calcio	20 mg	200 ppm
Hierro	0.8 mg	8 ppm
Magnesio	3 mg	30 ppm
Sodio	5 mg	50 ppm
Potasio	51 mg	510 ppm
Ácido ascórbico	4 µg	0.04 ppm
Tiamina	0.01 µg	0.0001 ppm
Riboflavina	0.07 µg	0.0007 ppm
Niacina	0.2 µg	0.002 ppm

*Instituto Nacional de la Nutrición (Chávez y colaboradores, 1992)

En muy pequeñas cantidades, la miel también contiene algunas enzimas y hormonas. No puede darse una composición única de la miel ya que ésta varía bajo la influencia de diversos factores como el origen geográfico, la época de la cosecha etc.

Propiedades terapéuticas de la miel.

La miel ha sido utilizada desde hace siglos con fines terapéuticos, por ejemplo, en tratamiento de dermatitis y llagas; en heridas y quemaduras siendo muy empleada localmente por ser cicatrizante; en afecciones bronquiales, deshidratación, avitaminosis, hepatopatías e infecciones.

La riqueza en sales minerales de la miel la hacen recomendable para compensar la desmineralización de los huesos. La miel tonifica el corazón fatigado, facilita sus contracciones y favorece el riego sanguíneo. Por su contenido en hierro, es de utilidad en el tratamiento de la anemia, ocasionada por deficiencia de hierro.

Tiene efectos sedantes sobre el sistema nervioso alterado; ayuda incluso en casos de depresión ligera e insomnio. Tiene propiedades diuréticas y actúa también contra el estreñimiento y favorece la digestión por su contenido enzimático.

La miel se emplea desde hace mucho tiempo como remedio para las afecciones del sistema respiratorio como la gripe, la laringitis y la faringitis.

Actualmente, se llega a utilizar en la desintoxicación de alcohólicos, ya que su alto contenido en fructosa hace que se acelere el metabolismo del alcohol.

Por sus propiedades antisépticas, restablece la flora intestinal y es desinfectante de las vías urinarias. Se emplea en el tratamiento de úlcera gástrica por ser cicatrizante y antimicrobiano. La miel protege la mucosa gástrica y favorece el

ataque contra *Helicobacter pylori*, la bacteria responsable de la aparición de las úlceras gástricas.

El poder antiséptico se debe, tanto a la alta concentración de azúcares y del poder antimicrobiano de ciertos ácidos orgánicos que posee, como a la formación de peróxido de hidrógeno a partir de glucosa por la acción del complejo enzimático glucosa-oxidasa¹².

En algunos puntos es necesario realizar una mayor investigación que permita confirmar y avalar estas propiedades.

2.4. CONTROL DE CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA.

La miel puede conservarse por largo tiempo sin que pierda sus propiedades nutritivas y terapéuticas. Sin embargo, al paso del tiempo y por someterla a temperaturas elevadas se altera en su composición y en sus propiedades. Por otra parte, si existe una excesiva humedad se puede favorecer el crecimiento de levaduras que metabolizan los azúcares produciendo fermentación alcohólica y originando una mayor acidez ¹³

Existen varios parámetros para determinar la calidad en la miel de abeja; los más empleados consisten en¹⁴:

1. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS (cuenta de microorganismos, capacidad antiséptica, presencia de antibióticos, etc.)
2. ÍNDICES FISICOQUÍMICOS (pH, conductividad eléctrica, índice de refracción, etc.)
3. ÍNDICES DE EVALUACIÓN TÍPICA DE LA MIEL (contenido de humedad, de HMF, de azúcares reductores, etc.)

Los criterios de calidad de la miel están especificados en la Directiva Europea¹⁵ y en los estándares del *Codex Alimentarius*¹⁶, los cuales están actualmente en revisión¹⁷⁻¹⁸. La Comisión Internacional de la Miel (IHC, International Honey Commission), se formó en 1990 para revisar los métodos y los estándares de la miel de abeja. Inicialmente, recopiló y discutió los métodos de análisis aceptados en el control de calidad de la miel. Luego, condujo análisis interlaboratorio en

colaboración con la comisión del Manual Suizo de Alimentos SFM, (Swiss Food Manual). Los métodos fueron publicados inicialmente por la SFM¹⁹ y luego ligeramente modificados⁵. El trabajo actual de la IHC se concentra en los criterios de composición de miel de abeja monofloral y está coordinado por Werner von der Ohe, del Instituto Regional para la Investigación de las abejas (Landesinstitut für Bienenforschung, Wehlstr. 4^a, 29221 Celle, Germany)

En general, las normas del *Codex Alimentarius* son válidas para la comercialización de miel en el mundo, mientras que otras normas regionales como la Regulación Europea de la Miel establece requerimientos de calidad específicos para la región, que pueden ser diferentes a los sugeridos por el *Codex Alimentarius*.

El borrador de la UE indica que no se deben remover componentes esenciales de la miel, mientras que en el *Codex* expresa que la miel no puede ser procesada hasta el punto de alterar su composición esencial.

Por otro lado, los estándares de la UE consideran la definición de miel industrial y miel de horneado ausente en el *Codex*. Estas denominaciones se refieren a mieles adecuadas para el consumo humano, que pueden presentar sabor u olor no característicos, fermentación, sobrecalentamiento, baja actividad de diastasa o elevado contenido de hidroximetilfurfural respecto a los valores indicados en la norma. La descripción de esta denominación de calidad es necesaria porque la miel de uso industrial es generalmente esterilizada.

2.4.1. Criterios específicos de calidad.

En la Tabla 1 se resumen los criterios de calidad de acuerdo con los apuntes de la *Unión Europea*, del *Codex Alimentarius* y de la *norma Mexicana*. Según el *Codex* estos estándares no son obligatorios y pueden ser voluntariamente adoptados por los distintos gobiernos. Sin embargo, en el borrador de la UE todos los países que comercializan miel de abeja deben cumplir con estos requisitos.

Contenido de humedad

El contenido de humedad es un criterio común en la composición de la miel, que debe ser cumplido como parte de las normas de calidad de la miel de abeja para su comercialización mundial. Mieles con elevado contenido de humedad pueden fermentar. En el borrador de los nuevos estándares se sugiere un valor máximo de humedad de 21 g / 100 g de miel. En la práctica, este valor máximo de humedad es muy raro. La IHC realizó análisis en aproximadamente 30 000 muestras de miel, entre los años de 1989 a 1997, encontrando que aproximadamente el 93 % de las muestras presentaron contenidos de humedad inferiores a 20g / 100 g de miel²⁰. Los estándares suizos utilizaron un máximo de humedad de 20g / 100 g de miel en los pasados 20 años, hasta que debieron adoptar el máximo de 21 g / 100 g de miel sugerido por la UE, tal como indica la última revisión de la Ordenanza Suiza de Alimentos. Es de notar que numerosas organizaciones apícolas (Alemania, Austria, Bélgica, España, Italia y Suiza) utilizan máximos de humedad comprendidos entre 17.5 y 18.5 g/100 g de miel para clases especiales de mieles.

TABLA 1. NORMAS DE CALIDAD DE LA MIEL SEGÚN EL BORRADOR CL1998/12-S DEL CODEX ALIMENTARIUS, DEL BORRADOR 96/0114 (CNS) DE LA UE. Y DE LA NORMA MEXICANA NMX-F-036-1997

Criterios de calidad	Borrador del Codex	Borrador de la UE	NMX-F-036-1997
Contenido de humedad: Mieles florales Brezo, trébol Industrial o de panadería	≤ 21 g/100g ≤ 23 g/100g ≤ 25 g/100g	≤ 21 g/100g ≤ 23 g/100g ≤ 25 g/100g	≤ 20 g/100g
Contenido aparente de azúcares reductores: Mieles florales Miel de mielada o mezclas de miel de mielada con mieles florales. <i>Xanthorrhoea pr.</i>	≥ 65 g /100 g ≥ 45 g /100 g ≥ 53 g /100 g	≥ 65 g /100 g ≥ 60 g /100 g ≥ 53 g /100 g	≥ 64 g/100g
Contenido aparente de sacarosa: Mieles florales <i>Robinia , Lavandula, Hedysarum, Trifolium, Citrus, Medicago, Eucalyptus cam., Eucryphia luc., Banksia menz., Rosemarinus</i> <i>Calothamnus san., Eucalyptus scab., Banksia gr., Xanthorrhoea pr.,</i> miel de mielada y sus mezclas con mieles florales	≤ 5 g/100 g ≤ 10 g/100 g ≤ 15 g/100 g	≤ 5 g/100 g ≤ 10 g/100 g -	≤ 5g/100g
Contenido de sólidos insolubles en agua: Mieles centrifugadas Mieles exprimidas	≤ 0.1 g/100 g ≤ 0.5 g/100 g	≤ 0.1 g/100 g ≤ 0.5 g/100 g	≤ 0.3 g/100g
Contenido de minerales (cenizas): Mieles florales Miel de mielada o mezclas de miel de mielada con mieles florales	≤ 0.6 g/100 g ≤ 1.2 g/100 g	≤ 0.6 g/100 g ≤ 1.2 g/100 g	≤ 0.6 g/100g -
Acidez	≤ 50 meq/kg	≤ 40 meq/kg	≤ 40 meq/kg
Actividad de diastasa (Luego de procesar y mezclar): Mieles florales (en escala Schade) Mieles con bajo contenido natural de enzimas	≥ 8 ≥ 3	≥ 8 ≥ 3	≥ 8* ≥ 3**
Contenido de hidroximetilfurfural: Luego de procesar y/o mezclar	≤ 60 mg/kg	≤ 40 mg/kg	≤ 80mg/kg

* en la escala Goethe

** en la escala Goethe. Será mínimo de 3. siempre y cuando no exceda en el contenido en HMF de 15 mg/kg

Contenido aparente de azúcares.

En la mayoría de las mieles florales, los azúcares aparentes (glucosa, fructosa y sacarosa) representan el más alto porcentaje. Sin embargo, en la miel de mielada la situación es diferente, de hecho, muchas mieles de mielada contienen elevadas cantidades de oligosacáridos no reductores como la melecitosa, la maltotriosa y la rafinosa. El estándar para el contenido aparente de azúcares ha sido modificado en el borrador del Codex, con un mínimo de 45 g/100 g de miel para miel de mielada. El borrador europeo mantiene la antigua norma de 60 g/100 g de miel. La "sacarosa aparente" se mide de manera indirecta como la diferencia entre total de azúcares y los azúcares reductores y puede a menudo ser diferente a la sacarosa real. Aquí ambos borradores son similares pero el borrador del Codex incluye más tipos de mieles que el borrador Europeo. Se puede reemplazar la medición de los azúcares reductores con la de azúcares específicos.

Contenido de sólidos insolubles en agua.

La cuantificación de los sólidos insolubles en agua permite detectar algunas impurezas de la miel de abeja superiores al máximo permitido. Este método se validó cuando una considerable proporción de la miel producida en todo el mundo era cosechada por prensado de los panales. En la actualidad, prácticamente toda la miel de abeja comercial se extrae de los panales por centrifugación, de tal forma que este análisis mantiene su vigencia únicamente como un medio de control higiénico.

Contenido de minerales (cenizas).

El contenido de cenizas es un criterio de calidad para evaluar si el origen de la miel es floral, de mielada o la mezcla de ambas. Las mieles florales poseen un contenido de cenizas menor que las mieles de mielada²¹. Actualmente, esta determinación suele reemplazarse por la medición de conductividad eléctrica. El contenido de cenizas puede mantenerse como un factor de calidad durante un período de transición, hasta que la conductividad sea aceptada como un estándar en el ámbito mundial.

Acidez.

La acidez es un importante criterio de calidad. La fermentación de la miel causa un incremento de acidez; por ello, si bien existe una considerable variación natural, resulta útil fijar un máximo de acidez como norma. El límite máximo de acidez de 40 miliequivalentes por Kg de miel ha sido incrementado a 50 miliequivalentes por Kg en el borrador del *Codex*, porque existen mieles con una acidez natural más elevada²².

Actividad de diastasa.

La actividad de la diastasa en la miel de abeja es un factor de calidad que puede ser alterado durante el procesamiento y el almacenamiento de la miel; por ello se utiliza como indicador de sobre calentamiento y de frescura. Si bien la actividad de la diastasa varía según el origen botánico de la miel, el mínimo de 8 unidades de diastasa (DU, "*diastase units*") ha resultado útil como estándar de calidad. En análisis de rutina a largo plazo realizados por la IHC para control de calidad de

miel de abejas, más del 92% de las muestras de mieles frescas y más del 88% de las mieles empacadas presentaron valores de DU superiores a 8²⁰. Al interpretar los resultados de actividad de diastasa debe considerarse que algunas mieles monoflorales poseen una actividad baja de diastasa por naturaleza.

Contenido de hidroximetilfurfural.

Este factor de calidad es un indicador de la frescura de la miel y a la vez, del grado de envejecimiento y/o calentamiento. El contenido de HMF es considerado un factor determinante porque prácticamente no hay hidroximetilfurfural en las mieles frescas, independientemente de su origen natural. Su formación ocurre durante el almacenamiento de la miel y aumenta según las condiciones de pH y temperatura de almacenamiento²³.

El mercado internacional ha constatado que un máximo de 40 mg/Kg es satisfactorio. Durante el control de rutina de la IHC durante los últimos diez años, más del 90% de las muestras de miel fresca y más de 85% de las muestras envasadas presentaron menos de 30 mg HMF/Kg de miel²¹. La propuesta del *Codex* es fijar un máximo de 60 mg HMF/Kg de miel. La propuesta de un máximo más elevado responde al hecho de que el HMF aumenta más rápido durante el almacenamiento de la miel de abeja en los países tropicales cuyos climas son más calurosos. La propuesta más reciente de la UE exige un máximo de 40 mg HMF/Kg de miel; la validez de este estándar ha sido demostrada en condiciones europeas. La norma mexicana señala 80 ppm como máximo en miel envasada con más de 6 meses y 40 ppm en miel envasada con menos de seis meses²⁵.

Algunas federaciones europeas (Alemania, Bélgica, Italia, Austria y España) comercializan una porción de sus mieles como **miel de alta calidad**, la cual contiene un máximo de **15 mg HMF/Kg** de miel.

En la figura 5 se muestra cómo una miel almacenada a temperaturas menores a 25°C puede mantenerse varios meses (e incluso años) sin que aumente considerablemente el contenido de HMF. En cambio, una miel calentada o mantenida a temperaturas superiores a 30 °C, puede rebasar el contenido permitido de HMF (40 ppm) en menos de un año.

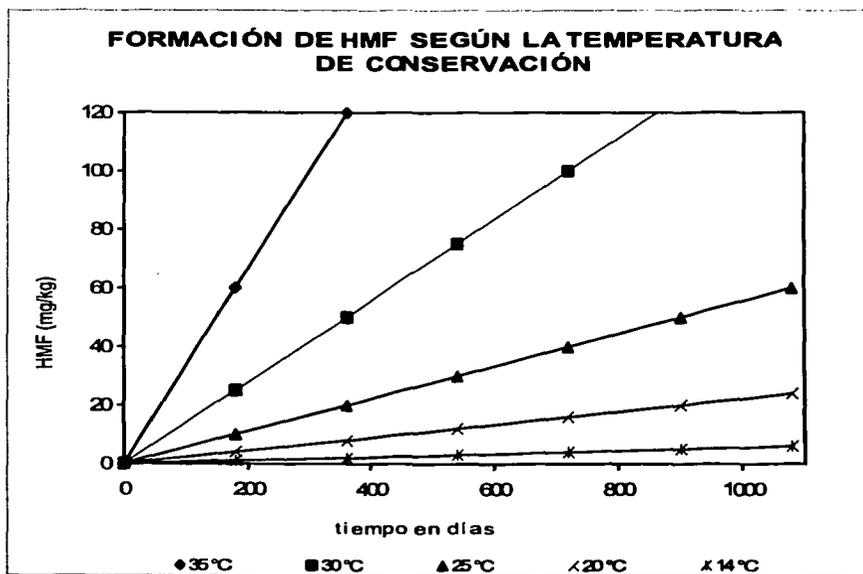


Fig. 5. Datos a partir de Piro et al. ²³

Contenido de polen

El considerar al polen como un componente esencial de la miel, radica en que sirve para determinar el origen botánico y geográfico de la miel; el polen residual en la miel es menor del 0.01%. Las mieles mexicanas, a diferencia de la de otros países, no están caracterizadas por su contenido de polen, es decir, se desconoce desde el punto de vista palinológico su origen botánico y geográfico⁴⁶.

2.4.2. Contenido de azúcares y conductividad específica como nuevos estándares de calidad para la miel.

Como puede observarse, sólo existen diferencias poco relevantes entre los borradores del *Codex*, de la UE y de la norma mexicana. Pero ninguno de ellos contiene criterios de calidad como el contenido de azúcares específicos y la conductividad eléctrica (tabla 2).

TABLA 2. CONTENIDO DE AZÚCARES ESPECÍFICOS Y CONDUCTIVIDAD ESPECÍFICA.

Nuevos criterios de calidad	Valores propuestos
Contenido específico de azúcares reductores: <u>Suma de glucosa y fructosa</u>	
Mieles florales	≥ 60 g / 100 g
Miel de mielada o mezclas de miel de mielada con mieles florales	≥ 45 g / 100 g
Contenido de glucosa	
Mieles florales	≤ 38 g/100 g
Contenido específico de sacarosa (sacarosa real):	
Mieles florales	≤ 5 g/ 100 g
Miel de mielada o mezcla de miel de mielada con mieles florales	≤ 5 g/ 100 g
<i>Banksia, Citrus, Hedysarum, Medicago, Robinia</i>	≤ 10 g/ 100 g
<i>Lavandula,</i>	≤ 15 g/ 100 g
Conductividad eléctrica específica:	
Mieles florales	≤ 0.8 mS/cm
Miel de mielada o mezcla de miel de mielada con mieles florales	≥ 0.8 mS/cm

Conductividad específica.

Se propone que la conductividad específica pueda sustituir la determinación de cenizas en análisis de rutina. Esta medición es directamente proporcional al contenido de cenizas de la miel²¹, ya que existe una relación lineal entre el contenido de cenizas y la conductividad específica dada por la siguiente expresión: $C = 0.14 + 1.74 A$, donde "C" es la conductividad específica (en Siemens*cm⁻¹) y "A" es el contenido de cenizas en g/100 g de miel²⁴.

Las mieles florales tienen valores de conductividad específica menores de 0.8 mS*cm⁻¹ y las mezcla de miel de mielada con mieles florales y la miel de castaña poseen valores mayores de 0.8 mS*cm⁻¹. Las mieles de Madroño (*Arbutus unedo*), *Banksia*, *Erica*, *Leptospermum*, árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y tilo (*Tilia cordata*) pueden presentar variación en su conductividad específica.

La medición de conductividad específica es fácil, rápida y requiere instrumentación sencilla. Es una determinación que se puede utilizar para distinguir entre la miel floral y la miel de mielada. Por esta razón, es recomendable introducirla en los estándares de calidad.

Contenido específico de azúcar.

Se sugiere un contenido mínimo de 60 g (fructosa+glucosa)/100 g de miel en todas las mieles florales y de 45 g/100 g de miel para las mieles de mielada (tabla 2). La suma del contenido de glucosa y de fructosa está muy cercana a la suma de la totalidad de azúcares reductores, ya que la fructosa y la glucosa representan más del 90% de todos los azúcares reductores. De hecho, el estándar mínimo

propuesto para la suma de glucosa y fructosa de 45g y 60g/100 g de miel para mieles de mielada y mieles florales respectivamente, es prácticamente igual a los estándares propuestos para el contenido de azúcares reductores.

Actualmente, la determinación del contenido de azúcares reductores se emplea de manera rutinaria en el análisis de la miel (método de Fehling), pero no provee mucha información acerca de la calidad de la misma.

Con la excepción de algunas mieles monoflorales como *Banskia*, *Citrus*, *Hedysarum*, *Medicago* y *Robinia* con contenidos de hasta 10 g de sacarosa /100 g de miel, se sugirió el estándar de 5g de sacarosa/100 g de miel y en el caso de la miel de lavanda (*Lavandula*) se acepta hasta 15 g de sacarosa /100 g de miel.

Por otro lado, el estándar propuesto para la sacarosa real es muy similar al de la sacarosa aparente (tabla 2). Existen excepciones entre la miel de mielada, donde el estándar de la sacarosa aparente es 15 g de sacarosa/100 g de miel, mientras que el estándar específico es de 5 g de sacarosa/100 g de miel.

La introducción de un estándar para el contenido de azúcares específicos tendría consecuencias favorables para el control de calidad de rutina de la miel de abeja, ya que, la proporción de fructosa/glucosa y la concentración de sacarosa son indicadores útiles para poder evaluar la autenticidad y la posible adulteración de la miel con otras fuentes de azúcares.



CÓDICE GRIEGO DE OPIANO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5. MÉTODOS ACTUALES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HMF EN MIEL DE ABEJA

Espectrofotometría visible.

La determinación del HMF descrita en la mayoría de los estudios y en la norma mexicana se realiza con el método de Winkler²⁶ propuesto en 1955 y que se basa en la formación de un compuesto colorido que se genera por la reacción del HMF con ácido barbitúrico en agua y de p-toluidina en una mezcla de isopropanol-ácido acético glacial. Las lecturas de absorbancia se realizan en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 550 nm de absorbancia cuando se alcanza el máximo desarrollo de color (1-4 minutos); las lecturas deben hacerse lo más rápido posible, ya que la intensidad del color disminuye con el tiempo.

Además de que las muestras requieren de un tratamiento especial para el análisis, no existen límites de detección ni información sobre sensibilidad reportados para este método donde el HMF se determina de manera indirecta, por formación de un derivado no muy estable.

Espectrofotometría ultravioleta.

Como variación, en algunos estudios se emplea el método oficial de la AOAC²⁷ basado en la reacción del HMF con ferrocianuro de potasio trihidratado, acetato de zinc y bisulfito de sodio en agua destilada. La absorbancia de la muestra se determina a 284 y 336 nm; tampoco existen límites de detección reportados para este método. En esta determinación que también es indirecta, se utiliza la siguiente fórmula para conocer la concentración:

$$\text{mg HMF/100g de miel} = \frac{(A^{284 \text{ nm}} - A^{336 \text{ nm}})(\text{factor})}{\text{g de la muestra}}$$

Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

El método HPLC está basado en la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas partiendo de compuestos con un grupo carbonilo y en la subsiguiente separación de los derivados por cromatografía de fase inversa.

Los derivados se forman a partir de una solución ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina en acetonitrilo. Así se evita la precipitación de los derivados carbonílicos, permitiendo la inyección directa de la muestra dentro del sistema de HPLC. Este proceso ofrece una alta especificidad, ya que los derivados carbonílicos son bien separados de otros compuestos presentes en la muestra. El límite de detección es del orden de 10 µg/kg (0.01 ppm o 10 ppb) y la reproducibilidad sobre la base de seis determinaciones es de $\pm 3\%$ para 2-furaldehído y de ± 2 para HMF²⁸.

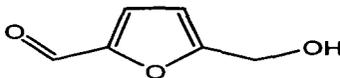
El método HPLC permite la separación y determinación del HMF y otros seis compuestos carbonílicos diferentes, algo que en la espectrofotometría no se puede lograr. En contraste, la recuperación fue significativamente más alta en la espectrofotometría que en HPLC. Como quiera que sea, el método HPLC se considera superior a la espectrofotometría por su gran selectividad²⁹ y por indicar los criterios analíticos de límite de detección e intervalo de confianza. Sin embargo, se basa también en la formación de derivados del HMF y presentan un costo relativamente alto de análisis por los disolventes, reactivos y equipo utilizados.

2.6. IDENTIFICACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURANCARBOXALDEHIDO.

Número de registro. CAS: 67-47-0

Sinónimos: HMF, 5-(Hydroximetil)-2-furaldehido; 5-(hydroximetil)-2-furancarbondal; 5-(hydroximetil)-2-furfural; 5-hydroximetil-2-formilfuran; 5-oxymetilfurfurolo; hydroximetil furfuraldehido

Estructura, Fórmula molecular y Peso molecular



$C_6H_6O_3$ pm: 126.11

Propiedades físicas y químicas.

Descripción: sólido cristalino³⁰ o líquido amarillo oscuro³¹, olor a flores de *Matricaria chamomilla*³²

Punto de ebullición: 110°C a 0.02 mm Hg³²; 114-116°C a 1 mm Hg³¹.

Punto de fusión: 31.5°C³²; 32-35°C³¹

Densidad: 1.2062³².

Índice de refracción: 1.5627 a 18°C³²

UV máxima absorción: 283 nm

Solubilidad: es muy soluble en agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, dimetilformamida; soluble en éter, benceno, cloroformo; menos soluble en tetracloruro de carbono³²

Reactividad: ligeramente volátil con vapor, debe guardarse protegido de la luz y del aire³². Carbonizado para su descomposición emite humo irritante³³. Incompatible con bases fuertes, agentes oxidantes fuertes, agentes reductores fuertes³¹.

Pureza: HMF está disponible comercialmente con un intervalo de pureza de 95-99%³¹.

Usos: HMF es usado en la síntesis de dialdehídos, glicoles, éteres, amino alcoholes y acetales. Puede ser utilizado para producir una gran variedad de productos tales como polímeros, surfactantes, solventes, medicamentos y plaguicidas³⁴.

Exposición en humanos. Los humanos están potencialmente expuestos al HMF a través de preparaciones farmacéuticas, humo del cigarro y por el consumo de algunos alimentos y bebidas³⁵.

Ocurrencia: HMF ha sido identificado en miel abeja, jugos de frutas, cerveza, brandy, leche, cereal, y café. El HMF es un compuesto intermediario que se produce partiendo de una secuencia de reacciones no enzimáticas (reacción de Maillard) durante el tratamiento calórico de alimentos que contienen azúcares reductores y aminoácidos³⁶.

Regulación: No se han encontrado límites HMF de exposición ocupacional recomendados por organismos internacionales de salud.

Evidencias de posible actividad carcinogénica.

Datos en humanos: no existen estudios asociados con el riesgo de cáncer en humanos. El HMF es considerado únicamente como irritante en ojos, tracto respiratorio, piel y membranas mucosas; la exposición humana puede ocurrir por inhalación, ingestión o absorción por la piel³¹.

Datos en animales: puede actuar como iniciador y promotor del cáncer de colon en ratas pero sólo a dosis elevadas.

2.7. MONOGRAFÍA DE LA QUÍMICA DEL HMF.³⁷

El interés científico por el HMF comenzó en la última década del siglo XIX, que en ese entonces se llamaba "oximetilfurfural". En 1895 se publicaron métodos de síntesis y de reacciones químicas del HMF. Middendorp⁴⁵, en el año de 1919, presentó estudios detallados relacionados con las propiedades físicas y químicas del HMF. Al mismo tiempo otros investigadores lograron grandes progresos relacionados con la síntesis y el conocimiento del mecanismo de formación. Desde entonces se han publicado más de 1000 artículos, lo que demuestra su gran importancia, así como la de sus derivados.

Se han publicado varias revisiones, las más importantes en 1951, 1971 y 2001 en las que se describen métodos de preparación, aplicación industrial y más recientemente de la formación de polímeros.

Aspectos de la síntesis de HMF.

La síntesis de HMF está basada en la triple deshidratación de hexosas, por lo que diferentes sustratos pueden emplearse, como por ejemplo: hexosas, oligosacáridos y polisacáridos provenientes de desechos industriales. La deshidratación por catálisis ácida conduce, aparte de la formación de HMF, a varios productos secundarios.

En el terreno industrial la síntesis del HMF es muy compleja, ya que incluye una serie de reacciones colaterales que influyen fuertemente en el rendimiento. La descomposición a ácido levulínico y la polimerización a ácido húmico son los factores más importantes que disminuyen la producción de HMF (figura 6).

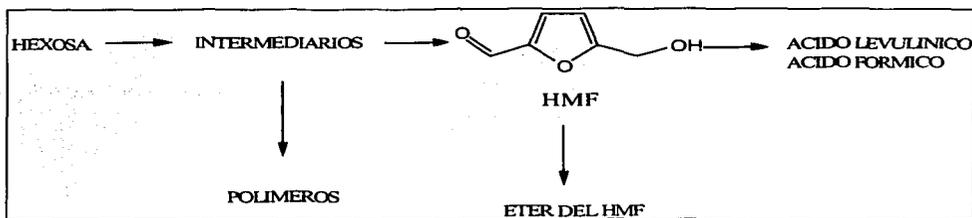


Fig. 6.

Mecanismo de la deshidratación de hexosas.

La deshidratación de hexosas (en especial fructosa y glucosa) sigue una de dos vías posibles. El primer camino (a) incluye la transformación a un sistema de anillos, mientras que el camino (b) está basado en compuestos acíclicos.

Se ha comprobado experimentalmente que el mecanismo de formación del HMF va a través de intermediarios cíclicos (figura 7). De esto, las evidencias más significativas son:

- a.- La fácil formación de HMF a partir de fructosa o de una fructosa que se origina de la sacarosa.
- b.- La 2,5-anhidro-D-manosa es un precursor para formar el enol (2), que se convertirá más fácilmente en HMF (1).
- c.- Cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de D_2O partiendo de fructosa, el deuterio no se encuentra presente en el HMF. El 3-desoxiglicosulosa (3) que se forma en el curso de la reacción debería formar un enlace carbono-deuterio debido a la tautomerización ceto-enólica, lo que no ocurre.

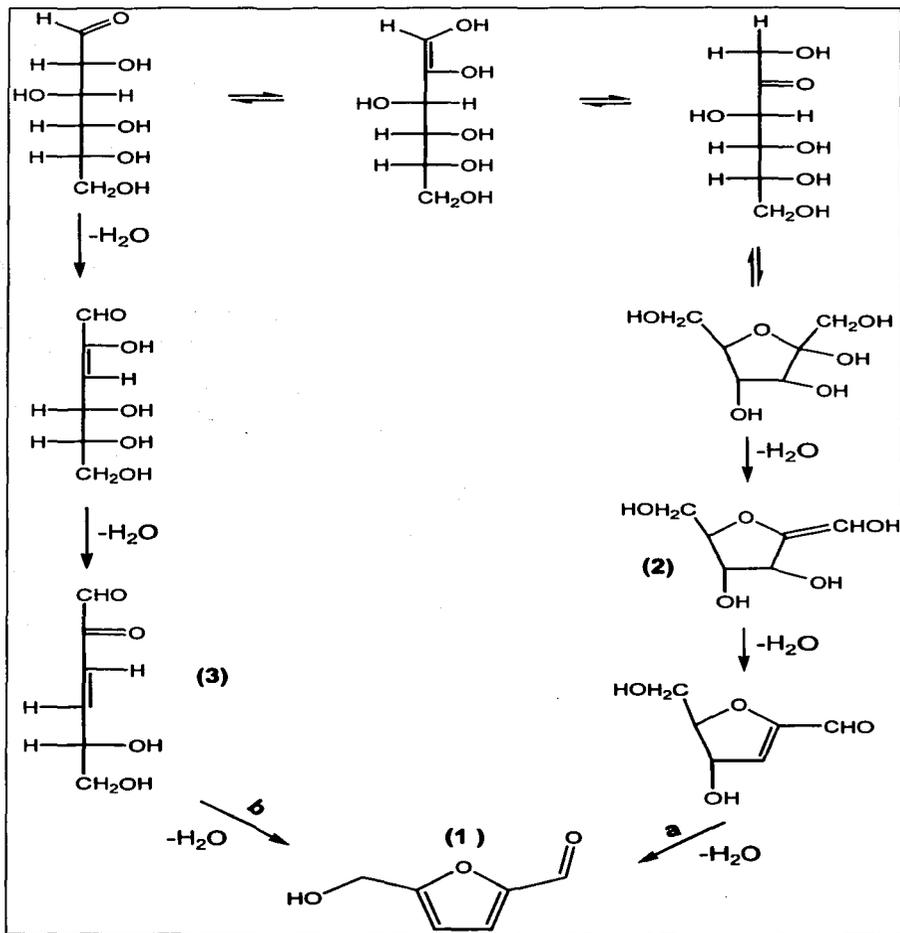


Fig. 7.

Cinética de la síntesis del HMF.

Todos los métodos descritos de la síntesis de HMF, requieren la utilización de la deshidratación térmica de hexosas en medio ácido. Estas condiciones causan algunas dificultades en el aislamiento de HMF ya que es muy activo e inestable.

Los factores que determinan el porcentaje de formación de HMF son:

- a.- el tipo de sustrato y el grado de hidrólisis.
- b.- el tipo y la concentración del catalizador.
- c.- el tiempo y la temperatura de reacción.
- d.- el porcentaje de polimerización.
- e.- el tipo de solvente empleado y la estabilidad del HMF.

La síntesis es más eficiente y más selectiva a partir de cetohexosas que de aldohexosa. Por ejemplo la hidrólisis de la sacarosa es más rápida que la deshidratación por lo que una parte de la glucosa está siempre presente en la serie de reacciones posteriores. Esto es ocasionado por la gran estabilidad en la estructura de la glucosa la cual se enoliza en un grado muy bajo y la enolización es un factor determinante en la formación de HMF a partir de glucosa. Por otra parte la glucosa puede condensarse para formar oligosacáridos los que pueden reaccionar con intermediarios o con el mismo HMF; sin embargo, la glucosa es más utilizada en la industria para la preparación de HMF porque su precio es más bajo que el de la fructosa.

La deshidratación de hexosas es catalizada por ácidos próticos y ácidos de Lewis.

Las primeras síntesis de HMF fueron catalizadas por ácido oxálico.

Por ultimo, la eficacia de la deshidratación está influenciada por el tipo de solvente y las condiciones de temperatura.

Conversión química del HMF (se menciona como ejemplo un producto).

A.- Reacciones de grupo hidroximetil

- Formación de ésteres
5-acetoximetilfurfural
- Formación de éteres
5,5'-diformilfurfuril éter
- Formación de aldehidos
5-clorometilfurfural
- Oxidación
2,5-furandicarbaldehido

B.- Reacciones del grupo formil

- Reducción
2,5-di-(hidroximetil) furano
- Reacciones de condensación
5-hidroximetilfurfurilideno-di-urea
- Oxidación
ácido 5-hidroximetil-2-furancarboxílico

C.- Reacciones del anillo de furano

2,5-di-(hidroximetil)tetrahidrofurano

D.- Polimerización de HMF

E.- Conversión electroquímica del HMF.

2,5-dimetoxi-2-dimetoximetil-5- hidroximetil-2,5-dihidrofurano

En general, la química del HMF está ampliamente documentada y desarrollada; sin embargo, en lo que respecta a la parte electroquímica son pocos los estudios realizados y se enfocan exclusivamente a la oxidación electroquímica. Kawana³⁸ realizó la electrólisis del HMF con un electrodo de platino como ánodo, metanol como disolvente y perclorato de litio como electrolito soporte; la electrooxidación produce malonato de metilo.

El-Hajj³⁹ efectuó la electrólisis con ánodo de platino en solución metanólica de perclorato de tetrabutil amonio; la oxidación electroquímica resulta en seis productos diferentes en los que predomina el 2,5-dimetoxi-2-dimetoximetil-5-hidroximetil-2,5-dihidrofurano con un rendimiento del 11 %. Cottier⁴⁰ y sus colaboradores realizaron la electrólisis en diferentes medios obteniendo un diácido y un dialdehído.

Sobre la base de estos trabajos se esperaría que la oxidación electroquímica del HMF dé origen a varias señales en el voltamperograma (originadas por los compuestos formados). Por otra parte es importante mencionar que no existen referencias bibliográficas en cuanto a la reducción electroquímica del HMF por lo que se tomara como modelo a la reducción química, que se lleva a cabo en el grupo formil o en las dobles ligaduras.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

**Gloria llamaba a la pena,
cárcel a la libertad,
miel dulce al amargo acíbar,
principio al fin, bien al mal.**

Luis de Góngora



LAS GEÓRGICAS DE VIRGILIO
Escrito entre los años 36-29 a.C.
Ilustración de un manuscrito del siglo XV

37-A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con base en la investigación bibliográfica realizada, se comprende que la apicultura en México es una actividad económica de gran importancia y por ello es necesario disponer de un control técnico-científico que permita asegurar la calidad del producto y que respalde tanto a productores como a consumidores.

Por un lado, los grandes comercializadores de miel cuentan con laboratorios químicos de control con equipos relativamente caros, que no son accesibles para los pequeños apicultores y por otro lado, los métodos de análisis empleados resultan por lo común en gran medida laboriosos y relativamente complicados.

En la determinación de los componentes de la miel, la del HMF y de la diastasa son los criterios fundamentales para la calidad de la miel. La producción de HMF (que conlleva una disminución en la actividad de la diastasa), se debe a la degradación de los azúcares principales por efecto del manejo y envejecimiento de la miel, independientemente del origen de la miel, de aquí que la determinación del contenido de HMF revista una importancia capital para su comercialización.

Como se mencionó antes, los métodos propuestos actualmente implican la producción de derivados del HMF, es decir, como no son directos conllevan mayores costos y mayores posibilidades de error. En particular, debe mencionarse que el método de Winkler, propuesto en 1955 y aceptado internacionalmente, depende de la cinética y no indica parámetros analíticos de control; este método no ha sido actualizado.

Estas consideraciones justifican ampliamente la búsqueda de otros métodos para la determinación del HMF y de ser posible, que sean directos y más sencillos que los actuales.

La búsqueda de bajos límites de detección y mayor precisión en las determinaciones nos lleva a plantear el estudio electroquímico del HMF.

Al considerar la estructura del HMF y la investigación bibliografía realizada es de esperarse que las reacciones redox (químicas o electroquímicas) puedan ser utilizadas para su determinación directa.

La oxidación electroquímica produce una serie de compuestos que generan también la aparición de varias señales en la zona de oxidación, complicando así la cuantificación del HMF.

Por otra parte, no existen informes sobre la reducción electroquímica del HMF; sin embargo, si se toma en cuenta que la reducción química se realiza en el grupo formil o en la doble ligadura del anillo (figura 8)⁴¹⁻⁴²⁻⁴³⁻⁴⁴, podemos suponer que la reducción electroquímica se efectúa más fácilmente en el formilo que en las dobles ligadura, originando una señal específica en la zona de reducción al formar el compuesto "1" [2,5-di-(hidroximetil) furano].

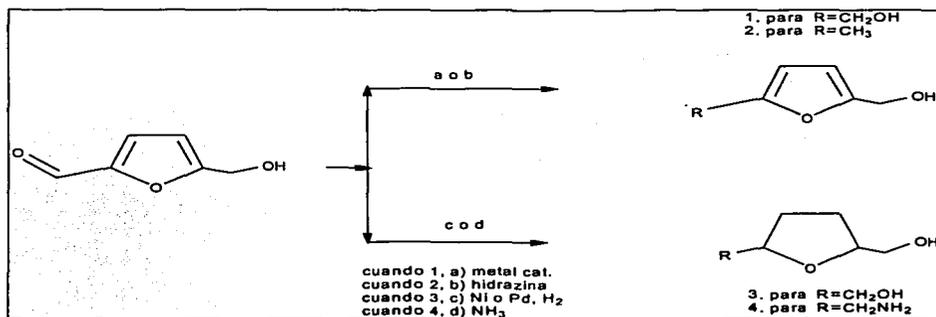


Fig. 8. Reducción química del HMF

3.1. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un método electroquímico para determinar HMF en miel de abeja, con el mínimo tratamiento de la muestra.

Objetivo específico.

- Estudiar el comportamiento electroquímico del HMF.
- Establecer las condiciones experimentales para la determinación del HMF por técnicas electroquímicas.
- Determinar el HMF en miel de abeja

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

**Sabe la muerte a tierra,
la angustia a hiel.
Este morir a gotas
me sabe a miel.**

José Gorostiza



UNA VIEJA GRANJA DE ABEJAS, 1900.

Óleo sobre tela.

Clara Southern, Australia (1860-1940)
Galería Nacional de Victoria, Melbourne

41-A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1. MATERIAL.

Reactivos

Acetato de amonio	R.A.	T. Química
Ácido acético	R.A.	Merck
Ácido clorhídrico	R.A.	J.T. Baker
Ácido fosfórico	R.A.	J.T. Baker
Amoníaco.	R.A.	Merck
DMSO	Q.P.	J.T. Baker
Hidróxido de potasio	R.A.	J.T. Baker
Hidróxido de litio	R.A.	Merck
HMF	Q.P.	Sigma
Nitrógeno de alta pureza	99.9%	Praxair
Perclorato de litio trihidratado	R.A.	Aldrich
Perclorato de litio anhidro	R.A.	J.T. Baker
Nitrato de potasio	R.A.	J.T. Baker
Solución Buffer pH 4 (citrato/ácido clorhídrico)	R.A.	Merck
Solución buffer pH 10 (ácido bórico / cloruro de potasio-hidróxido de sodio)	R.A.	Merck
Agua destilada		

Muestras de miel:

Muestra 1: recolectada en la zona lacustre de Zirahuén, Michoacán. Otoño 2002

Muestra 2: recolectada en la zona lacustre de Zirahuén, Michoacán. Otoño 2001

Muestra 3: miel de Aguascalientes (1999).

Equipo

- Balanza analítica Mettler AE240
- pHmetro Tacussel Beckman Century SS-1
- Potencióstato Tacussel tipo PRG5
- Graficador Yokohama tipo 3036-Y-Recorder
- Milivoltímetro Tacussel Electronic tipo S6N
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl/KCl(aq) Tacussel 3M
- Electrodo auxiliar: Platino
- Electrodo de trabajo: a)- electrodo de gota de mercurio
b)- electrodo giratorio de grafito
- Agitador magnético con barra
- Refractómetro RHB-90
- Conductímetro Metrohm 664

Material de uso común en el laboratorio

Vasos de precipitado, vidrios de reloj, matraces volumétricos, pipetas, micropipeta, espátula, celda electroquímica, soportes, anillos, pinzas, etc.

4.2. RESUMEN DE LA METODOLOGÍA

Sobre la base de la electroquímica analítica se determinó la concentración de HMF en tres muestras de miel.

Se empleó como referencia una solución patrón de HMF 1×10^{-2} M. El HMF y la miel de abeja son muy solubles en agua, por lo que se utilizó este disolvente en la preparación del patrón, del electrolito soporte y de las muestras.

Montaje del equipo. Para trazar las curvas de intensidad contra potencial se montó el sistema con tres electrodos representado en la figura 9.

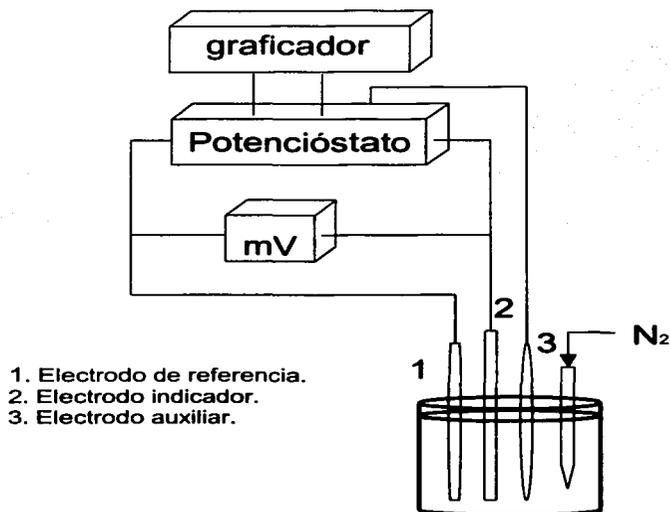


Fig. 9.

En la celda se colocó una cantidad conocida del electrolito soporte y se eliminó el oxígeno disuelto al burbujear nitrógeno durante 15 minutos. El nitrógeno se mantuvo sobre la solución durante las determinaciones para obtener una atmósfera libre de oxígeno y evitar que se disolviera nuevamente en el electrolito soporte. A la curva obtenida se le conoce como voltamperograma y de forma particular como polarograma si se utiliza el electrodo de gota de mercurio (EGM).

Trazado de los voltamperogramas. Se trazó primero la curva residual, originada por el electrolito soporte. Luego se trazaron las curvas correspondientes para cada adición del patrón. De las adiciones se obtuvieron las gráficas de intensidad en función de la concentración de HMF usadas para determinar el dominio de electroactividad, el límite de detección y la linealidad.

Para calcular la concentración de HMF en la miel se recurrió al método de adiciones patrón.

El trabajo experimental se dividió en tres partes:

1ª.- ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL HMF.

a.- Influencia del tipo de electrodo. Para encontrar las condiciones voltamperométricas óptimas se trabajó con el electrodo sólido de grafito y con el electrodo de gota de mercurio (EGM)

b.- Determinación del dominio de electroactividad. Con la finalidad de ampliar el dominio de electroactividad en la zona de reducción y poder observar mejor la señal de reducción del HMF se usó el EGM.

c.- Determinación del límite de detección y de la linealidad . Se determinó el límite de detección y se verificó que existiera una relación lineal entre la intensidad de corriente y la concentración del HMF.

d.- Estudio termodinámico. Con los datos obtenidos por polarografía clásica, se trazó la gráfica de la ecuación: $E = E_{1/2} + (0.058/n) * \log (i-i_{ox}/i)$ que es de la forma $y = mx+b$, con el fin de verificar si el proceso cumple con la ecuación de Nerst y si es de manera ideal o no.

2ª.- DETERMINACIÓN DEL HMF EN LAS MUESTRAS DE MIEL

a.- Sistema miel-electrolito soporte. Al electrolito soporte se le adicionó una cantidad conocida de la muestra de miel y se hicieron adiciones sucesivas del patrón para analizar el comportamiento de los polarogramas.

b.-Determinación de la concentración de HMF en las muestras de miel. De las gráficas y los datos de intensidad en función de la cantidad agregada de HMF (método de adiciones patrón), se calculó la concentración de HMF y el intervalo de confianza.

3ª.- ESTUDIOS ADICIONALES PARA LA MIEL

a.- Determinaciones fisicoquímicas. Se midió el pH, el contenido de humedad, el contenido de azúcares totales y la conductividad específica (a partir de la conductividad se determinó el porcentaje de cenizas).

b.- Estudio palinológico. Realizado en el Instituto de Geología, Laboratorio de Palinología de la UNAM, con apoyo de los profesores Enrique Martínez Hernández, Elia Ramírez Arriaga y Margarita Reyes Salas.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sólo el silencio es sabio
pero yo estoy labrando,
igual que cien abejas,
un pequeño panal con mis palabras

Rosario Castellanos



ALGUNOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA APICULTURA

47. A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1. ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL HMF

5.1.1. INFLUENCIA DEL TIPO DE ELECTRODO.

En los voltamperogramas trazados en la zona de oxidación con el electrodo de grafito no se detectaron señales reproducibles que se incrementaran de manera regular al hacer adiciones del patrón. Es posible que este comportamiento se relacione con el hecho de que haya reacciones químicas acopladas a las electroquímicas. Por tal motivo se abandonó el uso de este electrodo.

Al emplear el electrodo de gota de mercurio (EGM) se observó una señal bien definida en la zona de reducción, que se incrementó de manera regular al hacer adiciones del patrón, por lo que se tomó al EGM como electrodo de trabajo y, por consiguiente, a la polarografía como método voltamperométrico.

5.1.2. DOMINIO DE ELECTROACTIVIDAD.

Una vez establecido que el EGM fue el electrodo más adecuado para trabajar, se buscó el electrolito que presentó mayor separación entre la barrera catódica y la señal de HMF (ΔE).

En la figura 10, se representan los polarogramas obtenidos por el método de impulsos en el medio de fosfatos. La gráfica muestra la curva residual, la barrera catódica y el incremento en intensidad de la señal de HMF con cada adición del patrón.

En los demás electrolitos las señales de HMF y la barrera se presentaron a diferentes valores de potencial, con lo que se obtuvieron variaciones en ΔE .

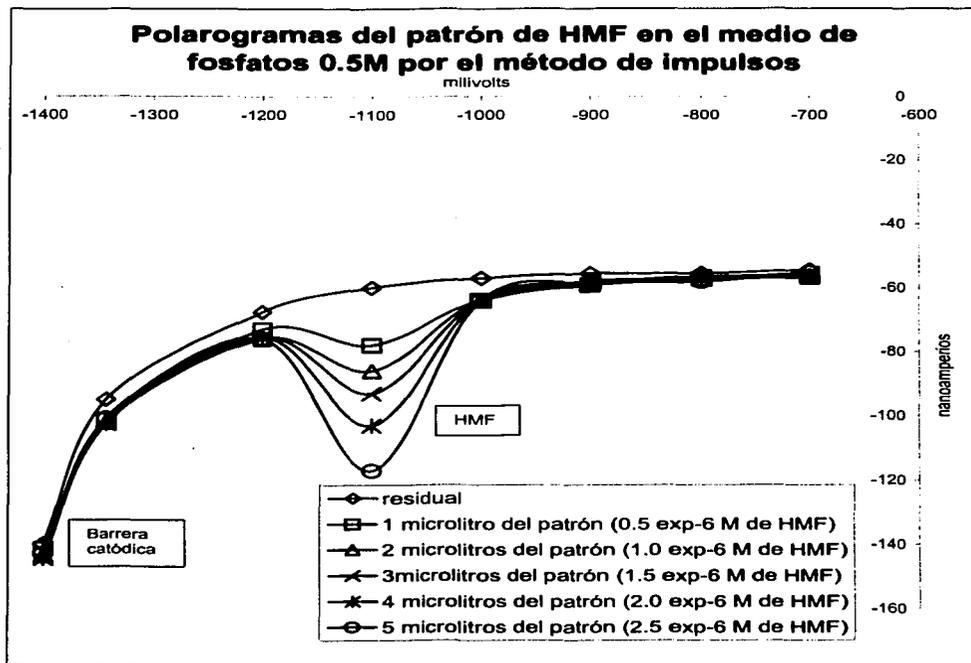


Fig.10. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:
 Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.
 Residual: 20 ml de la solución de fosfatos 0.5 M.
 Adiciones sucesivas de 1 μL del patrón; la concentración final del patrón esta indicada en Molaridad de HMF

Con base en polarogramas se obtuvieron los resultados de la tabla 3, donde se establece que los electrolitos con el mayor ΔE fueron en el siguiente orden: fosfatos con ΔE= 300 mV, boratos, LiClO₄ y acetatos con ΔE = 250 mV.

Los restantes electrolitos presentaron un $\Delta E \leq 200$ mV por lo que resulta difícil distinguir la señal de HMF.

TABLA 3. Potencial de la barrera catódica usando los electrodos de {(Ag / AgCl / KCl_{aq} 3M) / EGM / Pt} por polarografía de impulsos en distintos medios				
Electrolito Soporte 0.5M	pH	Barrera catódica (mV).	Señal de HMF (mV)	ΔE (mV)
Fosfatos	7.1	-1400	-1100	300
Boratos	9.1	-1450	-1200	250
Perclorato de litio	6.5	-1300	-1050	250
Acetatos	4.9	-1300	-1050	250
Hidróxido de litio	12.1	-1600	-1400	200
Amoniaco	9.6	-1150	-1000	150
Nitrato de potasio	7.4	-1400	-1300	100
Citratos	4.2	-1000	Sin señal	-

La mayor distancia entre la barrera catódica y la señal de HMF (ΔE) permitió definir mejor la señal, por lo que fue más fácil distinguir y medir el incremento en la intensidad de la corriente. Así que para obtener el límite de detección del método se trabajó con los electrolitos que presentaron mayor ΔE entre la barrera catódica y la señal de HMF.

Debido a que los medios de boratos, perclorato de litio y acetatos presentaron idénticos ΔE , se tomó en cuenta el valor más negativo de la barrera catódica para obtener un dominio de electroactividad más amplio. Sin embargo, los medios que presentaron valores más negativos de la barrera catódica no necesariamente tuvieron mayor ΔE porque la señal de HMF también se recorrió.

5.1.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Para determinar el límite de detección de cada electrolito se hicieron adiciones del patrón y se trazaron los polarogramas por el método de impulsos en cada uno de los medios. De los polarogramas se obtuvo la curva de intensidad como función de la concentración. En el anexo C se ejemplifica la forma de calcular los valores de la tabla 4.

Se puede notar que el medio de boratos y el de fosfatos presentan buen límite de detección y aceptable linealidad. En cuanto al medio de acetatos y al de perclorato de litio, presentaron límites de detección y linealidad aceptables.

ELECTROLITO SOPORTE	LÍMITE DE DETECCIÓN	LINEALIDAD
BORATOS	0.048 ppm	0.9982
FOSFATOS	0.050 ppm	0.9898
LiClO₄	0.160 ppm	0.9993
ACETATOS	0.390 ppm	0.9887

Con base en los resultados de la tabla anterior se consideró que los cuatro medios son adecuados para hacer las determinaciones de HMF.

También se comparó el límite de detección y la linealidad entre el método clásico y el de impulsos. En la tabla 5, se presentan los resultados experimentales que confirmaron que la polarografía de impulsos tiene mejor límite de detección y mejor linealidad que la polarografía clásica. En la figura 11, se muestran los polarogramas obtenidos por el método clásico en el medio de boratos.

TABLA 5. Comparación entre el límite de detección del HMF por polarografía de impulsos y polarografía clásica en el medio de boratos

Polarografía	LÍMITE DE DETECCIÓN	LINEALIDAD (r)
Impulsos	0.048ppm	0.998264
Clásica	6.80 ppm	0.993494

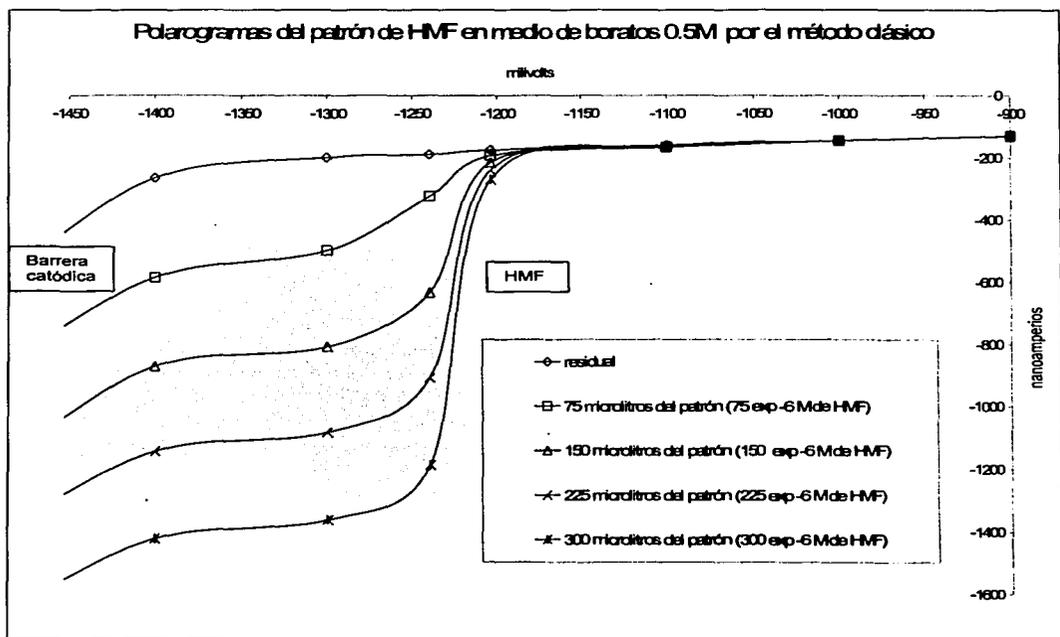


Fig.11 Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs^{-1} , tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M.

Adiciones sucesivas de 75 μL del patrón; la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

5.1.4. ESTUDIO TERMODINÁMICO.

La ecuación del voltamperograma: $E = E_{1/2} + (0.058/n) \cdot \log (i-i_{ox}/-i)$ tiene un valor de ordenada al origen que corresponde al potencial de media onda (es decir, prácticamente al potencial normal condicional del sistema) y el de la pendiente, $m = 0.058/n$, permite determinar el número de electrones (n) intercambiados en el proceso (ver anexo B).

En el caso de sistemas que se alejan del comportamiento ideal termodinámico (comportamiento nernstiano), la ecuación indica el valor de la ordenada al origen ($E_{1/2}$) correspondiente al valor del potencial normal condicional afectado por la sobretensión. El valor de la pendiente corresponde a $m = 0.058/\alpha n$ donde α es un parámetro cinético que varía entre 0 y 1.

Para el HMF en el medio de boratos al representar gráficamente $\log (i-i_{ox}/-i)$ contra E (ver el anexo B) se obtuvo la ecuación: $y = 44.2x - 1240$. Lo que indica que $E_{1/2} = -1240 \text{ mV/ECS}$ para el sistema $\text{HMF} \rightarrow \text{HMF}_{\text{reducido}}$

Del valor de la pendiente se deduce que se intercambian al menos 2 electrones (pendiente menor a 58 mV) y si se considera que la reacción química indica que $n=2$, se tiene que como $\alpha n = 1.30$ entonces $\alpha = 0.65$

Este valor de α no se aleja mucho del valor medio de 0.50 para sistemas cercanos al comportamiento nernstiano.

Es posible, por tanto, considerar al sistema $\text{HMF} \rightarrow \text{HMF}_{\text{reducido}}$ como quasi-nernstiano aún cuando para afirmarlo categóricamente sea necesario realizar más estudios de la cinética electroquímica, lo que sale de las metas de este trabajo.

5.2. DETERMINACIÓN DE HMF EN LAS MUESTRAS DE MIEL

5.2.1. SISTEMA MIEL-ELECTROLITO SOPORTE.

De acuerdo con los resultados del apartado 5.1, se consideraron como adecuados para la determinación de HMF los medios de boratos, fosfatos, perclorato de litio y acetatos en ese orden. Sin embargo, la adición de miel a los electrolitos ocasionó modificación en los polarogramas.

La muestra 1 de miel originó una segunda señal en los cuatro electrolitos como se muestra en la tabla 6. Los polarogramas se obtuvieron por el método de adiciones patrón.

Electrolito Soporte	Barrera Catódica	Señal de HMF mV	2ª señal mV
Boratos	-1200	-1100	-900
Fosfatos	-1200	-1100	-1000
Acetatos	-1150	-1050	-950
Perclorato de litio	-1100	-1000	-900

Polarogramas de la muestra 1 de miel en los diferentes medios (boratos, perclorato, fosfato y acetatos).

El medio de boratos presentó el mayor $\Delta E_{\text{HMF}/2^{\text{a}} \text{señal}}$ para las dos señales, mientras que los medios de fosfatos, acetatos y perclorato de litio dieron un $\Delta E_{\text{HMF}/2^{\text{a}} \text{señal}}$ más bajo ocasionando problemas para distinguir y medir la señal de HMF. La tabla 7, muestra el $\Delta E_{\text{HMF}/2^{\text{a}} \text{señal}}$ entre ambas señales.

Tabla 7. $\Delta E_{\text{HMF}/2^{\text{a}} \text{señal}}$ en cada electrolito	
Electrolito soporte	$\Delta E_{\text{HMF}/2^{\text{a}} \text{señal}}$ mV
Boratos	200
Fosfatos	100
Acetatos	100
Perclorato de litio	100

En el medio de boratos se detectaron dos señales bien definidas (figura 12), una de éstas corresponde al HMF y la otra a algún componente de la miel, al adicionar el patrón se logró mayor distinción entre ambas.

Como se muestra en los polarogramas de las figuras 13, 14 y 15, la presencia de la segunda señal dificulta la definición de las dos señales por estar muy cercanas.

En medio de perclorato de litio (figura 13), al adicionar el patrón se logró mejorar la resolución del HMF en la muestra de miel.

En el medio de fosfatos (figura 14) fue más complicado distinguir ambas señales y sólo al adicionar el patrón se logró diferenciarlas.

La figura 15 muestra que en el medio de acetatos ambas señales se definen mejor pero sin mantenerse separadas.

Pueden ocasionarse errores al determinar la concentración de HMF si las dos señales tienen un $\Delta E_{\text{HMF}/2^{\text{a}} \text{señal}}$ relativamente bajo como en el caso de los medios de fosfatos, acetatos y perclorato.

Polarogramas de la muestra 1 de miel en medio de boratos con adiciones del patrón de HMF

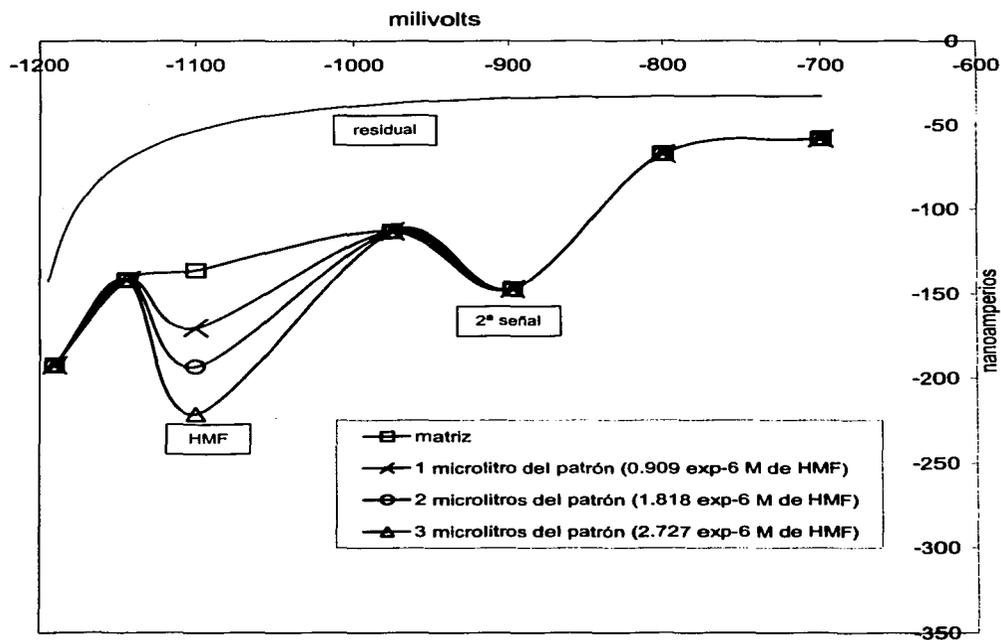


Fig.12. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10 ml de la solución de boratos 0.5M

Matriz: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M más 1 ml de disolución de la muestra (0.9960 g de miel)

Adiciones sucesivas de 1 µL; la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

Polarogramas de la muestra 1 de miel en medio de perclorato de litio con adiciones del patrón de HMF

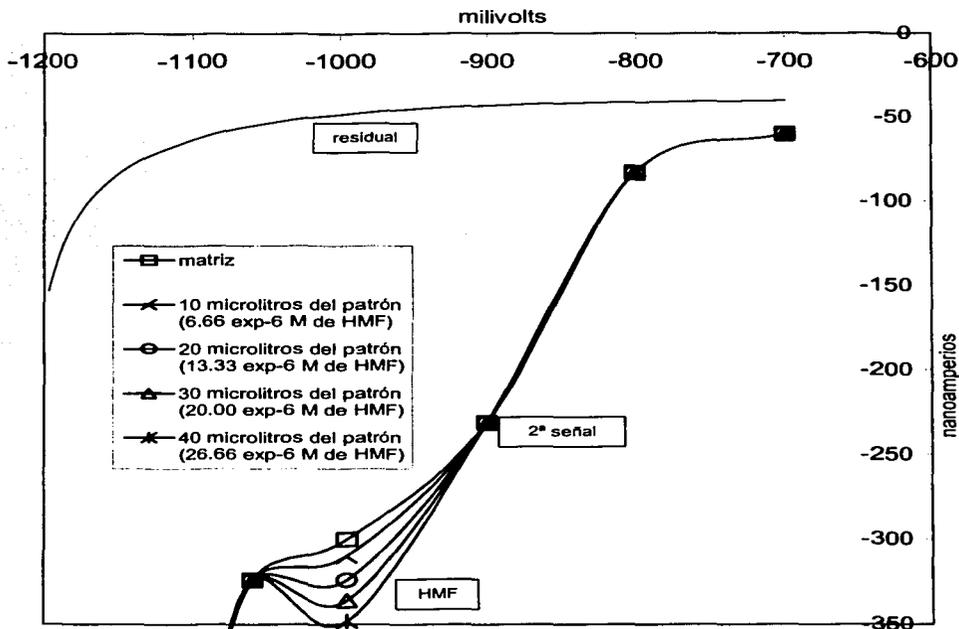


Fig.13. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 5 ml de la solución de perclorato de litio

Matriz: 5 ml de la solución de perclorato de litio 0.5 M más 10 ml de la disolución de la muestra (15.05 g de miel)

Adiciones sucesivas de 10 µL; la concentración final del patrón en la celda está indicada en Molaridad de HMF

Polarogramas de la muestra1 de miel en el medio de fosfatos con adiciones del patrón de HMF

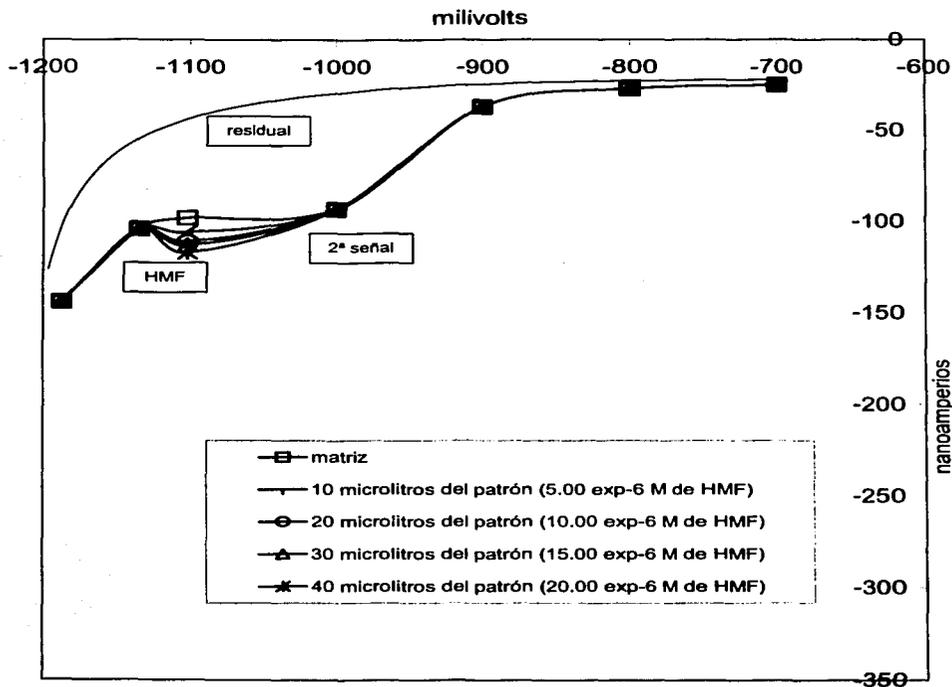


Fig.14. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10ml de la solución de fosfatos

Matriz: 10 ml de la solución de fosfatos 0.5 M más 10 ml de la disolución de la muestra (20.00 g de miel)

Adiciones sucesivas de 10 µL; la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

Polarogramas de la muestra 1 de miel en medio de acetatos con adiciones del patrón de HMF

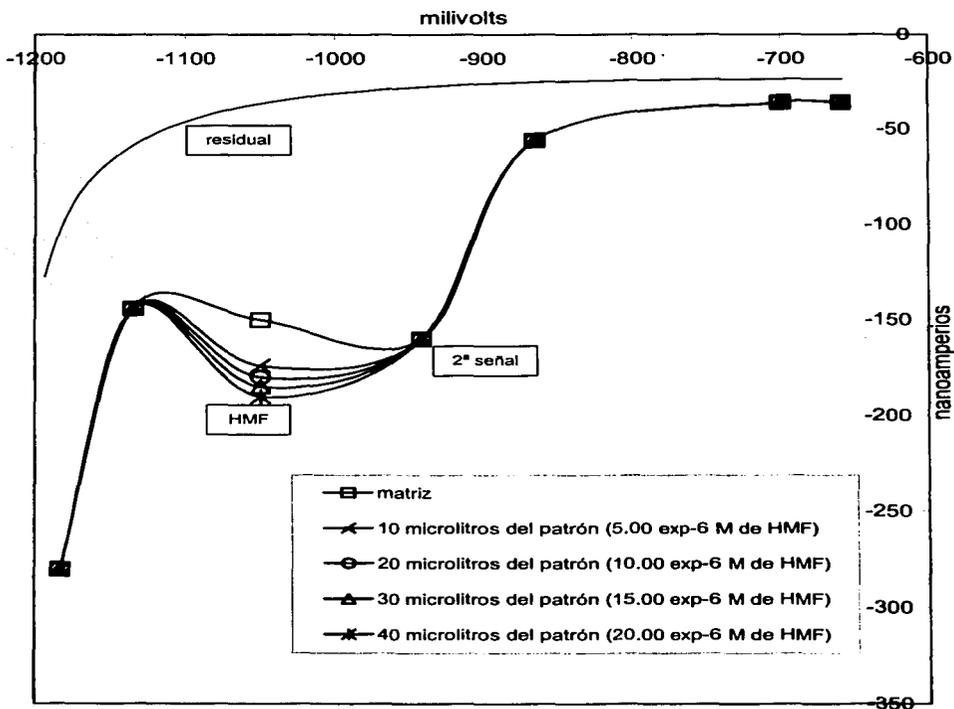


Fig.15. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10 ml de la solución de acetatos 0.5 M

Matriz: 10 ml de la solución de acetatos 0.5 M, más 10 ml de la disolución de la muestra (20.00 g de miel)

Adiciones sucesivas de 10 µL; la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

Polarogramas de las muestras 1, 2 y 3 de miel en el medio de boratos

Al trazar los polarogramas de la muestra número 1 en los diferentes medios confirmamos que el medio de boratos es el más adecuado para hacer las determinaciones del HMF en la miel ya que nos permite una mejor definición y separación de dos señales diferentes.

El polarograma de la muestra 1 (figura 16) presentó un valor de intensidad menor para el HMF de -120 nA y mayor para la segunda señal de -150 nA

En la muestra 2 el valor de intensidad para el HMF fue mayor de -190 nA y para la segunda señal fue menor de -110 nA. (figura 13)

En cuanto a la muestra 3 no apareció la segunda señal y el valor de intensidad del HMF fue de -1200 nA (figura 14).

Lo anterior parece indicar que al incrementarse la señal de HMF la otra disminuye o desaparece por completo

Si se considera que la formación del HMF se favorece por incremento en la temperatura y las enzimas diastasa e invertasa, presentes en la miel, son inestables por la misma causa⁴⁸, se puede presuponer que la segunda señal, que aparece en las muestras 1 y 2, la origina alguna de esas enzimas.

Esto deberá comprobarse experimentalmente; sin embargo, el estudio correspondiente rebasa los objetivos del presente trabajo.

En general, en los polarogramas de las muestras de miel 1, 2 y 3 en boratos se obtuvieron señales de HMF bien definidas permitiendo medir con facilidad el incremento en la intensidad de corriente.

Polarogramas de la muestra 1 de miel en medio de boratos con adiciones del patrón de HMF

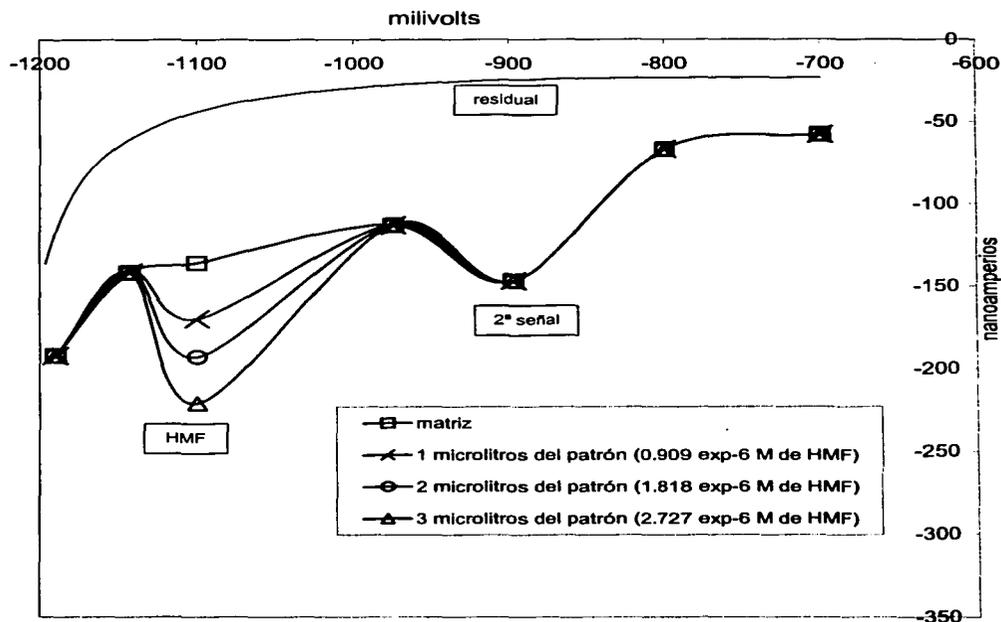


Fig.16. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M

Matriz: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M más 1 ml de disolución de la muestra (0.9960g miel)

Adiciones sucesivas de 1 µL, la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

Polarogramas de la muestra 2 de miel en el medio de boratos con adiciones del patrón de HMF

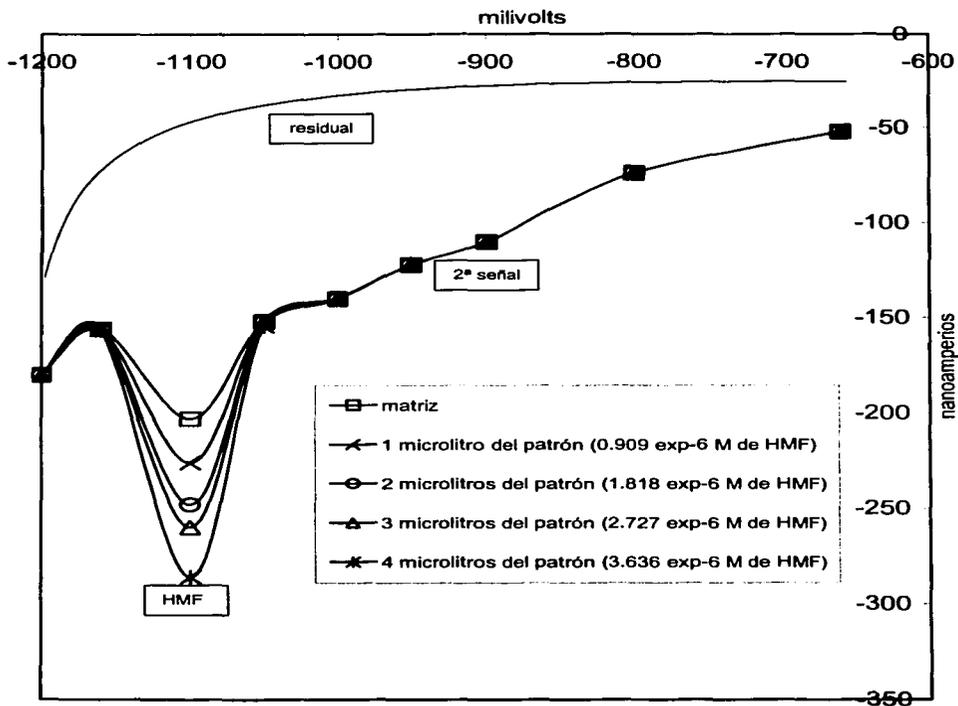


Fig.17. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs⁻¹, tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M

Matriz: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M más 1 ml de disolución de la muestra (0.9975 g de miel)

Adiciones sucesivas de 1 µL; la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

Polarogramas de la muestra 3 de miel en el medio de boratos con adiciones del patrón de HMF

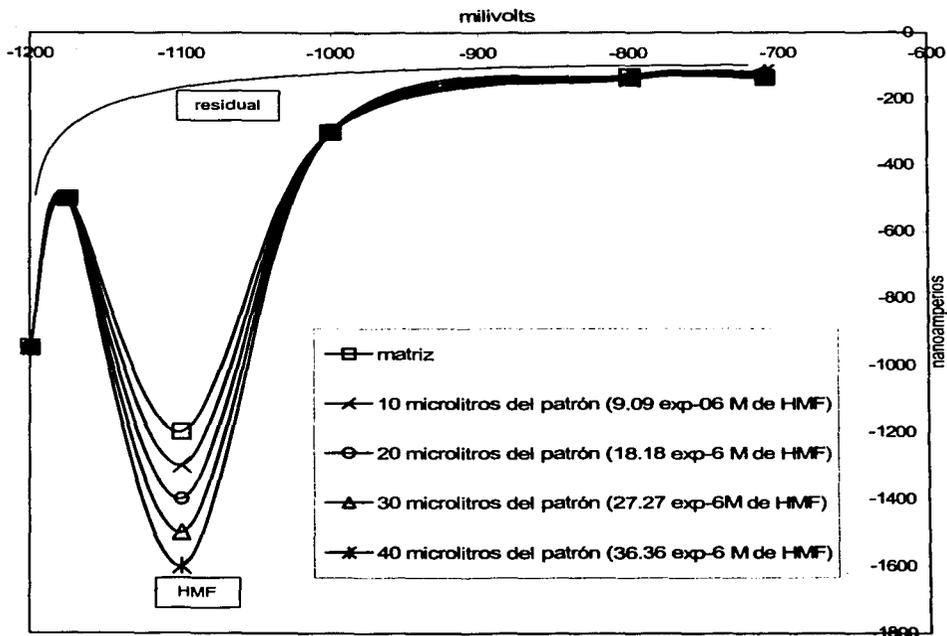


Fig.18. Polarogramas trazados en las siguientes condiciones:

Impulso: 100 mV, altura de la columna: 75 cm, velocidad de barrido: 2 mVs^{-1} , tiempo de goteo: 1.5 seg.

Residual: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M

Matriz: 10 ml de la solución de boratos 0.5 M más 1 ml de disolución de la muestra (0.9970g de miel)

Adiciones sucesivas de 10 μL ; la concentración final del patrón está indicada en Molaridad de HMF

5.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HMF EN LA MIEL.

Con base en los polarogramas obtenidos en el medio de boratos (figuras 16, 17 y 18) se determinó la concentración del HMF en las tres muestras de miel.

En el anexo D se ejemplifica el cálculo para obtener la concentración y el intervalo de confianza.

Los resultados se presentan a continuación:

Tabla 7. Concentración de HMF en las muestras de miel			
	Muestra 1 (ppm)	Muestra 2 (ppm)	Muestra 3 (ppm)
Boratos	1.32 ± 0.88	3.20 ± 1.22	119 ± 7.55

En la muestra 1 el intervalo de confianza corresponde al 68 % de la concentración de HMF, que es un porcentaje relativamente alto que se explica porque existe una mayor desviación de los datos experimentales al determinar cantidades pequeñas. El intervalo de confianza de la muestra 2 corresponde al 38% de la concentración lo que confirma que al aumentar el contenido de HMF disminuye la incertidumbre de las mediciones.

La muestra 3 presenta el mejor intervalo de confianza con el 6.3% de la concentración de HMF lo que indica que al determinar cantidades altas de HMF existe menor desviación de los datos experimentales.

Este comportamiento es derivado de la menor o mayor incertidumbre al medir corrientes altas o bajas respectivamente.

5.3. ESTUDIOS ADICIONALES PARA LA MIEL.

5.3.1. DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS.

Se realizaron estudios complementarios en las tres muestras de miel para comprobar que es factible llevarlos a cabo de una manera más rápida y sencilla que por los métodos actualmente especificados en la norma.

El pH se midió directamente con el pHmetro, sin hacer ningún tratamiento a las muestras.

El contenido de humedad y de azúcares totales se determinó con el refractómetro de manera directa al colocar las muestras sobre el prisma y realizar las lecturas. Sin embargo, es necesario mencionar que no se determinan azúcares específicos por este método.

El contenido de cenizas se obtuvo al medir la conductividad específica de disoluciones de miel (ver anexo E)

Las tres muestras cumplieron con las normas de contenido de humedad, de cenizas y de acidez.

TABLA 8	pH	% de Humedad	Azúcares totales %	Conductividad específica mS*cm ⁻¹	% de Cenizas
Muestra1	3.27	21.1	77.5	0.737	0.343
Muestra2	3.29	14.0	84.5	0.530	0.224
Muestra3	3.76	15.4	79.0	0.389	0.143

Para validar estos resultados sería necesario obtener estos parámetros por los métodos tradicionales y compararlos.

5.3.2. ESTUDIO PALINOLÓGICO

Los resultados del estudio palinológico realizados a la muestra 1 (con menor contenido de HMF) se muestran a continuación:

compuestas: 64 %

otras especies 36 %

El 64 % de las compuestas está conformado de la siguiente manera:

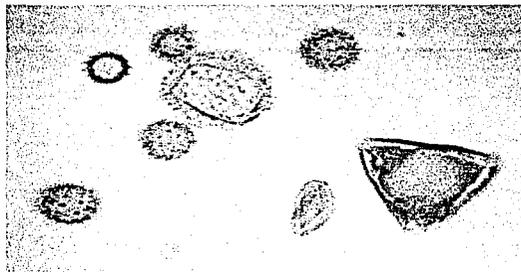
Compuestas tipo B , con diámetro de polen de 36-40 μ m: 44 %

Compuestas tipo A , con diámetro de polen de 20-26 μ m: 13.3 %

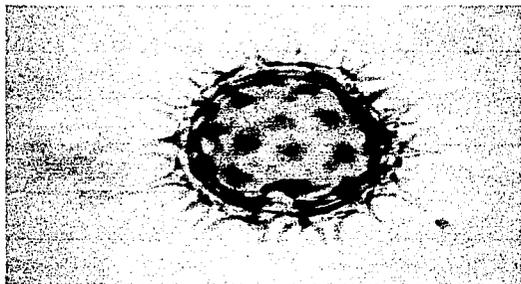
Compuestas tipo C, con diámetro de polen de 48-50 μ m: 6.4 %

El 44 % del polen dominante pertenece a margaritas, por lo tanto la muestra 1 es una miel monofloral de margaritas.

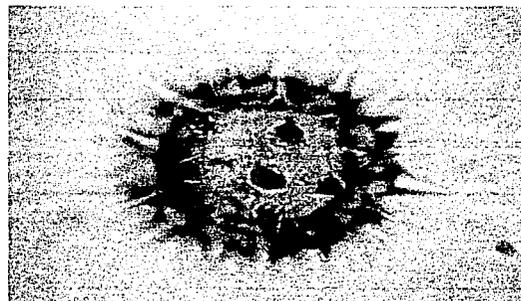
En la lámina siguiente se muestran las fotografías de los granos de polen obtenidas con el microscopio óptico e iluminados con luz normal y con contraste de fases. Las fotografías se confrontaron con las que se encuentran en el atlas palinológico y que corresponden a la región de Michoacán.



Vista general.



Compuesta B. Vista polar.

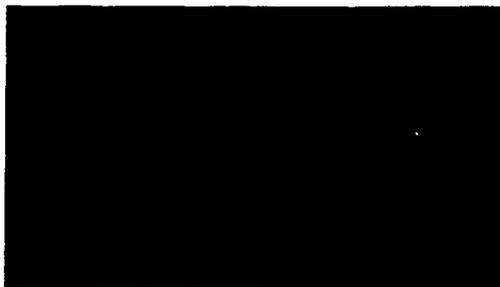


Compuesta B. Microscopio supraóptico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Compuesta tipo A; microscopio supraóptico con contraste de luz



Compuesta A. Vista normal



Chayote. Vista polar.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

**He bajado para librarte de las manos de los egipcios
y subirte de esa tierra a una tierra fértil y espaciosa,
una tierra que mana leche y miel.**

Éxodo, 3,5.

- El 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (HMF) puede cuantificarse en agua con diferentes sales usadas como electrolito soporte; se encontraron así las condiciones que permitieron tener una relación lineal directa entre la señal amperométrica y la concentración de HMF, tanto por polarografía clásica como por el método diferencial de impulsos.
- La adición de miel a los electrolitos representa una modificación al medio de reacción pues cambia tanto el dominio de electroactividad como la señal electroquímica del HMF.
- El HMF pudo determinarse sin mayor dificultad y de manera directa por polarografía de impulsos en un medio acuoso de boratos (pH 10, 0.5 M). El HMF presenta en estas condiciones un $E_{1/2} = -1240$ mV.
- En especial el excelente límite de detección (0.0474 ppm) para el medio de boratos indica que el método puede aplicarse tanto al caso de las mieles, como quizás a otro tipo de muestras.
- En las mieles con bajo contenido de HMF se encontró otra señal de reducción cuyo tamaño disminuye e incluso desaparece si el contenido de HMF aumenta, podría tratarse de una señal atribuible a alguna de las enzimas presentes en la miel (diastasa o invertasa), cuyo contenido es descrito como inverso al del HMF⁴⁷.
- El contenido de HMF permitió determinar la calidad de la miel porque las tres muestras cumplieron con los demás parámetros evaluados.
- El contenido de azúcares totales por refractometría no es específica por lo que para determinar algún azúcar en particular es necesario realizar otro

tipo análisis como la cromatografía o desarrollar un método electroquímico que lo permita.

- o En general los cinco parámetros de la tabla 7 se realizaron de manera rápida, sencilla y económica.

Tabla 9	ppm de HMF	pH	% de Humedad	% de Azúcares totales	% de Cenizas
Muestra1 (2002)	1.32	3.2	21.1	77.5	0.34
Muestra2 (2001)	3.20	3.2	14.0	84.5	0.22
Muestra3 (2003)	118.56	3.7	15.4	79.0	0.14

- o La muestra 2 (Michoacán otoño 2001) es de excelente calidad con 3.20 ppm de HMF. Mientras que la muestra 3 es una miel vieja con 118.56 ppm de HMF, por lo que no debería comercializarse para el consumo humano.
- o El estudio palinológico permitió caracterizar aún mejor la muestra 1 al determinar el origen botánico, lo que le da un valor agregado a esta miel.
- o La muestra 1 (Michoacán, otoño 2002) por ser monofloral, contener 1.32 ppm de HMF y poder conservarse almacenada aún por mucho tiempo, es una miel de muy alta calidad que debe comercializarse en las condiciones más favorables.

6.1. Perspectivas

- Se puede desarrollar un estudio más amplio sobre la segunda señal que aparece en la zona de reducción.
- Se debe hacer una comparación experimental entre el método polarográfico y el espectrofotométrico clásico, así como con HPLC.
- La determinación del contenido de cenizas puede realizarse a través de la medición de la conductividad específica pero es necesario hacer una investigación bibliográfica y experimental complementaria al respecto.
- Puede pensarse en el desarrollo de métodos electrométricos para la cuantificación de azúcares, que reemplacen al método volumétrico de Fehling, pues ambos se basan en reacciones redox.
- Otro posible desarrollo sería comprobar la ausencia de antibióticos en la miel, lo que podría realizarse por electroquímica analítica, para evitar así las pruebas microbiológicas que son más complicadas y laboriosas (además, no son específicas ya que la miel tiene por sí misma propiedades antisépticas).
- Con base en los resultados experimentales aquí presentados es posible pensar en desarrollar métodos amperométricos o potenciométricos que sean más rápidos y sencillos, que puedan ser realizados directamente en las salas apícolas de extracción y envasado.

ANEXOS

Ah Mucen Kab

Deidad del panteón de los mayas, venerado como patrono de quienes obtenían la miel de las colmenas. En ocasiones aparece desdoblado en cuatro presencias diferentes y relacionado con otras divinidades, en particular con los bacabes.



UN PANAL SILVESTRE, 2003.
Óleo sobre tela.
Daniel Juárez, México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

71-A

Anexo A.

Preparación de las muestras de miel para la determinación de HMF.

Como la miel es muy soluble en agua, se probaron diferentes diluciones de las muestras, siendo preferible, la que presentó una concentración de aproximadamente 1 g de miel /ml de agua destilada y una concentración final en la celda cercana a 0.1 g de miel / ml de electrolito soporte.

Anexo B.

Estudio termodinámico.

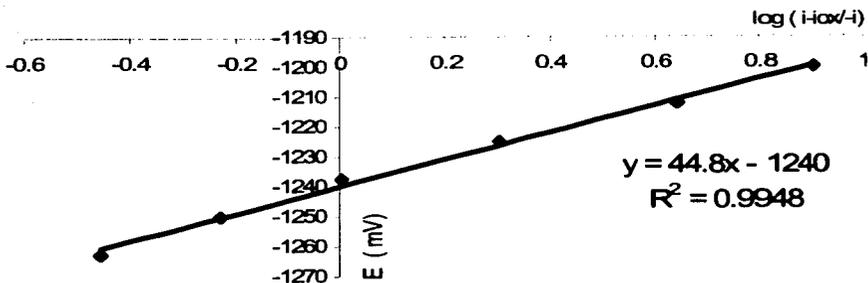
Se usó el método clásico para trazar un polarograma en el medio de boratos, lo que permitió, al graficar el potencial contra el log $(i-i_{ox}/i)$ obtener la ecuación de la recta, la pendiente y la ordenada.

De la zona logarítmica del polarograma se tomaron los valores para calcular el log $(i-i_{ox}/i)$. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Altura (cm)	i (nA)	E (mV)	log $(i-i_{ox}/i)$
0.3	1.5	-1212.5	0.903
0.5	2.5	-1225	0.643
0.9	4.5	-1237.5	0.301
1.3	6.5	-1250	0.00322
1.7	8.5	-1252.5	-0.23
2.0	10.0	-1275	-0.456

$i_{ox} = 2.7$ cm de altura = 13.5 nA

GRÁFICA PARA DETERMINAR EL POTENCIAL DE MEDIA ONDA



Anexo C.

Determinación del límite de detección y linealidad del método⁴⁸.

Como ejemplo se tomaron los datos obtenidos por polarografía clásica en el medio de boratos.

El significado de los símbolos se muestra a continuación:

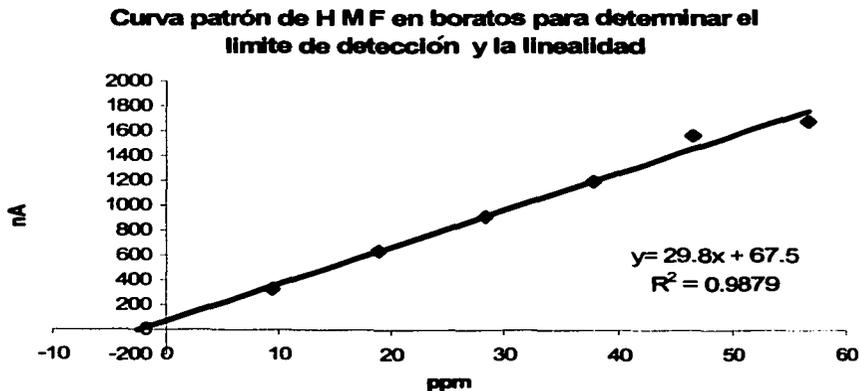
símbolo	significado
r	Coeficiente de correlación de la recta
m	Pendiente de la recta
b	Ordenada
n	Número de datos X-Y
Yprom	Valor promedio de los valores Y
Xprom	Valor promedio de los valores X
ΣXi	Suma de los valores de X
ΣYi	Suma de los valores de Y
$\Sigma (Yi - Ycalc)^2$	Sumatoria del cuadrado de la diferencia entre el valor experimental y el valor ajustado de Y
$\Sigma (Xi^2)$	Sumatoria del cuadrado de los valores X
$\Sigma (Xi - Xprom)^2$	Sumatoria del cuadrado de la diferencia entre el valor experimental y el valor promedio de X

$\Sigma (Y_i - Y_{prom})^2$	Sumatoria del cuadrado de la diferencia entre el valor experimental y el valor promedio de Y
$S_{y/x}$	Desviación estándar de la recta
S_m	Desviación estándar de la pendiente
S_b	Desviación estándar
t	T de student
Y_{LDD}	Límite de detección para la respuesta del equipo
X_{LDD}	Límite de detección para la concentración del analito

De la concentración final de HMF en la celda se obtuvieron los siguientes valores:

ppm de HMF Xi	intensidad (nA) Yi	Yi calc	(Yi - Ycalc)^2	(Yi - Yprom)^2	Xi^2	(Xi - Xprom)^2
9.457	325	348.87	570.1967701	524417.26	89.448	554.0186
18.91	635	630.25	22.5581283	322061.66	357.77	198.2548
28.37	910	911.62	2.650636182	709814.29	804.99	21.37027
37.8	1190	1193.005	9.034200614	1260016.9	1431.1	23.37432
46.65	1560	1455.624	10894.18151	2227570.5	2176.8	186.6420
56.74	1675	1755.612	6498.321986	2584071.5	3219.4	563.8107

Con los datos de intensidad y concentración se trazó la grafica:



De la gráfica se obtuvo el valor "r" (linealidad) y de las fórmulas siguientes el límite de detección. Estos cálculos se realizaron para cada medio.

Fórmulas:

$$S_{y/x} = \{ \sum (Y_i - Y_{calculada})^2 / n-2 \}^{1/2}$$

$$S_m = S_{y/x} / \{ \sum (X_i - X_{prom})^2 \}^{1/2}$$

$$S_b = S_{y/x} / \{ \sum X_i^2 / n \sum (X_i - X_{prom})^2 \}^{1/2}$$

$$Y_{LDD} = Y_B + 3S$$

$$X_{LDD} = 3S/m$$

Valores calculados:

r	0.9935	
m	29.75 ± 4.173	Sm * t(n-2, 95%) =4.173
b	67.50 ±175.96	Sb * t(n-2, 95%) =175.96
n	6	
n-2	4	
t(n-2, 95%)	2.447	
Yprom	1049.1666	
Xprom	32.9953	
Σ Xi	197.9722	
Σ Yi	6295	
Σ (Yi-Ycalc)^2	17996.94323	
Σ (Xi^2)	8079.63622	
Σ (Xi-Xprom)^2	1547.470891	
Σ (Yi-Yprom)^2	7627952.297	
Sy/x	67.076343	
Sm	1.705314	
Sb	71.9085	
Y_{LDD}	268.72	
X_{LDD}	6.80	

Anexo D.

Cálculo de la concentración del HMF por el método de adiciones patrón⁴⁸ para la muestra 2.

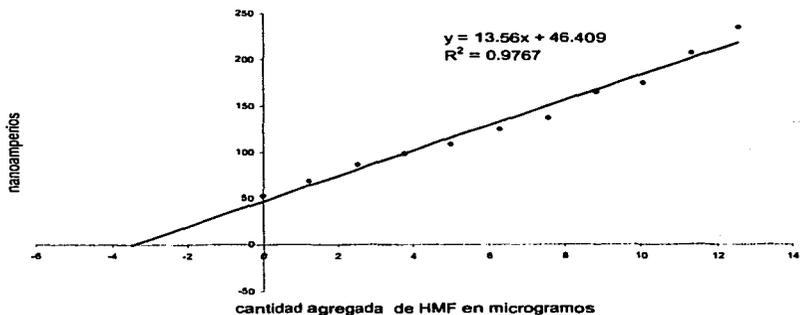
Al graficar los datos de intensidad en función de la cantidad agregada de HMF se obtuvo el valor extrapolado x_0 lo que permitió determinar la concentración de las muestras.

microgramos agregados de HMF(Xi)	intensidad en nanoamperios (Yi)	Yical	(Yi-Yical)^2	Xi^2	(Xi-Xprom)^2
0	53	46.3820	43.7993	0	39.7404
1.2611	68	63.4846	20.3886	1.5891	25.4358
2.5222	86	80.5870	29.2968	6.3564	14.3095
3.7833	98	97.8393	0.02582	14.3853	6.3061
5.0444	108	114.792	46.1420	25.4257	1.5916
6.3055	124	131.895	62.3392	39.7278	1E-06
7.5666	136	148.9982	168.954	57.2080	1.5865
8.8277	164	166.1009	4.41410	77.8665	6.3514
10.0888	174	183.2037	84.7081	101.703	14.2944
11.3499	206	200.3064	32.4167	128.7180	25.4157
12.611	234	217.4091	275.256	158.9136	39.7152

suma(Xi-Xprom)^2	174.7470
suma(Xi)^2	611.8915
suma(Yi-Yical)^2	767.7416
Xi promedio	6.3040
Yi promedio	131.909
Sy/x=	9.2360

x₀	-3.195798298
m	13.55959083
b	46.40909091
r	0.9883
n	11
n-2	9
t(n-2, 95%)	2.26
y =	13.6x + 46

GRAFICA PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE HMF EN LA MUESTRA 2 DE MIEL MEDIANTE ADICIONES PATRÓN



Para calcular la desviación estándar del valor extrapolado (S_{XE}), se usa la ecuación:

$$S_{XE} = \frac{S_{Y/X}}{m} * \left\{ \frac{1}{n} + \frac{(Y_i \text{ promedio})^2}{m^2 * \text{suma}(X_i - X_{\text{promedio}})^2} \right\}^{1/2}$$

$$S_{XE} = \frac{9.24}{3.56} * \left\{ \frac{1}{11} + \frac{(131.91)^2}{13.56^2 * (174.75)} \right\}^{1/2} = 0.5407$$

$$\text{INTERVALO DE CONFIANZA} = S_{XE} * t(n-2, 95\%) = 0.5407 * 2.26 = 1.22$$

El intervalo de confianza se divide entre la cantidad de miel de la muestra:

$$1.22 / 0.9975 = 1.22$$

Para obtener la concentración de HMF en la muestra el valor extrapolado x_0 (3.196 μg) se divide entre la cantidad de miel de la muestra (0.9975g).

$$3.196 \mu\text{g} / 0.9975 \text{ g} = 3.20 \mu\text{g} / \text{g} = 3.20 \text{ ppm}$$

$$3.20 \text{ ppm} \pm 1.22$$

Anexo E.

Cálculos para la determinación del contenido de cenizas con base en la conductividad específica.

Se hicieron diluciones de la miel en agua destilada quedando las siguientes concentraciones para cada muestra y las lecturas realizadas en el conductímetro:

Muestra	concentración (g de miel/ ml)	Conductividad eléctrica, medida	Menos la conductividad eléctrica del agua (3.9µS)	Multiplicado por la constante de celda (2.07cm ⁻¹)
Muestra 1	0.10028.	360 µS	356.1 µS	737.127 µS cm ⁻¹
Muestra 2	0.100116	260 µS	256.1 µS	530.127 µS cm ⁻¹
Muestra 3	0.107312	192 µS	188.1 µS	389.367 µS cm ⁻¹

Al utilizar la fórmula: $C = 0.14 + 1.74 * A$

Tenemos que: $A = (C * 0.14) / 1.74$

Donde "C" es la conductividad específica en mS * cm⁻¹

y "A" es el porcentaje de ceniza

	conductividad específica	porcentaje de ceniza
Muestra 1	0.7371 mS cm ⁻¹	0.3431 % de cenizas
Muestra 2	0.5301 mS cm ⁻¹	0.2241 % de cenizas
Muestra 3	0.3893 mS cm ⁻¹	0.1431 % de cenizas

BIBLIOGRAFÍA

1. García, A. Valcárcel, M. Fernández, M. Herrero, C. Latorre, M. Mesas, J. Effect of packing on the quality of honeys from Galicia. *Industria Conserve*. **69** (2) 353-357, 1994
2. Ghoshdastidar, N. Chakrabarti, J. Studies on hydroxy methyl furfural formation during storage of honey. *Journal of Food Science and Technology*. **29** (6) 399-400, 1992
3. Kubis, I. Ingr, I. Effects inducing changes in hydroxymethylfurfural content in honey. *Czech Journal of Animal Science*. **43** (8) 379-383, 1998
4. Singh, N. Bath, P. Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. *Journal-of-Food-Science-and-Technology*. **35** (2) 154-156, 1998
5. Bogdanov, S. Martin, P. Lullmann, C. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*. 59 pp, 1997
6. Bogdanov, S. International Honey Commission. Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey commission. *Bee-World*. **80** (2) 61-69; 1999
7. Mendes, E. Proenca, E. Ferreira, I. Ferreira, M. Bento, L. Quality evaluation of Portuguese honey. Second International Meeting of the Portuguese Carbohydrate Chemistry Group. Porto, Portugal, 21-25 September, 1997
8. Andrade, P. Amaral, M. Cunha, A. Proenca, A. Modification of AOAC method for the determination of hydroxymethylfurfural in dark honeys. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti.*, **6** (3) 289-293, 1995

ESTA TESIS HA SIDO
DE LA BIBLIOTECA

9. Crane, Eva. *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. 1ª ed Rootledge, N.Y. Printed in Great Britain, 1999.
- 10 Labougle, J. Zozaya, J.A. Historia de la apicultura mexicana. *Revista Ciencia y Desarrollo* (CONACYT). (69), 1986
11. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Estadísticas económicas
12. Molan, P. Honey Research Unit, University of Waikato, Nueva Zelanda. Cómo actúa la miel sobre las heridas. *Primer Congreso Alemán de Apiterapia Marzo de 2002*
13. Cosentino, S. Tuberoso, C. Pisano, B. Cherchi, A. Spanedda, L. Palmas, F. Influence of different storage conditions on honey quality. *Rivista di Scienza dell' Alimentazione*. **25** (3) 253-260, 1996
14. Estupinan, S. Sanjuan, E. Millan, R. Gonzalez, M. Quality parameters of honey: Microbiology, physicochemical characteristics and oldness. *Alimentaria*. (296), 89-94; 1998
15. Council Directive of 22 July 1974 on the harmonization of the laws of the Member States relating to honey, 74/409/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 221/14, 1974.
16. *Codex Alimentarius* Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH FAO and WHO, Rome 1993.
17. Proposal for a Directive of the European Council relating to honey, *EU document* 96/0114, 1996.
18. *Codex Alimentarius draft revised for honey at step 6 of the Codex Procedure*. CX 5/10.2, CL 1998/12-S, 1998.

19. Swiss Food Manual, (Schweizerisches Lebensmittelbuch) Chapter 23 A: Honey. Eidg. Drucksachen und Materialzentrale, Bern 1995.
20. Lüllmann, C. *Annual Reports of the Institute for Honey Analysis* (1989-1997).
21. Vorwohl, G. Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Ann de Abeille*. (7) 301-309, 1964.
22. Horn, H. Lüllmann, C. *Das grosse Honigbuch*. Ehrenwirth. München, 1992.
23. Piro, R. Capolongo, F. Baggio, A. Guidetti, G. Mutinelli, F. Honey storage: kinetics of hydroxymethylfurfural production and of the degradation of enzymes (diastase and invertase). *Apicoltore Moderno*. **87** (3), 105-114, 1996
24. Piazza, M. Accorti, M. Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura* (7), 51-63, 1991
25. Norma Mexicana de miel *NMX-F-036-1997*
26. Winkler, O. Beitrag zum nachweis und zur bestimmung von oxymethylfurfurol in honig und kunstthoning. *Lebensmittel-Untersuchungund-Forschung* (120) 161-167, 1955.
27. AOAC. Official Method 980.23. HMF in honey. chapter 44, p. 26 1995
28. Coco, F. Valentin. C. Novelli, V. Ceccon, L. High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. *Journal of Chromatography*. **749**: (1-2), 95-102; 1996
29. Serra, J. Determination of the hydroxymethylfurfural content of honey by HPLC and UV spectrometry. *Sciences des Aliments*. **11** (3) 547-557, 1991
30. Lewis, R. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 12th ed., New York, Van Nostrand Reinhold Co., p. 623, 1993

31. Aldrich Chemical Co. *Material Safety Data Sheet: 5-(Hydroxymethyl)furfural, 99%*, Milwaukee, WI, 1994
32. Budavari S. ed. *The Merck Index*, 11th ed., Rahway, NJ, Merck & Co., Inc., p. 767 1989
33. Sax, N.I. & Lewis, R.J., Sr. *Dangerous Properties of Industrial Materials*, 7th ed., Vol. III, New York, New York, Van Nostrand Reinhold, p. 2640 1989
34. Kunz, M. Hydroxymethylfurfural, a possible basic chemical for industrial intermediates. *Studies in Plant Science, Inulin and Inulin containing Crops.* (3) 149-160, 1993
35. Bachmann, S. Meier, M. Kaenzig, A. 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie*; **51** (3) 49-50, 1997
36. González, Luis. Castello, P. Gagliardino, J. Rossi, J. La glicación de las proteínas y su participación en enfermedades humanas. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy.* **10**, (58) 2000
37. Lewkowski, Jaroslaw. Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethyl-furfural and its derivatives. *ARKIVOC.* (1) 17-54 2001.
38. Kawana, O. Nakamura, Y. Yoshiro, Y. Electrooxidation of 5-hidroxy-methylfurfural and its derivatives. *Nippon Kagaku Zaishi* , (12) 1747-1752; 1984
39. El-Hajj, T. *Ph. D. Thesis*, Université Lyon 1, Lyon 1983.
40. Cottier, L. Skowronski, R. Descotes, G. Lewkoski, J. Ultrasonically accelerated synthesis of furan-2,5-dicarbaldehyde from 5-hydroxymethyl-2-furfural. *J. Synthesis*, 1291-1292, 1996

41. Faury, A. Gaset, A. Gorrichon, J. The reactivity and chemical use of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxyaldehyde. *Inf. Chim.* (214) 203-209, 1981.
42. Schiavo, V. Descotes, G. Mentech, J. Catalytic hydrogenation of 5-(hydroxymethyl) furfural in aqueous medium. *J. Bull. Soc. Chim. Fr.* 704-711, 1991
43. Reichstein, T. Zschokke, H. Synthesis of 5-methylfurfuryl chloride. *Helv. Chim Acta.*, (15) 249-253, 1932
44. Reynolds, H. Jones, R. Garber, J. (to Merck & Co., Inc), *US Patent*, 3014926 (1961); N-(5-Hydroxymethyl-2-tetrahydrofurfuryl) amides and derivates (56)1962, P12856f.
45. Middendorp, J. Synthesis of hydroxymethylfurfural. *Rec. trav. chim.* (38) 1-71, 1919
46. Martínez, E. Zozaya. Análisis palinológicos para la certificación del origen botánico de lotes comerciales de miel. X Seminario de Apicultura, Puerto de Veracruz. Memorias: 5 p.
47. Karabournioti, S. Zervalaki, P. *Efecto del calentamiento en el HMF y la invertasa de la miel.* *Apiacta.* **36** (4) 177-181, 2001
48. Miller J. C., Miller H.N. *Estadística para química analítica.* 2ª ed. Ingles, 1ª ed. Esp. Addison-Wesley Iberoamericana, USA, 1993

***No es esencial obtener las más altas notas en la
universidad, siempre que seas capaz de obtener
mención honorífica en la vida***