

20/70

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**LA CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA EN
RELACION A SU CONTENIDO DE
HIDROXIMETILFURFURAL**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

EDUARDO ALEXANDRO JUAREZ SALOMO

MEXICO, D. F.,

1987



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 está 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.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INTRODUCCION	5
CAPITULO	
1.- LA APICULTURA Y LA MIEL DE ABEJA	
1.1 - Antecedentes Históricos	7
1.2 - Meliponicultura o Apicultura Americana	9
1.3 - Importancia actual de la Apicultura en México	11
1.4 - La miel de abeja (Generalidades)	12
1.5 - La miel como alimento	14
2.- HIDROXIMETILFURFURAL	
2.1 - Estructura Química , Propiedades Físicas y Químicas.	20
2.2 - Formación de Hidroximetilfurfural en miel	23
2.3 - Importancia como parámetro de calidad en miel de abeja	25
2.4 - Métodos de Cuantificación	28
2.5 - Modelo Matemático de Predicción de Termogeneración Hidroximetilfurfural	29
3.- METODOLOGIA	
3.1 - Preparación de la muestra	33
3.2 - Evaluación de la calidad	33

CAPITULO	PAGINA
3.3 - Determinaciones propuestas por la Norma Regional Europea	
3.3.1 - Contenido de Humedad	34
3.3.2 - Contenido de Sustancias Minerales	34
3.3.3 - Determinación de Acidez	35
3.3.4 - Det. Fotométrica de Hidroximetilfurfural	36
3.4 - Det. de Azúcares Reductores Directos (DNS)	37
3.5 - Síntesis de Hidroximetilfurfuraldehído	38
3.6 - Det. Espectrofotométrica (UV) de HMF	40
3.7 - Comparación entre Métodos	42
3.8 - Determinación de la Cinética de Formación de Hidroximetilfurfural	43
4.- RESULTADOS Y DISCUSION	47
5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
6.- BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUCCION :

México es el primer exportador mundial de miel de abeja y el cuarto productor en el orbe (Gordon - 1976 , Rodríguez - 1987) , por lo que conviene al país hacer acopio de los elementos tecnológicos que permitan el control total de sus parámetros de calidad , así como de los métodos , factores , condiciones y todo lo que pueda influir finalmente en esa misma calidad .

El HMF (Hidroximetilfurfural) ha sido reconocido desde hace tiempo como un parámetro que permite evaluar la calidad de la Miel de Abeja , ya que es reflejo sobre todo de las condiciones de almacenamiento y proceso . En resumen se ha demostrado estadísticamente que el contenido de HMF explica por sí solo , una gran parte de la calidad global de la Miel . (Valle Vega - 1985)

No obstante que en esto concuerdan muchos autores y que existe bastante información al respecto , no se ha elaborado hasta la fecha un modelo que prediga la formación de HMF , debido a que se conoce poco de su cinética de formación .

El presente estudio intenta por un lado , profundizar en el conocimiento del HMF como parámetro de calidad ; optimizar los métodos de cuantificación de éste y evaluar de modo sistemático el tipo de Cinética que implica su reacción de termogeneración ; finalmente proponer un modelo

matemático que permita predecir la vida útil (dentro de los límites establecidos por las organizaciones normativas internacionales) de la Miel de Abeja, en función de sus condiciones de proceso y almacenamiento, de acuerdo a los estudios realizados.

1.-LA APICULTURA Y LA MIEL DE ABEJA

1.1 Antecedentes Históricos.(Avila - 1980)

La miel , es uno de los alimentos más antiguos que se conocen , fué incorporada a la dieta humana tal vez por un descubrimiento fortuito y desde entonces , apreciada por sus propiedades sensoriales . Según los antropólogos , el hombre se alimenta de miel desde hace unos 200,000 años.

Antecedentes registrados de la relación entre hombres y abejas pueden encontrarse en las pinturas rupestres de Bicorp y Dues Aigues , cuevas paleolíticas de Valencia España , que datan aproximadamente 7,000 A.C..

Las abejas llegaron a ser objeto de admiración religiosa , siendo ofrecida la miel en los altares como preciado presente a los Dioses.Mucho tiempo antes de que se inventara la manera de elaborar vino , se elaboró la primera "cerveza" , mezclando miel y agua , dejándolos fermentar;esta primera bebida alcohólica , por su propiedad de procurar una especie de éxtasis místico ,fué considerada como " néctar divino " y los Celtas la denominaron Biura que derivaría posteriormente en los vocablos: Bier (Alemán),Beer (Inglés),Biere (Francés) y Birra (Italiano) que significan cerveza.

En el antiguo testamento hay diversas menciones acerca de la miel , específicamente el rey Salomón ; en los Proverbios (XXIV,13) y Cantares (IV,11) ensalsa éste alimento al nivel de un cáliz o un presente divino.

El arte de criar y sacar provecho de la abejas se

atribuye a los Tartesios , una población de origen africano que desde principios de la edad de bronce se asentó en la parte baja del Guadalquivir , posteriormente los Fenicios dieron a conocer estas prácticas apícolas a Babilonia , Egipto y otros pueblos de la antigüedad .

Un documento Egipcio que data de 1550 A.C. que se guarda en la Universidad de Leipzig , pone de manifiesto que los antiguos reconocían a la miel como elemento primordial en un gran número de medicamentos , este escrito contiene una serie de recetas para el tratamiento de diferentes enfermedades tales como el estreñimiento , el dolor de vientre , enfermedades de la mujer , de los ojos , etc.

En la antigua Grecia , existía la creencia que Zeus , padre de los dioses , había sido alimentado con miel durante su infancia , por lo que era consumida abundantemente , además de atribuirsele una influencia estimulante en las glándulas sexuales . También fué conocida como un factor de longevidad y salud floreciente en edad avanzada ; personajes como Anacreonte , Pitágoras , Hipócrates y Celso fueron grandes consumidores de miel .

El imperio Romano no fué la excepción , ya que el consumo de miel llegó a ser extraordinario , le dieron el uso adicional de utilizarse para la conservación de frutas que se guardaban en anforas repletas de miel , para su consumo en invierno . Los personajes como Julio Cesar , tenían afición por este producto , los soldados , gladiadores y pueblo en general la reconocían como una fuente de vigor y fortaleza .

Esta afición fué transmitida y adoptada facilmente por los Celtas , Galos , Francos , Hunos , Arabes (quienes consideraban un deber y un placer consumirla para conservar salud y belleza) y Visigodos los cuales al igual que Carlo Magno dejaron compilaciones sobre los cuidados debidos para éste producto de las abejas .

En la época feudal , los señores exigían el pago de vasallaje con cera y miel , el azúcar en ese entonces era una sustancia exótica proveniente del oriente. La apicultura en el viejo mundo siguió floreciendo , como consta en numerosos libros consagrados a la abeja doméstica denominada por los naturistas Apis mellifica. Por razones de índole político , la historia marca el año de 1813 a partir de cuando se obtuvieron 4000 ton. anuales de azúcar de remolacha azucarera lo que hizo , desafortunadamente , que descendiera el consumo de miel.

Dentro de los países de mayor desarrollo apícola que más han contribuido a la explotación de este recurso es la U.R.S.S., desde los siglos XVI y XVII es un exportador importante , de hecho , en 1828 se abrió la primera escuela de Apicultura y es , a la fecha el primer productor mundial de miel de Abeja. (Avila-1980, Siddiqui-1970)

1.2 Meliponicultura o apicultura americana.

En el nuevo mundo no existían las especies del género Apis , sino naturales de la zona , estaban el grupo de abejas Meliponinae o abejas sín aguijón , tuvo particular importancia la especie Melipona beecheli Bennett que aún se

utiliza en Yucatán. Se presupone que en sus principios la meliponicultura se llevó a cabo robando miel de las colonias silvestres de meloponinos , más tarde cortaban los nidos y los cuidaban cerca de su vivienda hasta el momento de la cosecha. La meliponicultura se difundió ampliamente.

La utilización primordial que dieron los mayas a la miel fué la elaboración de "Balché" bebida que se utilizaba en festividades religiosas .También fué objeto de intenso comercio desde Honduras y Nicaragua hasta Tabasco y la zona Mexica, era además , el tributo que pagaban los campesinos mayas a sus "Uinics".

A la llegada de los españoles se consideró la venta de miel y cera un monopolio real y exclusivo de España . Con la introducción de la caña de azúcar y el desarrollo de grandes haciendas azucareras en la Nueva España , la miel pasó a ser un producto de importancia secundaria y su utilización como edulcorante se redujo. El cerumen de la M. *beschei* (que es una mezcla de propoleos)se comercializó desde aquel entonces como cera de Campeche.

Los españoles no introdujeron la abeja europea a la Nueva España cuando menos no de manera directa , llevaron algunas colonias a Florida donde no tuvo éxito , posteriormente se llevó a la Apis mellifica a Cuba (1764), la actividad cobró gran importancia y probablemente de aquí se introdujo a la Nueva España , algunas evidencias sugieren que tal incorporación tuvo lugar entre fines de la década 1760's y principios de 1770's pero solo en la región central , ya que a Yucatán fué introducida desde E.U.A.

hasta fines del siglo pasado y la abeja italiana Apis mellífica Ligústica se trajo a México después de 1911. (Labougle-Zozaya 1986)

1.3 Importancia actual de la Apicultura en México.

México se divide en 5 grandes regiones apícolas : Norte , Pacífico , Golfo , Centro y Península de Yucatán. Existen entre ellas muy variadas diferencias de clima , suelo , vegetación . Aún dentro de cada región podemos marcar múltiples y diferentes subregiones dadas sus condiciones particulares . La región más importante es la de la Península de Yucatán .La producción actual nacional es de alrededor de 74,613 Ton de miel al año (1986 , para 1987 se tiene un preliminar de 55,260 Ton Fuente: I.N.E.G.I.) lo que nos ubica en el 4^{to} productor mundial de miel de abeja (Rodríguez-1987) y durante los últimos 10 años México es el primer exportador mundial de miel de abeja . Los principales importadores de productos apícolas mexicanos son : República Federal de Alemania , E.U.A. , Inglaterra , Francia , Suiza , Bélgica y España (Gordon-1978) que compraron a México alrededor de 58,000 Ton (Ene-Dic 1986)por un equivalente de 42'696,000.00 U.S. Dlls.y con tendencia a aumentar (Fuente : S.A.R.H.).

Otro punto importante es el uso que recientemente se le esta dando a la abejas ; para la polinización de cultivos , en esta área el potencial es notable , ya que el valor de la polinización es de 10 a 20 veces mayor que el de la miel en términos económicos .

También se debe mencionar que la apicultura implica una gran importancia social , ya que excepto por una docena de empresas y algo más de un millar de apicultores aficionados , el resto de los 47,000 apicultores del país , son campesinos cuya productividad agrícola es tan escasa que apenas cubre las necesidades familiares , por lo que la comercialización de miel y cera les permite mejorar su nivel de vida , la apicultura permite el acopio de ingresos directos para la economía rural , es generadora de empleos y apoya algunas actividades manufactureras.

En cuanto al consumo nacional de miel de abeja , es reducido principalmente por que la población desconoce sus cualidades alimenticias y no la incluye habitualmente en la dieta , además los sistemas de comercialización con un alto margen de ganancia provocan que su precio al público esté fuera del alcance de las mayorías. El consumo anual per cápita en México es tan solo 200 g , uno de los más bajos del orbe , no obstante paulatinamente aumenta el consumo interno de miel , en parte por la tendencia actual de ingerir productos naturales. (Labougle-Zozaya 1986)

1.4 La miel de Abeja (Generalidades)

Existen casi tantas definiciones de miel como autores han escrito a propósito de ella ;una de estas definiciones quizás la más acertada es la que cita la Norma Regional Europea complementada por Donadieu-1979.: " Se entiende por miel la sustancia dulce producida por las abejas melíferas obreras , a partir del néctar de las flores o de las

secreciones procedentes de las partes vivas de las plantas o presentes en ellas , que dichas abejas recogen , y combinan con sustancias específicas propias , almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena. Dicho producto puede ser fluido , espeso o cristalizado .(Codex Alimentarius-1969,Altamirano et al.-1985)

El proceso de transformación del néctar en miel ha sido ampliamente estudiado , esencialmente consiste en la recolección del material crudo (Néctar,melaza,etc.), las abejas lo mezclan con secreciones salivales ricas en enzimas y se da lugar la inversión de Sacarosa en sus constituyentes monosacáridos de hecho se consigue transformar todos los azúcares por este tratamiento enzimático. Posteriormente se evapora el exceso de humedad hasta conseguir aproximadamente una concentración del 70-80 % de azúcares lo que evitará la fermentación.(Nixon y Ribbands 1952 , Jean Proust-1981 citados por Altamirano-Ibañez 1984)

Aunque la composición de la miel varía de acuerdo a las flores de las que procede y otros factores (tales como:Tipo de vegetación , clima , situación geográfica , época del año , condiciones ambientales y técnicas apícolas utilizadas) algunos autores han propuesto una serie de valores que consideran "típicos" de la miel de abeja. Al hacer una revisión de estos valores , por los intervalos que manejan y sus promedios , los niveles reportados por White(1962) coinciden con la gran mayoría. Para los componentes principales encontró que la miel tiene :

Fructosa (38.2 %), Glucosa (31.3 %), Humedad (17.2 %), Maltosa (7.31 %), Az. Superiores (1.5 %), Sacarosa (1.3 %), Ac. Glucónico (0.43 % reportado como acidez libre), Acidos Orgánicos (0.57 %), Proteínas (0.26 %), Cenizas (0.16 %), Lactona (0.14 %), Nitrógeno (0.04 %) , Minerales y Vitaminas (Trazas). (White-Siciliano 1980, Siddiqui-1970)

Los minerales presentes en orden de abundancia : Cloro, Potasio, Fósforo, Calcio, Magnesio, Sodio, Azufre, Hierro, Manganeso, Cobre y Yodo. De las vitaminas reportadas están principalmente la vitamina "C" cuyo contenido aumenta sobre todo si esta mezclada con polen , esta vitamina se conserva por mucho tiempo en comparación con la que se obtiene de frutas y legumbres. Además la miel cuenta con : Vitaminas ;
B₁ Tiamina (pobre), B₂ Riboflavina, B₆ Piridoxina ,
A Retinol, Ac. Pantoténico, H Biotina, B₈ Ac. Fólico,
Bx Ac. Paraminobenzóico, PP Nicotinamida . Se puede afirmar que la miel contiene todas las vitaminas indispensables para la vida por lo que será un preventivo contra avitaminosis , escorbuto o beri-beri.

La miel también contiene algunas enzimas de importante actividad : Diastasa (o amilasa), Invertasa , Catalasa, Glucosa-Oxidasa y Lipasa. En alguna ocasión se intentó relacionar la actividad enzimática como índice de adulteración y sobrecalentamiento , estudios posteriores demostraron que existen mieles sin adulterar , recién extraídas que tienen una actividad muy baja , no obstante sobre todo en países europeos se sigue tomando como uno de los factores de calidad más importantes. (Altamirano et al.

1985, Avila-1980, Codex Alimentarius-1969)

La miel proporciona así mismo diversos ácidos orgánicos el que se encuentra en mayor proporción es el glucónico pero se ha comprobado que existen : Acético, Butírico, Láctico, Máfico, Utnico, Cítrico, Meléico, Oxálico, Succínico, Fórmico, Pirúvico, Tartárico, Glicólico y Cetoglutárico.

En cuanto al material protéico su contenido no es de gran importancia ya que se reporta 168.6 mg/100 g de miel , se trata principalmente de albúminas , peptonas , globulinas , histonas , nucleoproteínas y aminoácidos. (White-1976 citado por Altamirano et al.-1985, Avila-1980, White et al.-1978)

Otras sustancias : Existen pequeñas cantidades de ácido Fórmico que son suficientes para ejercer una acción antiséptica contra los microbios patógenos sin hacer que por esta razón la miel sea tóxica o cáustica , también desde hace mucho tiempo , se conoce en la miel cierta actividad antibiótica , atribuida a un factor denominado inhibina , ahora se sabe que está relacionada con la actividad de la Glucosa-Oxidasa y la Producción de peróxido de Hidrógeno ; un fuerte bacteriostático). Gracias a estos factores aunado a la baja actividad de agua , la acidez natural y a la tan alta concentración de azúcares , la miel es un alimento que permanece casi siempre exento de microbios e inclusive ha sido utilizado con éxito como un poderoso preventivo contra infecciones.

En la miel también es posible encontrar : Sustancias gomosas , ceras , pentosanas , trazas de glicéridos , esteroides y fosfolípidos , por cromatografía de gases se ha identificado ácidos Palmítico , Oléico , Láurico , Miristoléico , Esteárico y Linoléico. (White-1978 citado por Altamirano et al. 1985, Avila-1980)

En algunas mieles de determinados y bien conocidos orígenes se han encontrado algunos compuestos tóxicos tales como el Acetil Andromedol (Grayanotoxina I, Andromedotoxina, Rhodotoxina, Aschotoxina), Gelsemina, Andromedol (Grayanotoxina III, Deacetilandromedotoxina), Anhidroandromedol, desacetilpiperistoxina B, Tutina, Hyeninanchina, y alcaloides pirrolizidinos, en diferente grado pero todos estos compuestos son tóxicos, sin embargo se considera que la incidencia de envenenamiento humano por miel es extremadamente bajo (White-1981). Se ha demostrado también que el riesgo de que la miel se contamine por plaguicidas es muy remoto debido especialmente al comportamiento de las colonias de abejas melíferas (Atkins-1975).

En resumen se puede afirmar que la miel es una mezcla compleja de compuestos, donde los carbohidratos son los componentes mayoritarios, mismos que son responsables esencialmente de sus propiedades físicas y organolépticas, empero no debemos olvidar sus propiedades alimenticias, "medicinales" y las que se mencionarán a continuación.

1.5 La miel como alimento

La miel es el alimento natural más importante como

fuerza de calor y energía, sus propiedades sensoriales lo identifican como un dulce agradable y nutritivo. En su estado natural, la miel ya está desdoblada en azúcares simples y no fermenta en el estómago, el aparato digestivo no necesita hacer la hidrólisis previa y es asimilada inmediatamente además de que no existe prácticamente el peligro de que esté contaminada por bacterias, tal como se consume pasa al torrente sanguíneo a través de las mucosas intestinales sin sufrir la menor alteración en su constitución química, otra ventaja que ofrece la miel es que por ser un azúcar invertido, no será un precursor de caries dentales. Es pues la miel un producto sano, natural, alimenticio, medicinal, accesible y sabroso.

Las formas comerciales de miel son principalmente tres: Miel Líquida (Al parecer la preferida por los consumidores por lo tanto la de mayor venta), Miel sólida o cristalizada, (se desarrolla actualmente un tipo "Fondant" untable) y la miel vendida en el panal original, que al parecer es la que complementa más el sabor verdadero de la miel. (White-1983)

Se puede encontrar una muy amplia variedad de mieles, debido al gran número de factores que intervienen en sus propiedades.

El consumidor común, ignora la causa de estas diferencias, despreciando muchas veces mieles de gran pureza y valor nutritivo, por que su aspecto no es del todo grato a la vista, marcando preferencia por mieles sospechosas e inclusive evidentemente adulteradas, pero de

buena apariencia a las que atribuye una autenticidad que muy probablemente no tengan . Es por lo tanto imperativo educar tanto a productores como a consumidores , para desechar este tipo de prejuicios . De modo general se preferirá aquella miel que se pueda adquirir directamente con el productor aún cuando su aspecto no sea perfecto , si no es posible se preferirá comprar miel que esté envasada con la marca o nombre del productor , lo que nos dará una mayor garantía de que no esta adulterada en comparación con mieles de envases anónimos o a granel.

Cuando la miel se extrae del panal , es una solución concentrada más o menos fluida , pero éste estado líquido es transitorio , después de un tiempo la miel se transforma en una masa pastosa granulada opaca debido a la cristalización de uno de sus azúcares . La miel cristalizada , es tan buena o mejor que la miel líquida , de hecho al contrario de lo que todo mundo piensa , la cristalización es una garantía de pureza para el comprador, lo que no ocurre con la miel líquida . Inconscientemente al exigir a los productores exclusivamente miel líquida se les está obligando a adulterar el producto , ya que agregarán azúcar invertido o someterán la miel a calentamientos (la mayoría no controlados y prolongados) lo que alterará los azúcares , destruirá las enzimas y vitaminas existentes en la miel , privando de esta forma al consumidor de las propiedades que espera hallar en ella.

Se preferirá miel granulada , si se quiere líquida , se pondrá una cantidad para consumo inmediato en baño de María

cuidando que la temperatura no sobrepase los 50 C.

En la industria también tiene la miel un papel preponderante . Se utiliza para obtener algunos licores y productos fermentados , en la elaboración de caramelos , golosinas , dulces y nougats , aunque su contenido de azúcar invertido limita un poco su aplicabilidad . También se ha elaborado una pasta untada de miel y mantequilla , varios cereales para desayuno , yogurts la incluyen en sus formulaciones , al igual que un gran número de alimentos naturistas . Se usa como edulcorante opcional en jaleas mermeladas y conservas , se recomienda para consumo infantil . Muchos dulces tradicionales mexicanos incluyen en su receta este ingrediente . Probablemente la industria que más utiliza la miel es la panadera ; por su alto contenido de fructosa , impartiendo retención de humedad , además de un grado deseable de oscurecimiento y sabor que no se obtiene de ninguna otra manera . Los panes , pasteles, panes dulces de levadura y galletas , todos mejoran con el uso de miel .

Es la miel pues , un ingrediente alimenticio digno de gran consideración ya que combina e imparte interesantes propiedades físicas , delicado sabor y una agradable connotación a la antigua .

Se puede conservar la miel durante años a condición de que se almacene en lugar seco y fresco (Temp. < 20 C) de preferencia en tarros que no dejen pasar la luz. (White-1983 , Avila-1980)

2.- HIDROXIMETILFURFURAL

2.1 Estructura Química, Propiedades Físicas y Químicas.

5-(HIDROXIMETIL)-2-FURALDEHIDO o 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURANCARBONAL o 5-(HIDROXIMETIL)-2-FORMILFURANO o 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURANCARBOXALDEHIDO o H M F

FIG. 2-A .-Estructura del Hidroximetilfurfural



C H O
6 6 3

Peso molecular = 126.11 g/mol

Proporción de Elementos: C = 57.14 % , H = 4.80 % , O = 38.06

Punto de fusión = 31.5 °C

Punto de ebullición = 114-116 °C/1 mm presión

Punto de "Flash" = 79 °C

Indice de refracción = $n_D^{18} = 1.5627$, $n_D^{36} = 1.556$

Densidad = $d_4^{25} = 1.2062$, $d_4^{15} = 1.268$

Calor de combustión = 665 Kcal/mol

Absorbancia UV-max = 283 nm

Absortividad molar = 16,830 lt/molcm (Turner et al-1954, Singh et al-1948)

Solubilidad = . Muy soluble en agua , Etanol , Metanol , Acetato de Etilo , Dimetilformamida , Acetona . Soluble en Eter Etilico , Cloroformo , Benceno y Tolueno en ebullición. Poco soluble en Tetracloruro de Carbono y muy poco soluble en Eter de Petróleo.

Apariencia : En estado puro , cristaliza inmediatamente a 0°C , destila difícilmente con vapor de agua , son cristales (aguja) incoloras no higroscópicas , que tienen un olor agradable que recuerda la flor de la manzanilla (camomila), de sabor amargo acre. Sólido a CNTP (Condiciones normales de temperatura y presión 20°C/1 atm) se descompone con la luz , el aire y la humedad.

En estado impuro es un líquido amarillo claro que no cristaliza fácilmente , razón por la que mucho tiempo se pensó que era líquido a CNTP. Produce manchas color café inofensivas en la piel , se sugiere evitar contacto con los ojos , las fuentes más frecuentes de preparación son: Fructosa, Glucosa, Sacarosa, Almidón de Maíz, Melaza, Galactosa.

Usos: En la síntesis de Dialdehidos , Glicoles , Eteres , Aminoalcoholes y Acetales. Soluciones ácidas catalizan la apertura del anillo. (Middendorp-1918, Merck Index , Haworth-Jones 1944). Se considera que el H.M.F. no es dañino para la salud , aún en cantidades varias superiores a las establecidas como límites máximos , propuestos por las normas (U.S. of A. Food and Drugs Administration - 1970)

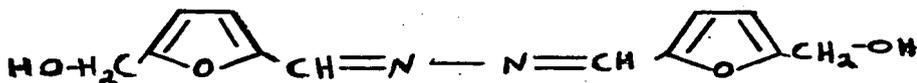
Propiedades Químicas del HMF.

Dá positiva la reacción de la anilina sobre papel (mancha roja) también con Difenilamina + ácido Clorhídrico forma una sustancia colorida con espectro de absorción característico, se obtiene asimismo la Nitrofenilhidrazona de HMF al reaccionar con p-Nitrofenilhidrazina , por ebullición en medio ácido el HMF se transforma en ácido levúlico y fórmico.

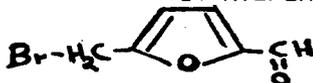
El HMF reacciona con KCN y NH₃ pero los productos formados son inestables, al parecer el grupo hidroximetil CH₂-OH causa inestabilidad. Reacciona además con NaOH₂ (Cannizaro) dando 2,5-Dihidroximetilfurfurano + ácido 5-Hidroximetilpiromúxico ejem 7.

HMF da productos de condensación con el ácido y Eter Malónicos ejem 8.

EJEMPLOS DE ALGUNOS DERIVADOS DEL HIDROXIMETILFURFURAL



1) Hidroximetilfurfuraldazina



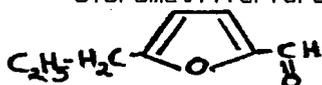
2) Bromometilfurfural



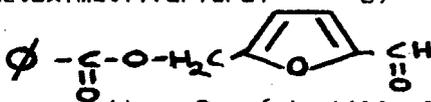
3) Clorometilfurfural



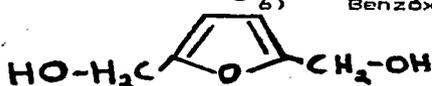
4) Metóximetilfurfural



5) Etóximetilfurfural



6) Benzóximetilfurfural



7) Dihidroximetilfurfurano + ácido 5-Hidroximetilpiromúxico



8) Hidroximetilfurfuralmalonatodietílico

Coloraciones que dá el HMF y diferentes reactivos:

Reacción :	Color :
Seliwanof (Resorcina+HCl)	Rojo
Baudoin (Aceite de ajonjolí+HCl)	Rojo-violeta
Rothenfasser (8-naftol + Ac.Sulfúrico)	Violeta intenso
Jagerschmide (Acetona + HCl)	Rojo-vino
Ial-Pechman-Middendorp (Difenilamina+HCL)	Azul fuerte
Lieberman (Triptofano + HCl)	Violeta fuerte
Ekenstein (Acetato de anilina)	Amarillo-naranja
Wangerin (Alcaloides + Ac.Sulfúrico)	Violeta
Schaffer y Philippe (Orcina+HCl+calor)	Amarillo

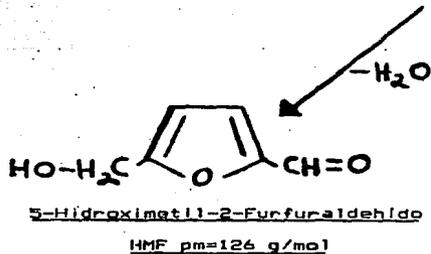
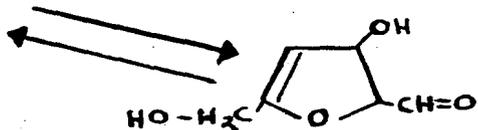
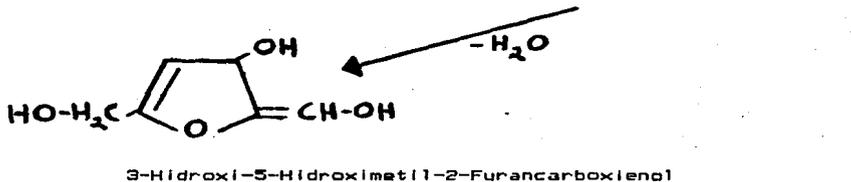
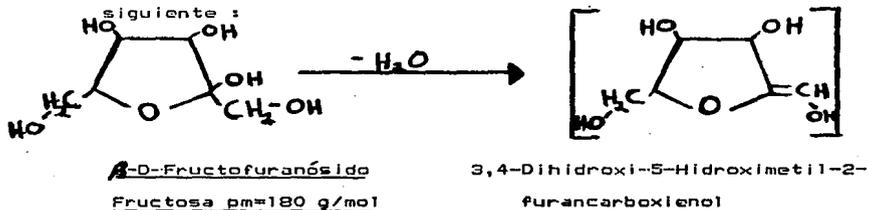
(Middendorp-1918)

2.2 Formación de Hidroximetilfurfural en miel

El 5-Hidroximetil-2-Furfuraldehído (en adelante HMF) se forma a expensas de las hexosas , tanto cetohexosas (fructosa, sorbosa) como aldohexosas (glucosa, galactosa) aunque estas últimas dan rendimientos notablemente menores. El HMF fué descubierto en 1895 por Döll quién lo caracteriza como derivado del furfural , poco después Kiermayer encuentra que se trata del HMF , no obstante es hasta 1909 que Blanksma demuestra de una manera decisiva la estructura que actualmente conocemos Fig. 2-A. (Middendorp-1918)

En medio ácido , las hexosas pueden deshidratarse , iniciando una β -eliminación , formandose el enol del monosacárido y después de sucesivas deshidrataciones se logra el compuesto furanflico HMF. (Altamirano e Ibañez-1984)

El mecanismo de reacción propuesto (Haworth-1944) es el siguiente:



2.3 Importancia como parámetro de calidad en miel.

El objetivo principal del procesamiento de miel es simple: estabilizarla, esto es, mantenerla libre de fermentación y lograr que conserve el estado físico clásico (Líquido o finamente granulado). La operación fundamental en el proceso de miel de abeja es la aplicación de calor (Pasteurización), aunque es muy frecuente que se abuse de este tratamiento. Podemos también pensar que el almacenamiento, en especial el que se realiza en condiciones inadecuadas es una forma de exposición al calor por largos periodos de tiempo, de aquí que desde hace mucho tiempo se ha observado, que el estudio de los efectos del calor sobre la calidad de la miel, pueden tener una amplia aplicación. (White-1983)

Dentro de los efectos que produce el calor sobre la miel se reportan:

- Descomposición de los azúcares (hexosas); decrece la concentración de Glucosa y Fructosa.
- Formación de Hidroximetilfurfural (Hexosas, acidez en la miel pH = 3.2-5.5 y calentamiento).
- Destrucción o disminución en el contenido de enzimas.
- Disminución de Aminoácidos libres y desnaturalización de proteínas.
- Destrucción de su poder inhibitorio de microorganismos.
- Oscurecimiento de la miel principalmente por dos factores:
 - a) HMF se polimeriza para dar productos coloridos de diferente grado de solubilidad.
 - b) En menor grado, producción de melanoides por aminoácidos-azúcares (Maillard).

-Deterioro de las cualidades organolépticas de la miel, cambios de color, sabor y aroma.

-Cambios en la granulación.

(ADAC-1984, White-1964, 1980A, 1980B, 1983, Strangl-1980, Shade-1958, Crane-1982, Altamirano et al-1985, Wootton-1976, Valle-1983, Shingh-1980, Siddiqui-1970)

Como se ha visto el HMF es un indicador de cambios químicos, todos los autores coinciden en ello, fundamentado en el hecho de que se produce por termogeneración y permite una medición objetiva.

Adicionalmente se sabe que el azúcar invertido preparado con ácido, contiene cantidades importantes de HMF, de modo que un valor muy alto de HMF, probablemente indique la adulteración de la miel con este producto.

Se han hecho muchísimos estudios sobre el contenido de HMF en miel, muestras de todo el mundo se han sometido a esta cuantificación para determinar los límites de concentración de HMF que garanticen la autenticidad, frescura, y calidad de la miel de abeja.

La Norma Regional Europea fija el límite de su contenido a no más de 4 mg/100 g de miel. Hadorn (1962) es más explícito en su criterio de evaluación de miel a través de su contenido de HMF:

Clasificación de la miel

HMF mg/100g

Enteramente fresca (aceptable)

0.1-0.3

No fresca, Ligeramente sobrecalentada
(Aceptable)

Máx. 3.0

Clasificación de la mielHMF mg/100g

Excesivamente almacenada (1-3 años) (Inaceptable)	4 - 8
-Si la miel tiene poco tiempo de almacenamiento Calentamiento corto tiempo alta temperatura (Inaceptable)	1 - 3
Sobrecalentado por largo tiempo	4 - 15

White(1980C) obtiene las siguientes conclusiones de las cantidades de HMF encontrados en las muestras:

CantidadConclusión

20 mg/100g miel
o más

Adulteración con Jarabe invertido es evidente, confirmar con distribución del contenido de azúcares: Glucosa , Fructosa , Sacarosa etc.

10-20 mg/100g miel

La muestra puede haber sido sobrecalentada o almacenada por largo tiempo , un análisis de carbohidratos puede diferenciar entre tal miel y miel adulterada.

< 10 mg/100g miel

Determine el contenido de glucosa y si :

[Glucosa] > 40% La muestra no es genuina

[Glucosa] 38-40% No hay indicios de Adulteración

[Glucosa] < 38 % La muestra probablemente es genuina.

Como podemos ver estos criterios son consistentes con la Norma Regional Europea en su límite máximo de 4 mg HMF/100 g de miel , tal vez un poco conservador , pero en un momento dado puede garantizar la autenticidad de la miel.

En resumen : Se ha demostrado estadísticamente que el HMF por sí solo explica una gran parte de la calidad global de la miel y es posible medirlo objetivamente. (Valle-1983)

Este parámetro no debe ser la única base para condenar una muestra como adulterada , será necesario analizar otros parámetros de composición , a menos que la concentración sea extremadamente elevada (>50 mg/100 g) la cual es concluyente como síntoma de adulteración. (White-1979).

2.4 Metodos de cuantificación

Desde el siglo pasado hasta 1961 se probaron multitud de métodos que intentaban identificar mieles calentadas y adulteradas , entre ellos muchas pruebas de color. De las que menciona la literatura : Difenilamina , P-Toluidina -Ac. Barbitúrico , Resorcinol y Bencidina. (Dhar-1972)

Las pruebas de Fiehe y Feder también fueron muy populares , pero estos métodos de color no eran muy confiables ya que presentaban diferente sensibilidad. Con la introducción de los métodos de Winkler (1955) para cuantificar HMF en miel se pudieron hacer estudios más objetivos de los efectos del almacenamiento y calentamiento de miel. Este método fue adoptado por la Norma Regional Europea. (White-1980A)

Actualmente se considera un procedimiento indeseable , debido a los siguientes inconvenientes : Requiere de P-toluidina un reactivo que se sabe es carcinogénico en animales , el AOAC a objetado su uso además conlleva cierta variabilidad ya que las condiciones de la determinación intervienen en el resultado ; el color es inestable y su desarrollo es termodependiente (Metodología 3.3.4. (White-1979 A,B,C)

Requiere además de Ac. barbitúrico que en México es casi imposible conseguir , debido a la legislación vigente.

Para optimizar este método Dhar(1972) sugiere el uso de una columna de adsorción a base de carbón , pero se ha visto en la práctica que este método es complicado y tedioso no aconsejable para uso de rutina.

White(1979A) sugiere un nuevo método espectrofotométrico mucho más simple utilizando bisulfito de sodio , este método ha sido adoptado por el AOAC.

Otras nuevas técnicas se basan en HPLC pero no parecen aportar grandes ventajas.

2.5 Modelo Matemático de Predicción(Termogeneración HMF)

Es bien sabido desde hace mucho tiempo que debido a la acidez de la miel y su acción sobre la fructosa a condiciones ambientales de almacenamiento o de elevadas temperaturas durante el proceso , elevan la concentración de HMF .Muchos autores muestran en sus resultados , que aparentemente la producción de HMF en miel , es un evento de extrema variabilidad , por lo que no se ha podido establecer una fórmula que prediga exactamente el efecto de

almacenamiento y calentamiento sobre el contenido de HMF en miel (White-1980B)

White et al (1964) encontraron una relación lineal entre temperatura de almacenamiento de miel y el logaritmo del tiempo requerido para acumular una cantidad dada de HMF. Tiempo después encontraban que al graficar la temperatura contra días de exposición para lograr desarrollar 4 y 20 mg HMF/100g miel, daría por resultado dos líneas rectas, que implicarían de alguna manera como se comporta la termogeneración de HMF. (White-1980A)

Más aún, Singh et al. (1948) predijeron una reacción de primer orden y sugirieron un mecanismo de reacción. Se sabe además que la concentración inicial de HMF y la humedad intervienen en la formación de HMF. (Shade et al-1958)

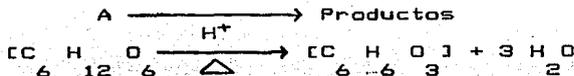
Una cinética Química implica el estudio de las velocidades de reacción, el análisis de estas y su dependencia respecto a los factores que las determinan (Temperatura, Presión, Concentración de Reactivos, Catalizadores, etc.) permite conocer mucho sobre las etapas por las que los reactivos se transforman en productos.

Para medir la velocidad de reacción se debe reconocer que las concentraciones de todas las especies presentes varían con el tiempo cambiando las propiedades del sistema, se habrá de seleccionar una propiedad (que permita mediciones precisas) que pueda relacionarse con la composición del sistema en función del tiempo, los datos obtenidos nos hablarán de las variaciones de concentración con respecto al tiempo. (Castellan - 1976)

DEDUCCION DEL MODELO MATEMATICO DE PREDICCION DE FORMACION
DE HMF BASADO EN UNA CINETICA DE PRIMER ORDEN

Reacción de primer orden;

De la forma



Por definición :

1)
$$+\frac{d}{dt} C = KC$$

2)
$$+\frac{d}{C} C = K dt$$

Integrando :

3)
$$+\int \frac{d}{C} C = K \int dt$$

Aplicando límites :

lim $t = 0$ $C = C_0$

$t = t$ $C = C_f$

4)
$$+\int_{C_0}^{C_f} \frac{d}{C} C = K \int_0^t dt$$

5)
$$+\ln \frac{C_f}{C_0} = K t$$

6)
$$\ln C_f = \ln C_0 + K t$$

Despejando :

7)
$$C_f = C_0 e^{\frac{Kt}{}}$$

De la ecuación de Arrhenius :

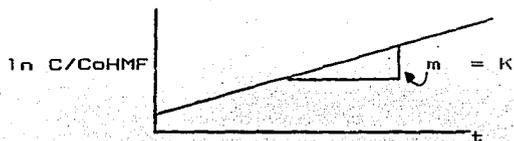
8)
$$K = A e^{-E_a/RT}$$

Sustituyendo 8 en 7 obtenemos la ec. No. 9 que es el :

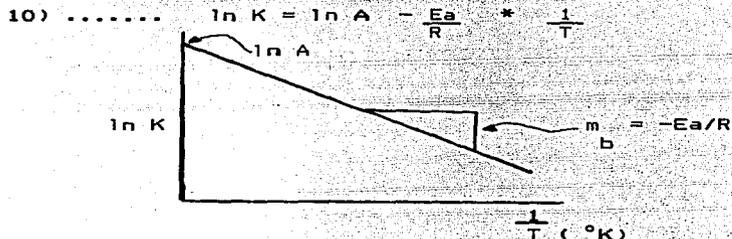
Modelo primer orden de predicción de termogeneración HMF

9)
$$C_f = C_0 e^{(A e^{-E_a/RT}) * t}$$

Para determinar representar graficamente :



La Ea (Energía de activación) se expresa gráficamente como :



Donde :

$$m_b = -\frac{E_a}{R}$$

Este mismo modelo puede ser interpretado a través de los valores ID , IZ y Q_{10} , que son parámetros de proceso térmico. El valor ID puede considerarse como un inverso del valor clásico D , respecto a la reducción decimal de microorganismos, pero en este caso como formación de HMF.

El valor IZ se considerará entonces como la temperatura necesaria para que se modifique decimalmente el tiempo en que se verá afectada la concentración de HMF.

Los valores ID , IZ , Q_{10} , K y E_a están íntimamente relacionados e incluso pueden ser intercambiados ya que todos ellos evalúan, aunque de diferente manera la formación de HMF (Metodología 3.8). (Valle Vega-1985)

3.- METODOLOGIA

3.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

Si la muestra está libre de cristales ,se mezcla perfectamente removiendo o agitando ; si se tienen cristales ,se mete el envase cerrado en baño María sin sumergirlo , y se calienta durante 30 minutos a 60 grados centígrados.Luego , si es necesario ,se hace llegar la temperatura a 65 grados centígrados o hasta que la miel se licúe.

Es esencial agitar de vez en cuando . Tan pronto como la muestra se licúe , mezclar perfectamente y enfriar rápidamente.

Cuando lo que se desea es determinar Hidroximetilfurfural o actividad diastásica , no se debe calentar la miel . Si hay alguna materia extraña como : cera , palillos , abejas , partículas del panal , etc. ,se calienta la muestra al baño María hasta 40 grados C y se filtra a través de una estopilla colocada en un embudo con circulación de agua caliente , antes de tomar la muestra. (Codex Alimentarius- 1969)

3.2 EVALUACION DE LA CALIDAD

Se tomaron 3 muestras aleatoriamente de 5 lotes de miel virgen sin adulterar , traídas de fuentes conocidas en Oaxtepec ,Edo. de Morelos , México , a estas muestras que se denominarán "Lotes de miel controlada" se les realizaron

los siguientes análisis por triplicado : % Humedad , % de Cenizas , % Azúcares Reductores Diréctos , Acidez Titulable e Hidroximetilfurfural . Las técnicas utilizadas son las propuestas por la Norma Regional Europea elaborada por la comisión mixta FAO-OMS del Codèx Alimentarius (1969) , excepción hecha de las técnicas de Hidroximetilfurfural método espectrofotométrico , y la determinación de Azúcares Reductores , para la que la norma propone el método de Fehling modificación de Lane-Eynon-Soxlet , no obstante se prefirió usar el método del Ac. 3,5-Dinitrosalicílico (D.N.S) modificación de Bernfeld , utilizando la correlación Altamirano-Ibañez (1984) .

3.3 DETERMINACIONES PROPUESTAS POR LA NORMA REGIONAL EUROPEA

3.3.1 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Basado en el método Refractométrico de Chataway (1932) revisado por Wedmore (1955).

Determinar el índice de refracción de la muestra de ensayo utilizando un refractómetro a temperatura constante , próxima a los 20 ° C. Convertir la lectura en contenido de Humedad (Por ciento m/m) , utilizando la tabla de equivalencias que se indica " : (APENDICE Num. 1)

(Codex Alimentarius - 1969)

3.3.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE SUSTANCIAS MINERALES (CENIZAS)

-Calcinación de la miel-

La miel (5-10 g) se pesa exactamente y se coloca en una cápsula de platino o sílice calcinada , previamente pesada , y se calienta suavemente en un horno de mufla hasta que la muestra ennegresca y seque , atendiendo las recomendaciones que dicta la Norma . Puede utilizarse también una lámpara de rayos infrarrojos para carbonizar la muestra antes de introducirlo al horno-mufla.

A continuación , calcinar la muestra a 600 ° C. hasta peso constante. La muestra se enfría antes de pesarla.

Los resultados se expresan en porciento de cenizas(m/m).

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - \text{peso crisol}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

(Codex Alimentarius 1969)

3.3.3 DETERMINACION DE LA ACIDEZ

- Reactivos -

Hidróxido de Sodio 0.1 N (Libre de carbonatos).

Fenolftaleína al 1% m/v en Etanol neutralizado.

Agua Destilada recientemente hervida y fría.

Pesar la miel (10 g) y disolverla en 75 ml de agua destilada , titular la muestra (Triplicado) con la solución de NaOH utilizando como indicador 4 o 5 gotas de Fenolftaleína . El color del punto final deberá persistir durante 10 seg. Para muestras de color oscuro se tomará menor cantidad de miel .

Los resultados se expresan en miliequivalentes de

Acido/Kg de miel y se calculan de la forma siguiente:

$$A c i d e z (m e q) = 10 V$$

Donde V = Volumen gastado de NaOH 0.1N en mililitros utilizados en la neutralización de 10 g de miel.

(Codex Alimentarius 1969)

3.3.4 DETERMINACION FOTOMETRICA DEL CONTENIDO DE HIDROXIMETILFURFURAL (H.M.F.)

Basado en el método Winkler (1955)

Reactivos: Solución de Ac Barbitúrico 500 mg/100 ml

Solución de p-toluidina 10 g/100 ml propanol

Se siguen las indicaciones de la Norma para la preparación de los reactivos.

Muestra : Se pesan 10 g de la muestra de miel y se disuelve sin calentar en 20 ml de agua desionizada

Se trasvasa esta solución a un matraz de 50 ml y se completa hasta el aforo (solución de miel) .La muestra deberá someterse a ensayo inmediatamente después de preparada.

Determinación: Se ponen 2 ml con pipeta volumétrica , de la solución de miel en cada uno de dos tubos de ensaye , se añade a cada uno de ellos 5.0 ml de solución de p-toluidina .A uno de los tubos añadir 1 ml de agua y al otro 1 ml de solución de ac. Barbitúrico , agitar ambas mezclas . El tubo con agua servirá como blanco .La adición de los reactivos debe hacerse ininterrumpidamente y determinarse en uno o dos minutos. Inmediatamente después de haber alcanzado

el valor máximo , leer la absorbancia de la muestra contra el blanco en un espectrofotómetro a long.de onda=550 nm , empleando una celda de 1 cm. Los resultados se expresan en mg de HMF por Kg de miel.

El método se puede verificar utilizando una solución patrón de Hidroximetilfurfural (HMF) normalizado , disolviendo HMF comercial o preparado en el laboratorio , y ensayando espectrofotométricamente donde E= 16,830 a 284 nm empleando patrones de 0 - 300 microgramos.

La siguiente ecuación permite calcular aproximadamente los resultados :

$$\text{mg H M F / 100 g de miel} = \frac{\text{Absorbancia} \times 19.2}{\text{Espesor de la celda}}$$

(Codex Alimentarius - 1969)

3.4 DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS

(Altamirano-Ibañez 1984 basado en Sumner J.1921)

- Reactivos -

10 g de Ac. 3,5-Dinitrosalicílico (D.N.S.) se suspenden en aproximadamente 200 ml de agua destilada ; se añade NaOH (16 g en 150 ml de agua) gota a gota bajo buena agitación calentando un poco si es necesario , se adicionan 300 g de Tartrato doble de Sodio y Potasio , aforar a un litro y reposar en la oscuridad.

- Preparación de la muestra -

Se pesan con exactitud entre 0.1 y 0.2 g de miel trasladar cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml y completar hasta el aforo con agua.

- Técnica -

Se hace reaccionar 1 ml de la solución problema con 1 ml de la solución de Ac. Dinitrosalicílico (D.N.S.) y se lleva a ebullición en un baño de María durante 5 minutos, enfriándose inmediatamente después, en un baño de hielo. Se agregan 10 ml de agua destilada, se deja en reposo por algunos minutos después de mezclar perfectamente, y se efectúa la determinación de absorbancia a una Long. de Onda = 540 nm con celdillas de long. = 10 mm.

Se construye una curva patrón de concentración con mezclas equimoleculares de Glucosa-Fruktosa en un intervalo de concentración de 0 - 2 g/l. Se interpola el valor de absorbancia de la muestra problema y se encuentra la concentración equivalente.

Los resultados se expresan como % de Reductores Directos:

$$\% \text{ Red. Dir.} = \frac{\text{mg/ml de Az.Red.Dir.en la muestra}}{\text{mg/ml de muestra}} \times 100$$

(Altamirano-Ibañez 1984)

3.5 Síntesis de (5-Hidroximetilfufuraldehído) H.M.F

Este método se basa en el procedimiento Haworth-Jones 1944 mismo que se modificó de acuerdo al procedimiento siguiente:

Una solución que contiene 100 g de Sacarosa Q.P. + 0.7 g de Acido Oxálico hidratado por cada 300 ml de agua, se enlató (en lata 307 x 409) con un espacio libre de aproximadamente 10 mm (aire) se selló por medio de una

engargoladora. Las latas se sometieron a tratamiento térmico 121 grados centígrados , en una autoclave , llevandose a cabo en dos etapas en el mismo lote :

- 1^a a 2.3 atm (Presión cámara interna autoclave) por 15 min.
- 2^a a 2.0 atm (Presión cámara interna autoclave) por 2.5 hrs.

Después de éste tratamiento se enfría a temperatura ambiente y se neutraliza con Carbonato de Calcio . A cada 300 ml de solución se le adicionan 5 g de Acetato Básico de Plomo (con objeto de remover impurezas) se le agitó durante 1.5 hrs. , el producto se centrifugó (3000 rpm 5 min), separándose un filtrado amarillo claro acuoso ,del que se extrajo repetitivamente (5-7 veces) con Acetato de Etilo (50 ml por cada extracción) el HMF.

Los extractos orgánicos se secaron sobre Sulfato de Sodio anhidro , después se concentró en rotavapor , se hacen lavados sucesivos con Eter de Petróleo se obtiene de ésta manera un líquido café aceitoso , se decanta el Eter de Petróleo y se calienta ligeramente para evaporar cualquier residuo y se lleva a congelación (-4 C).

Se obtienen agujas blancas ligeramente teñidas por un halo amarillento . Se protege de la luz, el aire y la humedad.

Se obtienen espectros Ultravioleta e Infrarrojo para caracterizarlo,

La pureza del HMF sintetizado se determinó en base a Mét. Turner (1954) se prepara una solución de H.M.F. de conc. aproximadamente 0.08 g/l pesados con precisión 0.0001 g. disueltos en agua y se hace una curva patrón con alícuotas

de 0 a 2 ml , completando a 10 ml con metanol grado espectrométrico , se mide la absorbancia a long. de onda= 284 nm y se grafican estos valores contra volumen de solución HMF . Se interpola el valor de volumen= 1 ml de solución y se registra el valor de absorbancia correspondiente , se sustituye en :

$$\text{PUREZA (\%)} = \frac{\text{Absorbancia } 284 \text{ nm} \times 7.4937611 \text{ g/l}}{\text{Conc.de solución HMF g/l}}$$

$$\text{Factor : } \frac{126.12}{16,830} \times \frac{10}{1} \times 100 = 7.4937611 \text{ g/l}$$

Donde : 126.12 = Peso molecular HMF (g/mol)

16,830 = Absortividad molar (E) del HMF a 284 nm
(l/mol cm) Turner-1954

10 = Dilución

1 = Longitud de las celdas (cm)

100 = Expresión en Porciento

3.6 DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL CONTENIDO DE HIDROXIMETIL FURFURAL EN MIEL DE ABEJA

Basado en el método de White (1979)

Reactivos:

Solución de Carrez I ;

Disuelva 15 g de $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y diluya
a 100 ml con agua.

Solución de Carrez II ;

Disuelva 30 g de $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y diluya con
100 ml de agua.

Solución de Bisulfito de Sodio 0.20 % ;

Disuelva 0.20 g de NaHSO_3 (grado técnico es satisfactorio) y diluya a 100 ml con agua. En caso de ser necesario diluya 1+1 la solución para referencia.

Procedimiento:

Cuidadosamente medidos se pesan 5 g de miel en un pequeño matraz y se transfiere con un total de 25 ml (medidos) a un matraz volumétrico de 50 ml. Añada 0.5 ml de sol. de Carrez I, se mezcla, se adiciona 0.5 ml de sol. de Carrez II se mezcla y se afora con agua. Se puede añadir una gota de alcohol para eliminar la espuma de la superficie. Se filtra a través de papel, desechando los primeros 10 ml del filtrado.

Se pipetea 5 ml de filtrado en cada uno de dos tubos de ensayo de 18 x 150 mm y 5 ml de agua en uno de los tubos (muestra) y 5 ml de sol. de Bisulfito en el otro tubo, (blanco o referencia). Se mezcla perfectamente (un mezclador vortex puede ser muy útil) y se determina la absorbancia de la muestra contra la referencia a 284 y 336 nm en un espectrofotómetro Ultravioleta. Si la absorbancia es muy alta para su medición exacta (> 0.6), se diluye la muestra con agua tanto como sea necesario y la referencia también en la misma proporción pero con solución de Bisulfito de Sodio 0.1 %. Multiplique los valores de absorbancia por el factor apropiado de dilución antes de realizar los cálculos.

Calculos:

$$\text{HMF (mg/100 g de miel)} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 14.97 \times 5}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\text{Factor} = \frac{126}{16,830} \times \frac{1000}{10} \times \frac{100}{5} = 14.97$$

Donde : 126 = Peso molecular HMF

16830 = Absortividad molar (E) del HMF a 284 nm

1000 = mg / g

10 = centilítros / l

100 = g de miel reportados

5 = Peso nominal de la muestra

(A.O.A.C.-1984)

Con el fin de conocer la técnica del nuevo método de White - bisulfito se procede a cuantificar cantidades conocidas de un estándar de HMF (En este caso de Sigma - Labs.) agregadas en muestras de miel idénticas posteriormente se evaluará el % de HMF recuperado como diferencia a la concentración inicial de las muestras de miel los resultados se compararán con la literatura.

3.7 CORRELACION ENTRE METODOS P-TOLUIDINA Y BISULFITO

Se realizó un cuadro de soluciones de un estándar de HMF (Fuente: Sigma Laboratories U.S.A.) con una pureza reportada del 95 % (que se toma en cuenta para la concentración), se hace una solución de 100 ppm de HMF y se hacen diluciones de tal manera que se consigan más o menos concentraciones de 90,80,70,60,50,40,30,20 y 10 mg/l mas la solución inicial.

1.- Se realizan curvas estandar por triplicado para los métodos:

- Método Winkler (ver metodología 3.3.4)
- Método White-Bisulfito (ver metodología 3.6)

2.- Se mide por ambos métodos el estandar preparado en el laboratorio y la concentración se obtiene por interpolación.

3.- Las lecturas de absorbancia obtenidas de uno y otro método se comparan a un mismo nivel de concentración, esto permitirá ver de que manera varían uno con respecto al otro al cambiar la concentración. Graficar Absorbancia Winkler contra Absorbancia-White Bisulfito y establecer la correlación entre métodos.

Los métodos de Winkler y White son evaluados por regresión lineal (correlación ver apéndice # 2) tomando como datos (X,Y) las absorbancias correspondientes a un mismo nivel de concentración.

3.8 DETERMINACION DE LA CINETICA DE FORMACION DE HMF

Una vez que se cuenta con un lote homogéneo de miel controlada (miel virgen que este dentro de norma, sin adulterar, sin tratamiento térmico y proveniente de abejas que no fueron alimentadas con sacarosa directamente) se preparan 8 muestras idénticas aproximadamente de 0.5 Kg cada una en recipientes de vidrio iguales de boca ancha con tapa hermética, con capacidad de 1 litro.

En seis estufas calibradas (se conoce la incertidumbre de variación de temperatura) se coloca un

frasco en cada una de ellas , al centro , alejadas de las paredes y de la fuente de calor de las estufas y dos lotes se guardaron en un lugar oscuro fresco y seco , uno servirá para la determinación a temperatura ambiente y el otro de reserva y como control . Pegado a cada frasco se coloca un termómetro de modo que cada vez que se muestree se obtenga una lectura de la temperatura de almacenamiento .

Las temperaturas de trabajo y los intervalos de muestreo de cada temperatura se mencionan en el siguiente cuadro :

TEMPERATURAS DE TRABAJO E INTERVALOS DE MUESTREO

Temperatura	Muestrear cada :
Ambiente (21 °C + 1 °C)	18 - 19 Días
28 °C + 0.2 °C	9 - 11 Días
32 °C + 1.4 °C	5 - 6 Días
39.5 °C + 1.8 °C	2 - 3 Días
46 °C + 0.7 °C	1 - 2 Días
57 °C + 2.6 °C	2 - 3 Horas
66 °C + 2.7 °C	1 - 2 Horas

El día que corresponda muestrear , se acude a la estufa indicada , se saca el frasco en cuestión e inmediatamente se lee la temperatura , a continuación se abre el recipiente y con una espátula se homogeniza lo mejor posible , se toman 3 muestras de 5 g medidas con precisión 0.001 g , tratando que esta operación tome el menor tiempo posible . Se verifican los cambios que ocurren y se verifica que no exista ningún tipo de anomalías (P.ej.

fermentación) se cierra el frasco firmemente y se guarda con su correspondiente termómetro.

A las muestras se les analiza HMF con el método White - Bisulfito (Metodología 3.6), se saca la media de las tres lecturas determinándose también la desviación estandar de las muestras. Para cada temperatura se lleva un registro de concentración (mg HMF / Kg de miel) contra tiempo (Días). Cuando se alcanza el valor máximo de HMF propuesto por la Norma Regional Europea (40 mg HMF/Kg miel) se finaliza el tratamiento. Una vez que se tienen todos los datos promediados, se calcula para cada dato el cociente $C/Co = \text{Concentración} / \text{Concentración inicial}$ mismo del que se obtiene el logaritmo natural \ln , para cada temperatura. Se traza una gráfica de $\ln C/Co$ vs. tiempo (días) tal gráfica corresponde al modelo de primer orden $\ln C/Co = Kt$ donde la pendiente de esa gráfica equivale a la constante de velocidad (K) de formación (de primer orden) de HMF, a la temperatura correspondiente. Para obtener la energía de Activación se obtiene el \ln de las constantes K, sus temperaturas se transforman a grados Kelvin, se calcula el inverso para cada temperatura y se construye con estos datos una gráfica que siga la ecuación de Arrhenius: $[\ln K = \ln A - Ea / R * 1 / T]$ donde la pendiente (m) de esa curva será $m = -Ea/R$ despejando $-Ea = m(R)$ donde R corresponde a la constante $R = 1.98 \text{ cal/mol } ^\circ K$.

Para obtener el parámetro de incremento decimal (ID) de HMF respecto al tiempo, se obtiene con el inverso de concentración ($1 / C$) y el tiempo correspondiente,

graficando $1/C$ vs. Tiempo, se encontrará la pendiente que sustituida en la formula $ID = -1/m$ nos dá por resultado el parámetro ID . Otra forma de calcular ID a cada temperatura es con las constantes de velocidad primer orden K con la formula $ID = 2.303 / K$.

Para obtener el tiempo de formación térmica (TFT) del HMF se calcularán los logaritmos del incremento decimal ($\log ID$) y graficándolos vs. Temperatura se obtiene el inverso negativo de la pendiente el parámetro IZ el cual representa la temperatura necesaria para que se afecte decimalmente el tiempo en que se verá afectada la concentración de HMF.

Finalmente el valor Q_{10} indica que por cada aumento en $10^\circ C$, se aumenta en forma ordenada la velocidad de generación y en que proporción lo hace, el modo de calcularlo:

$$Q_{10} = \frac{10}{IZ}$$

o bien por:

$$Q_{10} = \frac{KT + 10}{KT}$$

donde : $KT + 10 =$ La constante de primer orden a 10 grados centígrados de diferencia respecto a una temperatura de referencia.

$KT =$ Constante de primer orden a una Temp. de referencia.

(Valle y Merson 1983)

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis bromatológico realizado a lotes de miel controlada , para el modelo de generación de Hidroximetilfurfural los resultados se muestran en el cuadro 4.1.

Cuadro 4.1 ANÁLISIS BROMATOLOGICO

<u>Determinación</u>	<u>Valor Norma</u>	<u>Encontrado</u> <u>\bar{x}</u>	<u>Desviación</u> <u>Estandar</u>
Acidez (meq/Kg)	No más de 40	35.740	1.060
Cenizas (%)	No más de 0.6	0.1408	0.026
Humedad (%)	No más de 21	16.860	0.060
Az.Red.Dir. (%)	No menos de 65	77.800	2.460
H M F (mg/Kg)	No más de 40		
a) Método Winkler -----		6.190	2.210
b) Método White -----		6.270	1.470
Maltosa , Az.Superiores			
y Sacarosa aparente (%)		5.15	*
*Calculado por diferencia:			

Se puede apreciar que los lotes de miel controlada , analizados se encuentran dentro de los límites que propone la Norma Regional Europea , además de contener una baja concentración inicial de Hidroximetilfurfural.

En la utilización del método D.N.S. para Azúcares Reductores Directos es necesario tener precaución con el tiempo de desarrollo de color (5 minutos) , ya que el tiempo está relacionado con la intensidad del color , si no se controla este parámetro redundará en resultados erróneos.

Para hacer el resultado comparativo con la Norma , que utiliza el metodo de Fehling ; se sigue la correlación Altamirano-Ibañez (1984) entre ambos métodos :

$$\% \text{ RED.DIRECTOS (Fehling) } = 4.55 + 0.92(\% \text{ RED.DIREC.D.N.S.})$$

-Síntesis Hidroximetilfurfural

Durante la obtención fue importante eliminar todo el Acetato de Etilo , de otro modo no se logra la cristalización , por ésto son importantes los lavados con Eter de Petróleo , cabe recordar que el Acetato de Etilo es soluble en Eter de Petróleo y el HMF no lo es.

El producto obtenido se llevó al departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM , donde le fueron realizadas espectrometrías Ultravioleta e Infrarrojo utilizando metanol grado espectrométrico como disolvente. Los espectros resultantes se comparan con los de referencia que reporta la literatura (SADTLER -1966).

Se encuentra que los espectros tanto de la muestra como de la referencia son idénticos en sus bandas de absorción , a las mismas longitudes de onda y de magnitud equivalente .

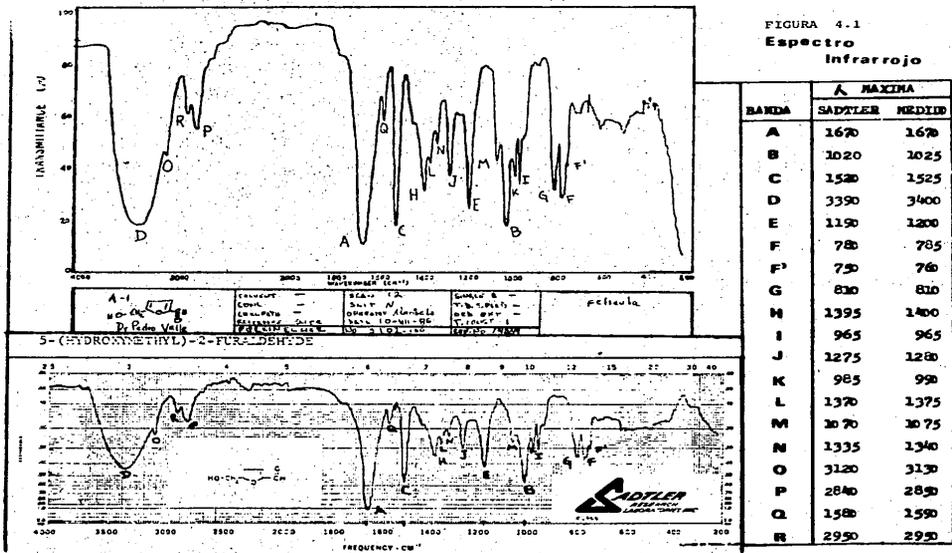
Se concluye por tanto que se trata de Hidroximetilfurfural con una pureza aceptable. Figs. 4.1y4.2

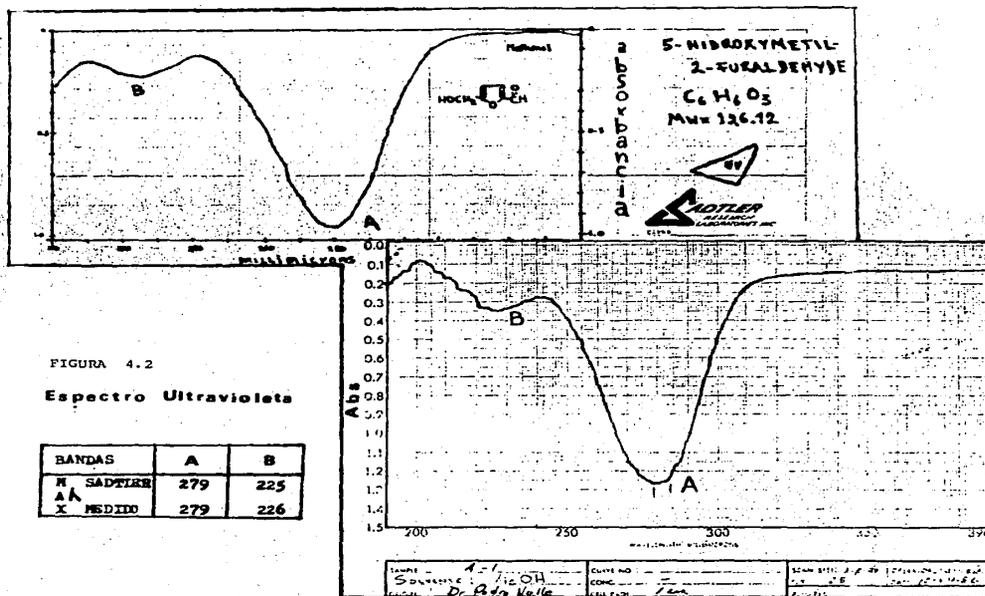
En el cálculo de la pureza (Metodología 3.5) la lectura de absorbancia para vol = 1 ml fue de A = 1.45 a una long. de onda de 284 nm y la concentración de la solución de HMF fue: 0.1115 g/l , sustituyendo en la formula propuesta;

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{1.41 \times 7.4937611 \text{ g/l}}{0.1115 \text{ g/l}}$$

$$\text{Pureza} = 94.76 \%$$

FIGURA 4.1
Espectro
Infrarrojo





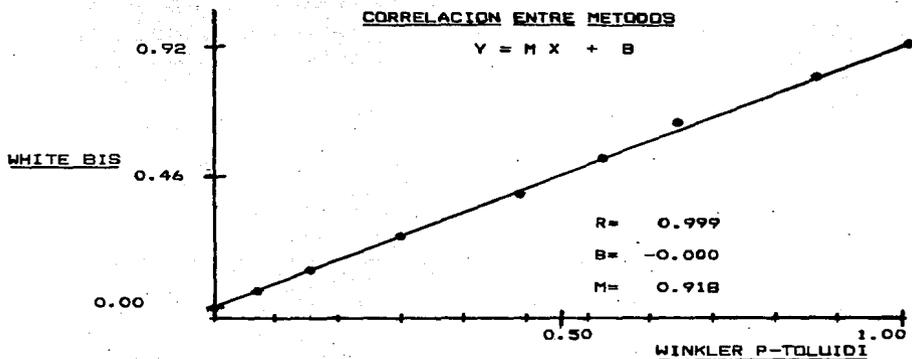
Al calcular la pureza interpolando lecturas en la curva estandar HMF-Sigma por los métodos Winkler y White se obtuvo una pureza promedio de 80.5 % para el HMF sintetizado en el laboratorio , la diferencia puede deberse en parte a que cuando se midió por los métodos Winkler y White el compuesto obtenido tenfa ya un mes de sintetizado y a pesar de habersele almacenado a baja temperatura y humedad , en la oscuridad , se asume que algo de HMF se descompone . Por otro lado los métodos de Winkler y White son especificos para HMF .La lectura directa UV puede involucrar otros compuestos furanolicos que absorben a la misma longitud de onda (Hase S.et al - 1973).De cualquier manera es posible obtener en el laboratorio por un método sencillo , un estandar de calibración con un buen grado de pureza ya que el que se consigue comercialmente , además de ser importado (con los inconvenientes que ésto implica),su costo es elevado (1 g HMF = \$ 15.50 US.Dlls.1987 Sigma Labs.).

Con vista a conocer a fondo el nuevo método para la cuantificación de HMF (White-Bisulfito) se hicieron varias determinaciones , agregando a muestras de miel , cantidades conocidas de estandar HMF-Sigma , midiéndose posteriormente la concentración de HMF y evaluando el % de HMF recuperado, las cantidades añadidas (de 0 a 27.2 mgHMF/100 g) muestran que el método funciona bien (\bar{x} recuperación = 91%) en cualquier rango de concentración , pero lo hace mejor si se mide cerca de los lfmities que marca la Norma Regional Europea.

El estudio realizado por White(1979) reporta un % de recuperación aún mayor (96.9 % S=1.9) lo que habla de la repetitividad del método por lo que se recomienda el método White-Bisulfito. (White 1979-A)

-Correlación entre métodos para determinación HMF

Conforme al procedimiento propuesto(Metodología 3.7) la gráfica-resultado de correlación entre métodos se muestra FIG 4.3.



Para éste análisis estadístico y los sucesivos se elaboró un programa estadístico de regresión lineal (Correlación), para mayor información ver apéndice # 2.

Se encuentra que existe una correlación bastante alta entre el método White y el método Winkler $R = 0.999$, la literatura también menciona éste hecho (White-1979), por otro lado se debe recordar que el método White-bisulfito no emplea reactivos tóxicos ni de difícil adquisición, es más rápido, económico, estable, reproducible y eficiente, no tiene los inconvenientes del método Winkler-P-Toluidina y si cuenta con su precisión. Es ya en método oficial para el AOAC. (AOAC-1984)

Para hacer comparativos los resultados con la Norma Regional Europea utilizar la corrección:

$$\text{Absorbancia Winkler} = \frac{\text{Absorbancia White}}{0.9190875}$$

Ultimamente se han experimentado otras técnicas en la detección de HMF, tales como la Cromatografía Líquida Alta Presión HPLC, la cual se ha utilizado para analizar Jugos de cítricos enlatados y licores, cuantificando con éxito HMF (Mijares-1986, Jeuring-1980, Hyoung-1986). Se encontró un reporte de esta técnica para miel, que manifiesta que no existe mucha diferencia entre el método Winkler que aprueba la Norma Regional Europea y el método HPLC $\Delta \bar{X} = 0.41$, Desv. Std. = 0.32; $t = 3.71$ (Jeuring-1980) sin embargo es mejor la correlación reportada entre el método Winkler y el método White-bisulfito $\Delta \bar{X} = 0.23$, Desv. Std. = 0.138; $t = 1.67$ (White-1979-A).

-CINETICA DE FORMACION DE HMF

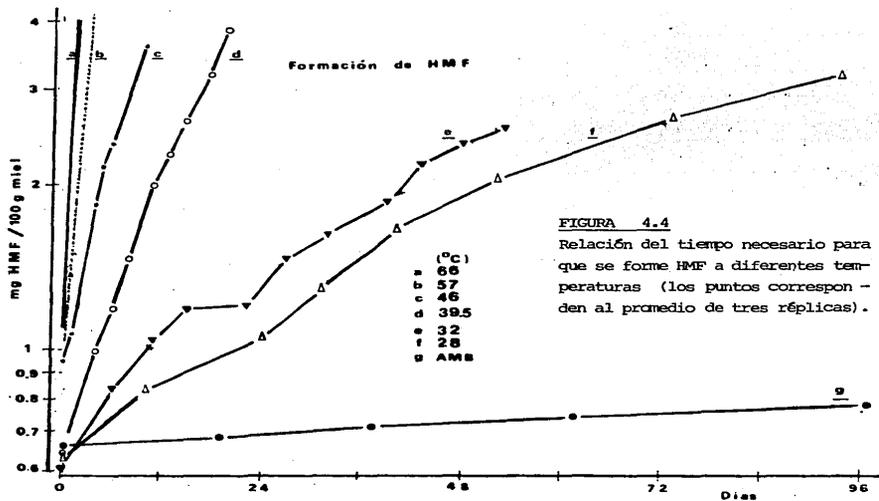
Se procedió como se indica en metodología 3.8 , inicialmente se grafican todos los valores de concentración encontrados respecto al tiempo , a diferentes temperaturas de almacenamiento (Temp. ambiente, 28, 32, 39.5, 46, 57 y 66 °C) Fig. 4.4 y Cuadro 4.3.

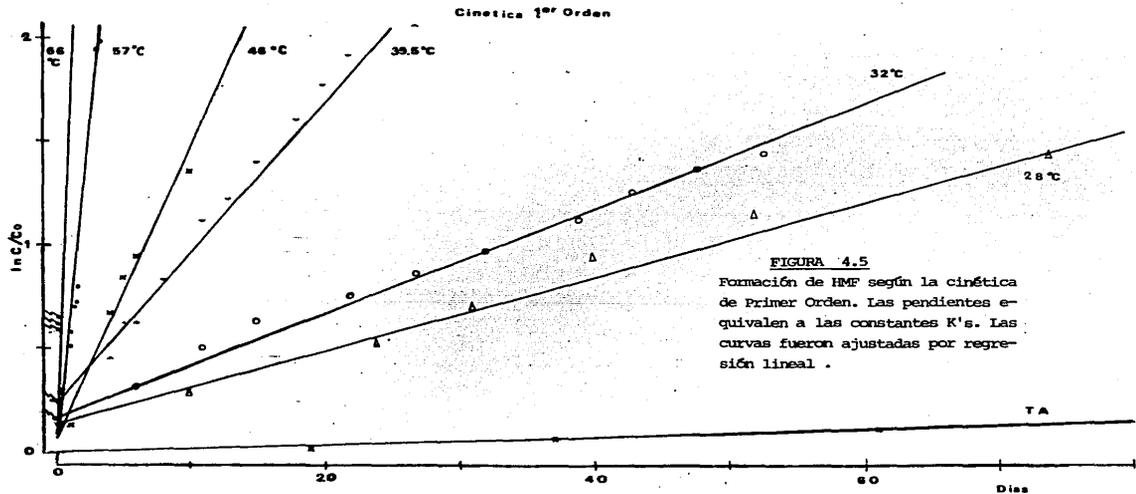
Resulta evidente que la escala utilizada es semilogarítmica y el comportamiento es casi lineal por lo que se puede identificar un seguimiento de cinética de primer orden , tal como se ha discutido anteriormente.

Cuadro 4.3 Parámetros de la cinética de primer orden.

T°C	T°K	K(días ⁻¹)	Correlación de Datos	ln K	1/T°K x 10 ⁻³
AMB	290	0.001563	0.985323	-6.4611	3.45
28	301	0.017448	0.981551	-4.0485	3.32
32	305	0.024914	0.985178	-3.6923	3.28
39.5	312.5	0.071856	0.982541	-2.6331	3.20
46	319	0.138469	0.987776	-1.9771	3.13
57	330	0.601659	0.993068	-0.5081	3.03
66	339	1.644089	0.952525	0.4977	2.95

La generación de HMF según un modelo de cinética de primer orden postula la interacción de ln C/Co respecto al tiempo , al graficar estos valores obtendremos curvas cuya pendiente representa la constante K(días⁻¹) a la temperatura correspondiente , las correlaciones encontradas para cada curva muestran una relación lineal (de alta correlación) tal como se esperaba . Cuadro 4.3 y Fig. 4.5





A través de la ecuación de Arrhenius, se puede encontrar la Energía de Activación (E_a) que es necesaria para la formación de HMF, para esto se expresa la temperatura en grados Kelvin, tomando los datos del cuadro 4.3 y construyendo una gráfica de la forma $\ln K = \ln A - E_a/R * 1/T$ (FIG.4.6), se obtiene de la pendiente la energía de Activación ($m = -E_a/R$) considerando R como $1.98 \text{ cal/}^\circ\text{Kmol}$ obtenemos una E_a de $26,532 \text{ cal/mol}$. La ordenada al origen es el \ln del factor de frecuencia A que en este caso tiene un valor de 2.62×10^{17} . La correlación de estos puntos es satisfactoriamente alta (0.9954671), por lo que se puede inferir que el modelo propuesto y los parámetros obtenidos por la ec. de Arrhenius son idóneos.

Aplicando estos valores al modelo matemático propuesto (Capítulo H.M.F. 2.5)

$$C_{\text{HMF}} = C_{o\text{HMF}} \cdot e^{(A \cdot e^{-E_a/R * 1/T})} * t$$

$$C_{\text{HMF}} = C_{o\text{HMF}} \cdot e^{(2.64 \times 10^{17} \cdot e^{-26,532/1.98 * 1/T})} * t$$

Análisis de unidades

$$\frac{\cancel{\text{cal}} \cancel{\text{mol}} \cancel{^\circ\text{K}}}{\cancel{\text{mol}} \cancel{\text{cal}} \cancel{^\circ\text{K}}}$$

MODELO MATEMATICO DE PREDICCIÓN (TERMOGENERACION)

$$\frac{C}{\text{HMF}} = \frac{C_o}{\text{HMF}} \cdot e^{\left(\frac{2.64 \times 10^{17}}{e^{-13,400 * 1/T}} \right) * t}$$

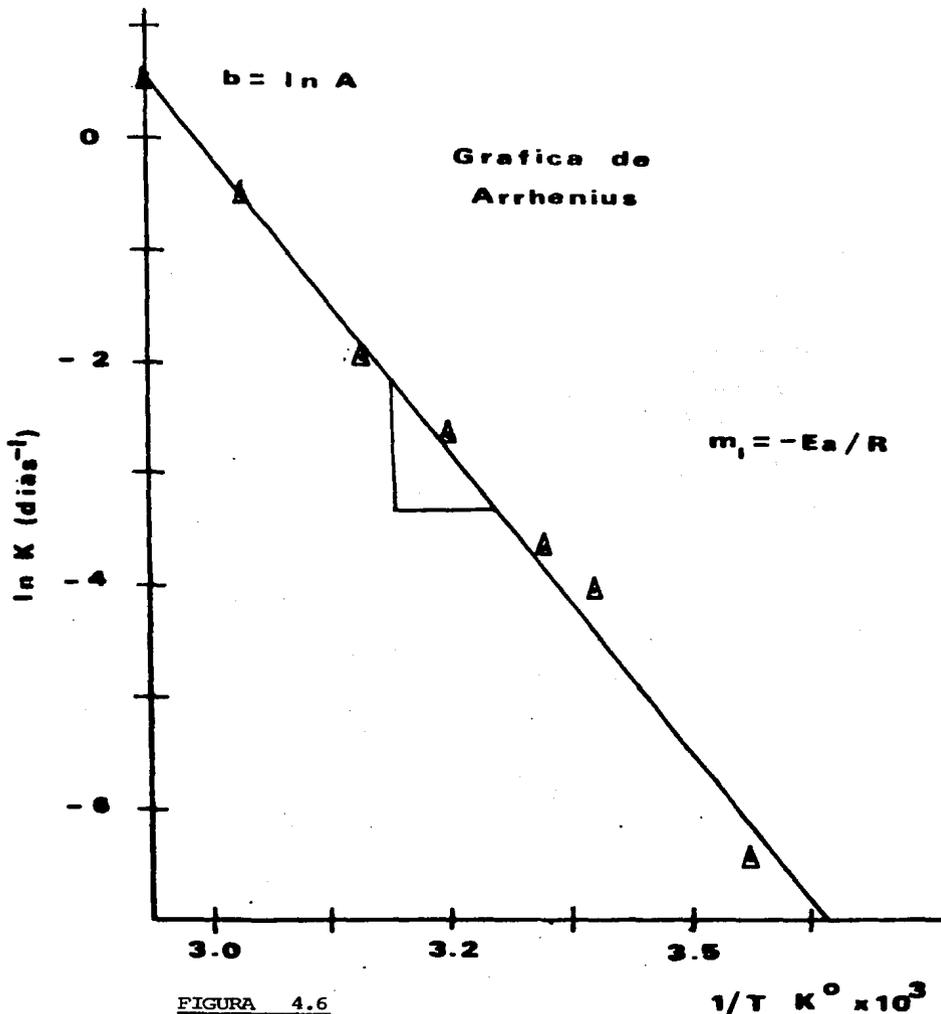


FIGURA 4.6

Gráfica de Arrhenius respecto a la formación de HMF. La temperatura esta en grados Kelvin.

Este modelo matemático puede ser programado en una calculadora , para mayor facilidad , sobre todo si se requiere predecir un gran número de datos (Apéndice # 3).

Se prueba el modelo de predicción con datos que se reportan en la literatura (Conc. inicial , Temperatura de almacenamiento y tiempo de almacenamiento . Se compara la concentración que predice el modelo con la concentración final reportada (Apéndice # 4) , se obtiene el % de variación (como : $\Delta C \times 100 / \text{Conc. Base}$) , y a estos datos se les analiza para obtener la media de variación y la desviación estandar (S) , como una medida de precisión del modelo. Los resultados se muestran en el cuadro 4.4 .

Cuadro 4.4 Precisión del modelo de predicción en base a comparaciones reportadas en la literatura.

<u>Fuente : Referencia</u>	<u>Número de muestras reportadas</u>	<u>Interv.de conc. HMF mg / 100g</u>	<u>\bar{X} variación (%)</u>	<u>Desviac. Estandar</u>
Guijosa-Pa- redes 1972	31	0.49 - 28.5	4.9	6.5
Hase S. et al 1972	32	1.80 - 3.90	9.6	11.2
Hadorn & Zurcher 1962	5	0.10 - 3.46	35.1	20.2
White et al. 1964	8	0.22 - 4.30	28.7	19.0
White J.W. 1980	28	0.40 - 4.20	10.8	6.5

El % de variación mayor se encontraron los datos reportados por White -1964 y Hadorn & Zurcher 1962 , se debe

aclarar que estas mediciones se hicieron con técnicas menos confiables (p - toluidina) y son referencias antiguas .

Se debe hacer notar que los intervalos de concentración en los que se maneja el modelo de predicción , caen dentro de los límites que recomienda la Norma Regional Europea , se encontró que aplicando el modelo fuera de 0.1 - 40 mg/Kg , la precisión disminuye notablemente , para ilustrar esto he aquí 3 casos :

Referencia White et al (1964) Concentraciones en mg/Kg

Temp. (°K)	tiempo (días)	C. o HMF	HMF medido	HMF modelo	% variación
323	4.16	25	<u>50</u>	<u>71</u>	42
333	1.87	<u>56</u>	<u>140</u>	<u>291</u>	108
341	2.00	3	<u>70</u>	<u>279</u>	298

Resulta evidente que el modelo predice eficientemente , si se conoce la concentración inicial y la temperatura de almacenamiento , la variación que se encontró no es muy alta si se considera la cantidad de factores que influyen en un sistema bioquímico.

Cabe mencionar que los datos obtenidos de la literatura son totalmente independientes del modelo propuesto en éste estudio y que el hecho de que concuerden en forma aceptable respecto las cantidades predichas y las reales son reflejo de la precisión y carácter general del modelo propuesto.

Por tanto se considera que el modelo encontrado cumple satisfactoriamente y que puede aplicarse para la predicción de la concentración de lotes de miel de abeja.

Un enfoque en la termogeneración de HMF puede evaluarse a través del incremento decimal (ID) de HMF respecto al tiempo , ya que representa el tiempo necesario para incrementar decimalmente la concentración de HMF a una temperatura fija. El valor ID se calculó como $ID = 2.303 / K$ a partir de las constantes de reacción (K) obtenidas en el estudio , los resultados se muestran en el cuadro 4.5

La figura 4.7 explica el tiempo de formación térmica representando una relación semilogarítmica . Entre la temperatura ($^{\circ}C$) y la expresión logarítmica ID (días) .

A temperaturas elevadas en la curva TFT el valor ID es pequeño , indicando que se requiere de pocos días para la formación de HMF , lo que da el parámetro IZ el cual puede ser calculado de la figura 4.7 siendo el intervalo de temperatura necesario para un cambio decimal en ID (días).

Cuadro 4.5 Datos del valor ID a dif. temperaturas

<u>T $^{\circ}C$</u>	<u>K (días⁻¹)</u>	<u>ID(días)</u>	<u>Log ID</u>
17	0.001563	1473.45	3.17
28	0.017448	131.99	2.12
32	0.024914	92.44	1.97
39.5	0.071856	32.05	1.51
46	0.138469	16.63	1.22
57	0.601659	3.83	0.58
66	1.644089	1.40	0.15

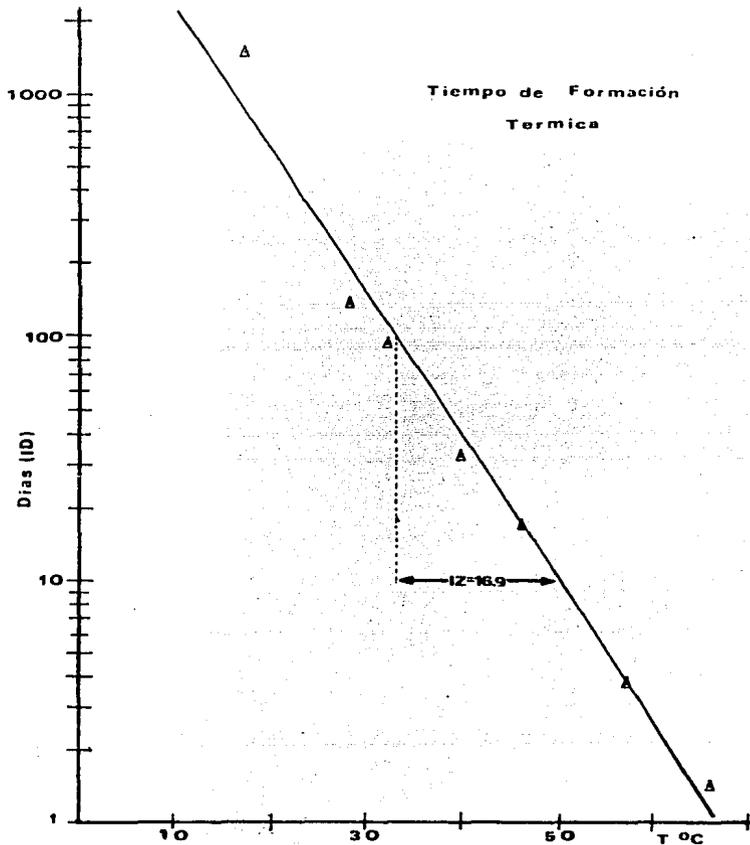


FIGURA 4.7

Termogeneración de HMF a diferentes -
días. El intervalo de temperatura para
un ciclo logarítmico es equivalente al
valor IZ (16.9 °C).

Otra forma de evaluar IZ es por medio de la curva TFT tiempo de formación térmica (Fig.4.8) esto es posible graficando Log ID vs. Temperatura (°C) la pendiente de dicha curva nos permite calcular IZ como $IZ(^{\circ}C) = -1/m$, por regresión lineal de log ID vs. temperatura, en nuestro caso :

$$IZ = 16.9 \text{ } ^{\circ}C \text{ método gráfico}$$

$$IZ = 16.96 \text{ } ^{\circ}C \text{ método curva TFT}$$

Finalmente el parámetro Q_{10} está directamente relacionado con la constante de primer orden, ya que al definirse como :

$$Q_{10} = \frac{K_{T+10}}{K_T}$$

representa el cambio que sufre la constante de velocidad de reacción al incrementarse la temperatura $10^{\circ}C$.
 Puede evaluarse como : $Q_{10} = 10^{10/IZ}$

y en el caso de la miel de abeja se encontró $Q_{10} = 3.89$ lo que implica que al aumentar la temperatura unos $10^{\circ}C$ la constante de reacción se incrementa casi 4 veces.

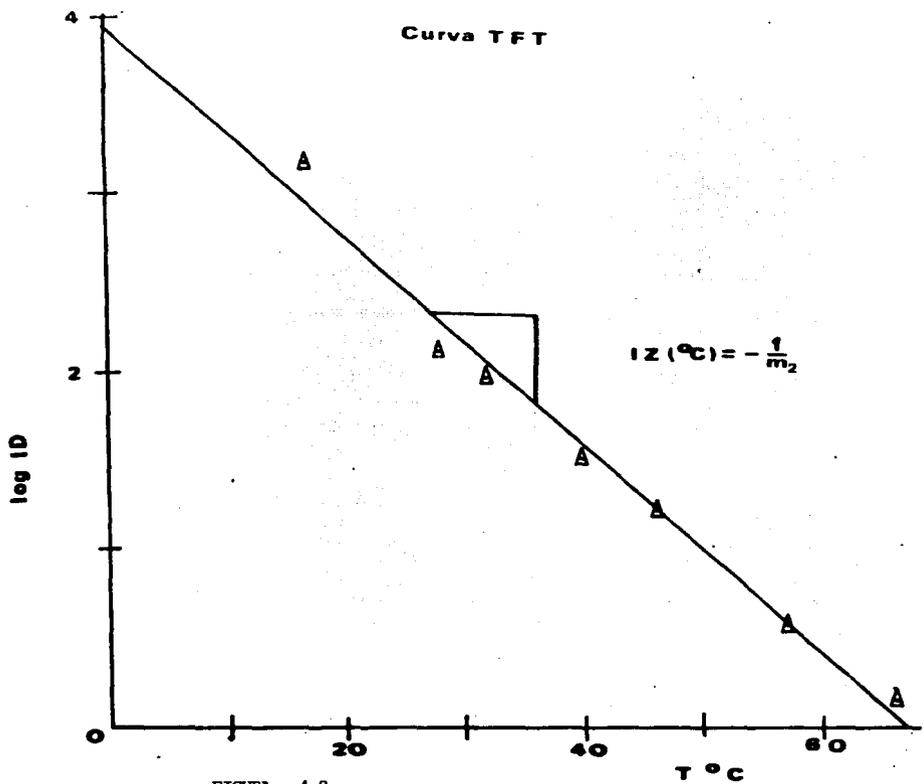


FIGURA 4.8

Tiempo de formación térmica de HMF. El valor inverso negativo de la pendiente equivale al valor $1Z$.

5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El HMF es un parámetro que permite conocer mucho de la calidad de la miel ya que es un factor que caracteriza de modo objetivo y general la historia del proceso y almacenamiento de la miel de Abeja, si bien el límite propuesto por la Norma Regional Europea es bajo, se deberá intentar ajustar este límite a la realidad de cada país, y seguir aprovechando este parámetro para evaluar la calidad de la miel, que como se ha visto en este sentido es muy conveniente.

- Es posible sintetizar en el laboratorio un estándar de HMF para la calibración del método, con buen rendimiento, con una pureza aceptable y a un costo inferior al que tiene el reactivo importado. Debe tenerse cuidado con su conservación ya que la luz, el calor y la humedad lo descomponen, se recomienda guardarlo en un doble frasco hermético con algún desecante (Silica gel p.e.) y a temperaturas menores a 0 °C.

- El método White - Bisulfito, aprobado por el A.O.A.C. (1984) mostró tener la exactitud y precisión del método de Winkler - P-Toluidina, sin tener sus inconvenientes, los reactivos que utiliza no son tóxicos, son fáciles de conseguir y de precio accesible. Bajo este criterio se sugiere este método en lugar del método que propone

la Norma Regional Europea . Las interpretaciones entre ambos métodos son equivalentes.

Se encontró la correlación :

$$\text{Absorbancia Winkler} = \text{Absorbancia White} / 0.9190875$$

- El modelo matemático de predicción (Termogeneración HMF):

$$\frac{C}{\text{HMF}} = \frac{C_0}{\text{HMF}} \cdot \frac{(2.64 \times 10^{-17})}{e} \cdot \frac{-13,400 * 1/T}{e} * t$$

se valida con datos independientes obtenidos en la literatura . Funciona convenientemente como modelo general dentro de una variabilidad biológica aceptable.

Se recomienda no aplicar el modelo de predicción en concentraciones muy por encima del valor que fija la norma ya que se ha observado que disminuye su precisión.

6.- BIBLIOGRAFIA

- Altamirano A. e Ibañez L. 1984 .-ESTUDIO ANALITICO PARA CALIFICAR LA CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA PROCEDENTE DE LA SELVA LACANDONA .- Tesis licenciatura Facultad de Química U.N.A.M. México D.F.
- Altamirano A. , Ibañez L. , Pablos L. , Valle Vega P. PARAMETROS QUIMICOS QUE DETERMINAN LA CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA. Depto.de Alimentos D.E.P.g.Fac. de Química UNAM-1985
- A.O.A.C.31.153 - 31.155 (1984) HYDROXYMETHYLFURFURAL IN SPECTROPHOTOMETRIC METHOD : Official Methods of Analysis pag.593.-Citado en J.Assoc. Off . Anal. Chem. 623:703.
- Atkins E.L. 1975.-DAÑO CAUSADO A LAS ABEJAS MELIFERAS POR PLAGUICIDAS Y OTROS VENENOS.-Cap. 22 en Dadant e hijos.-La miel , la colmena y la abeja melífica.-Ed.Hemisferio Sur .- Uruguay pp 848-865.
- Avila O. 1980.- LA MIEL , EL POLEN Y LA JALEA REAL.-Ed. Cedel Barcelona España 1980 pp 848 - 865.
- Castellan G.W. 1976 .- FISICOQUIMICA .- Fondo Educativo Interamericano México D.F. pp 717 - 725.
- Codex Alimentarius Commission 1969 .-RECOMENDED EUROPEAN REGIONAL STANDARD FOR HONEY .-Rome . Joint FAO/WHO . Food Standards Programe CAC/RS .- (1969).

-Crane Eva. 1982 .-LEARNING ABOUT HONEY THROUGH FRUCTOSE. Bee World . 63 (4) : 174.

-Dhar A.K. & Roy B.R. 1972.-DETERMINATION OF 5-HYDROXIMETHYL-2-FURALDEHIDE IN HONEY.-Analist December 1972,97 :981-985

-Gordon E.P.1978.-ADVERSE WEATHER CUTS MEXICO'S HONEY CROP .-Horticultural and tropical products , Commodity programs FAS , U.S.A. Nota Octubre - 9 - 1978 pag 5.

-Guijosa T.M. y Paredes O. (1972).-EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO EN LA CALIDAD DE MIEL DE ABEJA.-Tecnología de Alimentos Año 7 Num. 1 ENE-FEB 1972 pp 21-23.

-Hase S.,Suzuki O.,Odate M., y Suzuki S.1973 .- CHANGES IN HYDROXIMETHYLFURFURAL (H.M.F.) CONTENT OF HONEY.J.Food Sci. and Tech. 20 (6) : 248 - 256.

-Hase S.,Suzuki O.,Odate M., y Susuki S. 1973 .-QUALITY OF HONEY AND ITS ANALITYCAL METHODS II.-H.M.F. CONTENT OF HONEY .Shokuryo Kenkyujo Kenkyu 28:63-71.

-Haworth W.N. y Jones W.G.M. 1944 .-THE CONVERSION OF SUCROSE INTO FURAN COMPOUNDS.-Part I.5-Hydroxymethylfurfural and some Derivatives. J.of the Chem.Soc.1944 2-183:667-670.

-Hyoung S.L.,Russell R. y Nagy S. 1986 .-HPLC DETERMINATION OF FURFURAL AND 5-HYDROXIMETHYLFURFURAL IN CITRUS JUICES. J. of Food Science 51 (4) 1986 : 1075 - 1076.

- Jean Proust. 1981.-Citado por Altamirano e Ibañez 1984.
- Jeuring H.L. & Koppers F.J. .-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF FURFURAL AND HYDROXIMETHYLFURFURAL IN SPIRITS AND HONEY. 1980. J. Assoc.Off.Anal. Chem.63,6:1215-1218.
- Labougle J.M. y Zozaya J.A. 1986 .-LA APICULTURA EN MEXICO. Ciencia y Desarrollo. 69 ; 17 - 36 .
- Nixon & Ribbands .- 1952 Citados por Altamirano e Ibañez 1984.
- Pablos Hach L. 1987 . Comunicación Personal . Subdirección de Información , Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos México D.F.
- The Merck Index .- Ref. 10.4748 pp 704 10th Edition.
- Middendorp M.J. 1918 .-Sur L'OXIMETHYLFURFUROL. Recueil des Travaux Chimies Pays - Bas . 38 . 1 - 71.
- Mijares R., Park G. y Mciver R. 1986 .-H.P.L.C. ANALYSIS OF H.M.F. IN ORANGE JUICE. J. Food Sci. 51 (3) ; 843 - 844.
- Rodríguez G . 1987 .-REAJUSTE DE LA APICULTURA POR LA INVASION DE ABEJAS AFRICANAS.-Gaceta UNAM 8^a época Vol III Num. 1 5-Ene-1987.

-Sadler.-STANDARD SPECTRA.-Midget Edition Sadler Research Laboratories Inc. Philadelphia 2,Penna.,U.S.A. IR prism=22,440(1963),UV- 8361(1965), IR neat-757 K(1966).

-Schade J.E.,Marsh G.L. y Eckert J.E.-Abstract.-DIASTASE ACTIVITY AND HYDROXIMETHYLFURFURAL IN HONEY AND THEIR USEFULNES IN DETECTING HEAT ALTERATION.-Food Research 23:446-463.

-Siddiqui I.R. . 1970 .-THE SUGARS OF HONEY .-Capitulo en Avances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.- R.S.Tipson.Ed. Academic Press New York pp 285 - 309.

-Singh B.,Dean G.R. y Cantor S.M. 1948 .-THE ROLE OF 5-(HYDROXIMETHYL)-FURFURAL IN THE DISCOLORATION OF SUGAR SOLUTIONS.-J.Am.Chem.Soc. 70 : 517 - 522.

-Strang L.A. & Dimick P.S. 1980 .-EFFECTS OF HEATING ON ALFALFA HONEY.-J.of Apic.Res. 20 (2) 121 - 124 1981.

-Sumner J. 1921 .-DINITROSALICYLIC ACID : A REAGENT FOR THE ESTIMATION OF SUGAR IN NORMAL AND DIABETIC URINE.J. Biolo.Chem. 47 : 5 - 10 (1921).

-Turner J.H.,Rebers P.A.,Barrick P.L. y Cotton R.H. 1954 .DETERMINATION OF 5-(HYDROXIMETHYL)-2-FURFURALDEHIDE AND RELATED COMPOUNDS.-Analytical Chem. 26 (5) : 898 - 901.

- United States Department of Agriculture 1951 .-U.S. STANDARDS FOR GRADES OF EXTRACTED HONEY.PROCESSED PRODUCTS BRANCH US.DEPT.OF AGRIC. FSQS Washington,D.C. 20250 April 16,1951 (16 FR 2463).
- Valle Vega P. 1983 .- LA MIEL EN LA EPOCA PREHISPANICA .- Tecnología de Alimentos .-1983 , 18 (1):27 .
- Valle Vega P.-Comunicación Personal 1985.-PREDICCIÓN DE LA CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA SEGUN SU CONTENIDO DE HIDROXIMETILFURFURAL.-Departamento de Alimentos D.E.P.g. Facultad de Química , U N A M
- Valle Vega P. y Merson R.L.1983 .-PROCESAMIENTO TERMICO DE ALIMENTOS ENLATADOS .- Depto. de Industrias agrícolas ,Chapingo Edo. de México.
- Wedmore E.B. 1955 .-THE ACCURATE DETERMINATION OF THE WATER CONTENT OF HONEYS.-Bee World 36(11) : 197 - 206.
- White J.W.,Riethof M.L.,Subers M.H. y Kushnir I.1962 .- COMPOSITION OF AMERICAN HONEYS .-Tech.Bull.U.S.Rep. Agric.No. 1261:124
- White J.W.,Kushnir I. y Subers M.H. 1964 .-EFFECT OF STORAGE AND PROCESSING TEMPERATURES ON HONEY QUALITY.-Food Technology 18 (4) : 153 - 156 .
- White J.W. y Rudy J. 1978 .-THE PROTEIN CONTENT OF HONEY J. of Apicultural Research 17(4) : 234 - 238

-White J.W. (1979 A) .--SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR HYDROXIMETHYLFURFURAL IN HONEY. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 62,3:509-514.

-White J.W.(1979 B).--METHODS FOR DETERMINING CARBOHYDRATES , HYDROXIMETHYL FURFURAL AND PROLINE IN HONEY.--Collaborative Study .J.Assoc.Off.Anal.Chem. 62,3 : 515-526 .

-White J.W.,Kushnir I. & Doner L.W.(1979 C).--CHARCOAL COLUMN/THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR HIGH FRUCTOSE CORN SYRUP AND SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR HYDROXIMETHYLFURFURAL IN HONEY.Collaborative Studies.J.Assoc.Off.Anal.Chem. 62 , 4 : 921 - 927.

-White J.W. (1980 A) .--HYDROXIMETHYLFURFURAL CONTENT OF HONEY AS AN INDICATOR OF ITS ADULTERATION WITH INVERTED SUGARS . Bee World 60 num.1 29 - 37.

-White J.W. & Siciliano J.(1980 B).--HYDROXIMETHYLFURFURAL AND HONEY ADULTERATION.--J.Assoc.Off.Anal.Chem.63,1:7-10.

-White J.W. (1980 C) .--DETECTION OF HONEY ADULTERATION BY CARBOHYDRATE ANALYSIS (CONCLUSIONS).--J.Assoc.Off.Anal.Chem. 63 , 1 : 11 - 18 .

-White J.W. 1981 .--NATURAL HONEY TOXICANTS .--Bee World Vol.62 Num. 1 1981 pp 23 - 28 .

-White J.W. 1983 .-LA MIEL Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS.-
Capítulo 17,p 565-569 en Elementos de Tecnología de
Alimentos.(Eds) N.W.Desrosier 1^a Edición Vol. 1. Avi
Publishing Company Inc. Westport Connecticut.

-White J.W. 1985 .-COMPOSICION Y PROPIEDADES DEL LA MIEL.-
Capítulo 12 , p 57-66 en La Apicultura en los Estados
Unidos.(Eds) S.E. McGregor Quinta Reimpresión.Limusa México.

-Wootton R.A.,Edwards & Faraji-Haremi. 1976 .-EFFECT OF
ACCELERATED STORAGE CONDITIONS ON THE CHEMICAL COMPOSITION
AND PROPERTIES OF AUSTRALIAN HONEYS.-J.of Apicultural
Research. 15 (1) : 29 - 34.

APENDICE Num. 1

Si la determinación de humedad se hace a una temperatura que no sea 20 °C , convertir a la temperatura patrón de 20°C, utilizando las correcciones de temperatura que se muestran más abajo.

TABLA PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Indice de Refracción (20°0)	Contenido de humedad (%)	Indice de refracción (20°0)	Contenido de humedad (%)	Indice de Refracción (20 °0)	Contenido de humedad (%)
1,5044	13.0	1,4935	17.2	1,4830	21.4
1,5038	13.2	1,4930	17.4	1,4825	21.6
1,5033	13.4	1,4925	17.6	1,4820	21.8
1,5028	13.6	1,4920	17.8	1,4815	22.0
1,5023	13.8	1,4915	18.0	1,4810	22.2
1,5018	14.0	1,4910	18.2	1,4805	22.4
1,5012	14.2	1,4905	18.4	1,4800	22.6
1,5007	14.4	1,4900	18.6	1,4795	22.8
1,5002	14.6	1,4895	18.8	1,4790	23.0
1,4997	14.8	1,4890	19.0	1,4785	23.2
1,4992	15.0	1,4885	19.2	1,4780	23.4
1,4987	15.2	1,4880	19.4	1,4775	23.6
1,4982	15.4	1,4875	19.6	1,4770	23.8
1,4976	15.6	1,4870	19.8	1,4765	24.0
1,4971	15.8	1,4865	20.0	1,4760	24.2
1,4965	16.0	1,4860	20.2	1,4755	24.4
1,4961	16.2	1,4855	20.4	1,4750	24.6
1,4956	16.4	1,4850	20.6	1,4745	24.8
1,4951	16.6	1,4845	20.8	1,4740	25.0
1,4946	16.8	1,4840	21.0		
1,4940	17.0	1,4835	21.2		

Correcciones de Temperatura - Indice de Refracción

Temperaturas superiores a 20°C : - Añadir 0,00023 por c/ °0,

Temperaturas inferiores a 20°C : - Restar 0,00023 por c/ °0.

(NORMA REGIONAL EUROPEA Codex Alimentarius-1969)

APENDICE # 2

PROGRAMA DE ANALISIS ESTADISTICO

Este programa fué creado con el proposito de aplicar los parámetros estadísticos de análisis de datos. A continuación se mencionan estos y la formula que llevó a la obtención de su resultado, el diagrama de flujo del programa se anexa, para mayor información.

VARIABLES SIMPLES (X)

PARAMETRO	FORMULA
Media aritmética	$\bar{X} = \sum X / \text{num. Datos}$
Mediana(s)	$0.5 \bar{X} = \text{Valor central de la serie de valores ordenados}$
Varianza	$S^2 = \sum (X - \bar{X})^2 / \text{num. dat.}$
Desviación Standart	$DS = S^2$
Coefficiente de Variación	$CV = DS / \bar{X}$

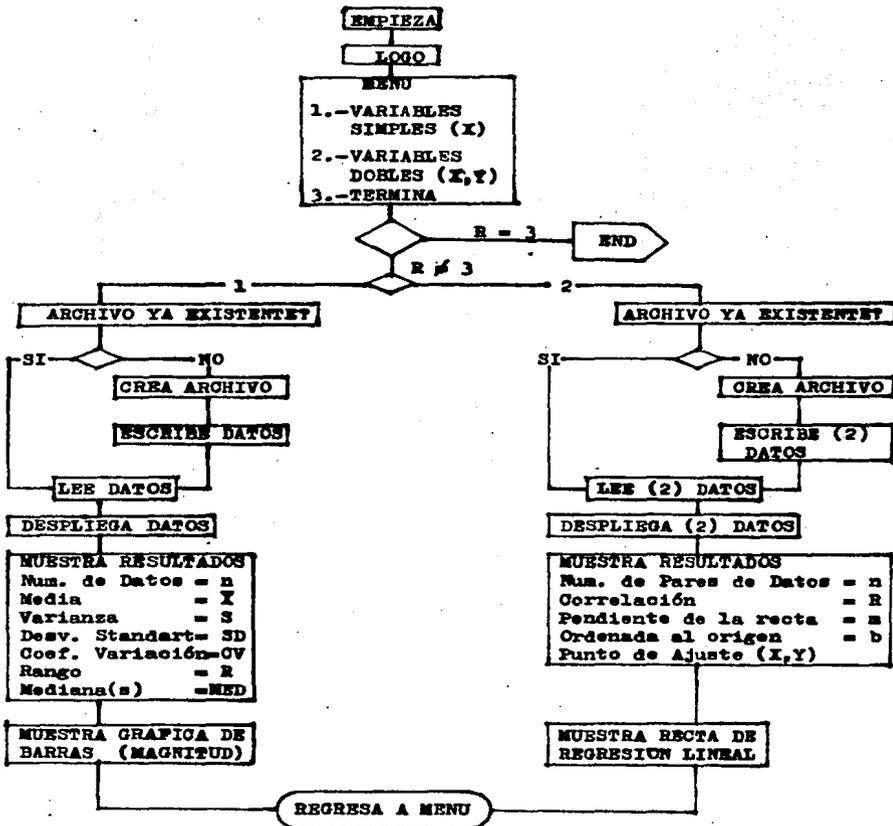
VARIABLES DOBLES (X , Y)

Num. de Pares de Datos	n
Ordenada al origen	$b = \frac{(\sum X^2)(\sum Y) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$
Pendiente	$m = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$
Correlación	$R = \frac{\sum [(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})]}{[\sum (X - \bar{X})^2] [\sum (Y - \bar{Y})^2]}$
Punto de Ajuste(X,Y)	Se toma un valor medio de X y se sustituye en: $Y = m(X) + b$

Este programa estadístico esta elaborado en lenguaje PASCAL fué desarrollado en el centro de computo academico de la UNAM. Puede ser utilizado en cualquier microcomputador PC-IBM compatible.

DIAGRAMA DE FLUJO (PROGRAMA PRINCIPAL)

A L E X S T A T



APENDICE # 3

SECUENCIA DE INTRODUCCION DEL MODELO MATEMATICO
DE PREDICCION EN CALCULADORA TEXAS INSTRUMENTS 55- I I

<u>PRESIONAR</u>	<u>PANTALLA</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
<u>ON/C</u> <u>ON/C</u> <u>2nd</u> <u>GSR</u>	0	Limpia pantalla, operaciones y registros estadísticos.
<u>2nd</u> <u>Fart</u> <u>3</u>	40.3	Seleccionar 40 pasos de programación y 3 memorias.
<u>LRN</u> <u>2nd</u> <u>CP</u>	00 00	Limpia memoria y empieza modo "learn"
<u>RCL</u> <u>0</u> <u>2nd</u> <u>1/x</u> <u>X</u> <u>1</u> <u>3</u> <u>4</u> <u>0</u> <u>0</u> <u>+/-</u> <u>=</u>	11 00	Llama memoria 0 obten el inverso y multiplica por - 13400
<u>INV</u> <u>lnx</u> <u>X</u> <u>2.64</u> <u>EE</u> <u>1</u> <u>7</u> <u>=</u>	22 00	Al resultado, obten su anti-log natural y multiplica por 2.64×10^{17}
<u>X</u> <u>RCL</u> <u>1</u> <u>=</u>	26 00	El resultado multiplicalo por la memoria 1
<u>INV</u> <u>lnx</u> <u>X</u> <u>RCL</u> <u>2</u> <u>=</u> <u>RST</u>	33 00	Al resultado se le obtiene su anti-log Natural y se multiplica por la memoria 2 y regresa al paso 00
<u>LRN</u> <u>RST</u>	40.3	Abandona el modo "learn" y regresa al principio.

MODELO APLICADO

$C \text{ Final HMP} = \frac{M}{M} \cdot e^{(2.64 \times 10^{17} \cdot e^{-13400 \cdot 1/M})} \cdot M$
PARA CORRER EL PROGRAMA

OPERACION

TECLEAR

Limpia e inicia

ON/C ON/C

Memoria 0 = Temp(^oK)

cantidad STO 0

Memoria 1 = tiempo (días) No. días STO 1

Memoria 2 = C inicial(mg) mg STO 2

Corre el programa y muestra el resultado

RST R/S

Resultado=Conc. Final

APENDICE # 4

APLICACION DEL MODELO MATEMATICO DE PREDICION DE
TERMOGENERACION DE H M F , CON DATOS REPORTADOS EN ARTICULOS
DE LA LITERATURA

Datos obtenidos de : Guijosa - Paredes (1972)

	Tiempo (días)	HMF	HMF
		Real	Modelo
Temp.= 10°C = 283°K	30	4.90	4.90
Conc.Inicial HMF = 4.9 mg/Kg.	45	4.93	4.96
	60	4.95	5.01
	75	5.00	5.07
	90	5.10	5.12
	105	5.10	5.18
	120	5.25	5.23
	135	5.40	5.29
	154	5.40	5.36
	163	5.55	5.40
	182	5.70	5.50
Temp.=20°C = 293°K	30	5.40	5.35
Conc.Inicial HMF = 4.9 mg / Kg	45	5.55	5.65
	60	6.00	5.96
	75	6.30	6.30
	90	6.60	6.65
	105	6.90	7.02
	120	7.20	7.42
Temp.=30°C = 303°K	30	15.00	17.00
Conc.Inicial HMF = 10 mg / Kg	45	34.00	21.00
	75	38.00	34.00
	90	42.00	44.00

Guijosa - Paredes (1972)

(Continuación)

	Tiempo (días)	HMF Real	HMF Modelo
Temp. = 40°C = 313°K	7	22.50	18.00
Conc. Inicial HMF = 12 mg / Kg	14	30.00	30.80
	18	40.00	40.40
Temp. = 50°C = 323°K	1	25.00	23.20
Conc. Inicial HMF = 18 mg / Kg	2	32.50	30.00
	3	40.00	38.50
Temp. = 60°C = 333°K	0.33	40.00	29.00
Conc. Inicial HMF = 22 mg / Kg	2	110.00	128.00
	2.8	285.00	260.00

Datos obtenidos de :

Hase S. et Al. (1972)

(Miel de Flor de Loto)

Temp. = 35°C = 308°K	3	1.90	1.99
Conc. Inicial HMF = 1.8 mg/100g	5	1.80	2.10
	8	1.90	2.30
	10	2.10	2.50
	15	2.30	2.98
	20	2.60	3.50
Temp. = 50°C = 323°K	0.04	1.93	1.94
Conc. Inicial HMF = 1.93 mg/100g	0.08	1.93	1.96
	0.12	1.93	1.98
	0.16	1.93	2.00
	0.21	2.00	2.03
	0.25	2.07	2.06
	0.25	2.28	2.33

Hase S. et Al. (1972)

(continuación)

	Tiempo (días)	HMF Real	HMF Modelo
Temp. = 60°C = 333°K	0.04	1.93	1.90
Conc. Inicial HMF = 1.93 mg/100g	0.08	2.00	2.00
	0.12	2.07	2.10
	0.16	2.14	2.20
	0.21	2.21	2.30
	0.25	2.28	2.40
	0.75	3.90	3.70
Temp. = 70°C = 343°K	0.04	2.00	2.10
Conc. Inicial HMF = 1.93 mg/100g	0.08	2.14	2.40
	0.12	2.28	2.70
	0.16	2.50	3.00
	0.21	2.64	3.50
	0.25	2.99	3.90
Temp. = 80°C = 353°K	0.04	2.36	2.70
Conc. Inicial HMF = 1.93 mg/100g	0.08	2.86	3.80
Temp. = 10°C = 283°K			
Conc. Inicial HMF (mg/100g)			
0.5	30	0.60	0.61
	65	0.60	0.62
0.2	30	0.20	0.20
	65	0.30	0.21
Datos obtenidos de :			
Hadorn & Zurcher (1962)			
Tambores de 300 Kg.			
Temp. = 48°C = 321°K			
Conc. Inicial HMF = 1.2 mg/100g	5	2.20	3.19
	5	2.40	3.19
Conc. Inicial HMF = 1.3 mg/100g	5	2.70	3.46

Datos obtenidos de :
 White J.W.(1980) miel de
 Alfalfa (muestras A,B,C)

	Tiempo (días)	HMF Real	HMF Modelo
Temp.=35°C = 308°K	14	0.72	0.64
Conc.Inicial HMF = 0.4 mg/100g	21	0.90	0.81
	49	2.30	2.10
	14	0.79	0.64
	21	0.90	0.81
	49	2.60	2.10
	70	3.70	4.20
Conc.Inicial HMF = 0.62 mg/100g	14	1.07	1.00
	21	1.48	1.26
	49	3.41	3.22
Temp.= 45°C = 318°K	2	0.59	0.52
Conc.Inicial HMF = 0.4 mg/100g	4	0.66	0.68
	6	0.80	0.88
	11	1.03	1.07
	2	0.59	0.52
	4	0.66	0.68
	6	0.85	0.88
Conc.Inicial HMF = 0.62 mg/100g	2	0.67	0.81
	4	0.87	1.05
	6	1.14	1.30
Temp.= 55°C = 328°K	2	0.99	1.04
Conc.Inicial HMF = 0.4 mg/100g	3.5	1.80	2.13
	4.5	2.80	3.43
	2	1.09	1.04
	3.5	2.07	2.13
	4.5	3.20	3.43
	Conc.Inicial HMF = 0.62 mg/100g	2	1.34
	3.5	2.60	3.29

Datos obtenidos de :

White , Kushnir ,
Subers (1964)

Concentración

	Inicial	Tiempo	HMF	HMF
	mg HMF/100g	(días)	Real	Modelo
Temp. = 50°C = 323°K	0.60	4.16	2.00	1.72
	1.60	4.16	4.30	4.50
Temp. = 60°C = 333°K	0.60	1.87	3.50	3.20
Temp. = 21°C = 294°K	0.35	152	1.00	0.67
	0.35	332	1.40	0.94
	0.22	152	0.90	0.42
	0.22	332	1.20	0.60
Temp. = 37°C = 310°K	0.35	14	1.00	0.66

Datos obtenidos de :

Hadorn - Kovacs citados
por White et Al. (1964)

Temp. = 50°C = 323°K	0.10	4.2	0.80	0.30
	0.10	12.5	2.60	2.40