



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DEL ORIGEN DE LA MIEL DE
ABEJA UTILIZANDO SU COMPOSICION ISOTOPICA
DE CARBONO-13.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA ANALITICA)**

**P R E S E N T A
Q.F.B. EDITH CIENFUEGOS ALVARADO**



MEXICO, D. F.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

J U R A D O

Presidente	Dr. Fernando Walls Armijo.
Primer Vocal	Dr. Raúl Enríquez Habib.
Secretario	Dr. Luis Fernando Magaña Solís.
Primer Suplente	Dr. Javier Padilla Olivares.
Segundo Suplente	Dr. Benjamín Ortiz Mendoza.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor Externo

M. en C. Pedro Morales Puente.

Asesor Interno

M. en C. Humberto Gómez Ruíz.

Sustentante

Q.F.B. Edith Cienfuegos Alvarado.

Agradezco al M. en C. Pedro Morales Puente y a Isabel Casar Aldrete la dirección, indicaciones y correcciones tan acertadas durante el desarrollo de esta Tesis.

A mi esposo Francisco Javier Otero Trujano.

A mis padres .Ala. Teresa Alvarado y Tomás Cienfuegos.

A mis suegros Victoria Trujano y Nicolás Otero.

A mis hermanos Julio, Fere y Carlos.

*A toda mi familia. Israel, Julio, Rosy, Claudia,
Ricardo, Arita, Alejandro, Karla, Angélica,
Verónica, Isabel, Rodrigo, Ely, Gloria, Ronald,
Judith, Antonio, Olga, Jesús, Martha y Amando.*

Agradecimientos

Al Dr. Jaime Tacher Samarel. Director General de Investigación Científica y Superación Académica de la SEP. Por el apoyo económico a través del proyecto "Estudio, Control y Garantía de Calidad de la Miel de Abeja Producida en el Estado de Campeche".

Al Lic. Tirso R de la Gala Guerrero entonces Rector de la Universidad Autónoma de Campeche por el apoyo a formar el grupo de trabajo y el proyecto "Estudio, Control y Garantía de Calidad de la Miel de Abeja Producida en el Estado de Campeche"

Al Ing. José Martín Fariás Maldonado entonces Director General de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Autónoma de Campeche por su interés y apoyo en formar y agilizar al grupo de trabajo del proyecto "Estudio, Control y Garantía de Calidad de la Miel de Abeja Producida en el Estado de Campeche".

A la Maestra Teresa Yong Medina de la Universidad Autónoma de Veracruz y a la Ing. Bioquímica Angélica Soto Martínez de la Universidad Autónoma de Campeche. Les agradezco el haberme proporcionado muestras de plantas mielíferas y de miel de abeja certificada del Estado de Campeche.

Al Sr. Gerard Treuss, Gerente General de Miel Carlota S.A. de C.V. de Cuernavaca, Morelos por haberme proporcionado muestras de miel de abeja certificada.

Al Dr. Luis Fernando Magaña Solís, por su apoyo académico y por compartir sus conocimientos en el transcurso de mis estudios de maestría y además por la revisión del presente trabajo.

Al grupo de Electrónica del IFUNAM: Físico Javier Pena Blanco, Físico Ricardo César Arzate Trujillo, Física Lourdes González y en especial al coordinador del grupo Físico Francisco Fernández Escobar por su apoyo técnico y colaboración en el mantenimiento preventivo y correctivo de espectrómetro Finnigan Mat 250 así como en el diseño de la fuente para el medidor de presión.

Al grupo del Taller Mecánico del IFUNAM y en especial al Ing. Marco Antonio Veytia, al Sr. René Presa y al Sr. Rafael Puente por su apoyo técnico.

A la Bióloga Rosalinda Díaz Pérez por su colaboración en los análisis isotópicos.

Al Sr. Francisco Javier Jaimes Beristain por las labores de mantenimiento correctivo del Laboratorio de Isótopos Estables.

Al grupo de Espectrometría de Masas de la Facultad de Química de la UNAM, en especial al M. en C. Humberto Gómez Ruíz y al M. en C. Adolfo García Ozuna por los espectros de masas para verificar el proceso de la combustión de miel de abeja y de su proteína.

Al Dr. Fernando Walls Armijo, al Dr. Raúl Enriquez Habib, al Dr. Benjamín Ortiz Mendoza y al Dr. Javier Padilla Olivares, por revisar el presente trabajo.

A mis compañeras y amigas durante mis estudios de maestría: Pilar Carreón Castro, Alma Delia Cervantes e Hilda González Guevara por su apoyo y gran amistad.

Al Dr. Willem Mook, Dirkjan Masma, Berthe Dumoulin, Henk Jansen, Bert Vers, Henk Been, Anita Býma, Jannet Spriensma, Eric de la Universidad del Reino en Gronongen, Holanda por su amistad y conocimientos.

Al Dr. Thomas Boutton y al Dr. Jonathan White por compartir sus conocimientos y experiencias.

INDICE.

1.0 RESUMEN.	2
1.1 ANTECEDENTES.	3
1.2 OBJETIVOS.	6
2.0 ANALISIS ISOTOPICO.	7
2.1 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO.	9
2.2 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO DEL CARBONO EN LAS PLANTAS.	10
2.3 ANALISIS DE MIEL DE ABEJA.	13
3.0 RESULTADOS Y DISCUSION.	18
4.0 CONCLUSIONES.	45
5.0 BIBLIOGRAFIA.	46

APENDICE I.

I.0 ESPECTROMETRO DE MASAS PARA ANALISIS DE ISOTOPOS ESTABLES.	
I.1 DESCRIPCION DEL ESPECTROMETRO DE MASAS.	51
I.1.1 SISTEMA DE VACIO.	51
I.1.2 SISTEMA DE INTRODUCCION DE GASES.	53
I.1.3 FUENTE DE IONES.	54
I.1.4 ANALIZADOR MAGNETICO.	56
I.1.5 DETECTOR DE IONES.	59
I.2 CORRECCIONES A LOS ANALISIS OBTENIDOS.	60
I.2.1 CORRECCION POR EFECTOS DE PRESION.	60
I.2.2 CORRECCION POR IMPUREZAS EN LAS MUESTRAS, GAS RESIDUAL Y POR EFECTO DE MEMORIA.	61
I.2.3 CORRECCION POR USO DE UN PATRON INTERNO DE TRABAJO EN LUGAR DE UN PATRON INTERNACIONAL.	63
I.2.4 CORRECCION POR ABUNDANCIA ISOTOPICA.	64
I.3 PATRONES DE REFERENCIA INTERNACIONALES.	77

APENDICE II.

II.0 MATERIAL Y METODOS.	
II.1 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS ORGANICAS. (IFUNAM.C13.ORG).	80
II.2 CARACTERIZACION ISOTOPICA DE LAS PLANTAS PRODUCTORAS DE NECTAR.	87
II.3 CARACTERIZACION ISOTOPICA DE LA MIEL DE ABEJA.	87
II.4 METODO DE PRECIPITACION DIRECTA DE LA PROTEINA CONTENIDA EN LA MIEL DE ABEJA.	88
II.5 METODO DE DIALISIS-PRECIPITACION DE LA PROTEINA CONTENIDA EN MIEL DE ABEJA.	89
II.6 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS DE CARBONATOS (IFUNAM.C13.CA).	90
II.7 DIAGRAMAS DE FLUJO DE LOS METODOS UTILIZADOS.	93

1.0 RESUMEN.

Una de las técnicas más empleadas en los países industrializados para certificar el origen de productos naturales es la medida del contenido natural de ^{13}C , por Espectrometría de Masas de Isótopos Estables.

La técnica se basa en dos hechos: primero que existe una correlación isotópica entre la dieta de los animales y lo que estos producen y segundo que existe una gran diferencia isotópica de ^{13}C entre los carbohidratos de plantas C_3 (plantas mielíferas con un intervalo de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -21$ a -31 ‰) y los carbohidratos de plantas C_4 utilizados como adulterantes (caña de azúcar con una $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -11 \pm 1$ ‰ y el jarabe de maíz con una $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -9.7 \pm 0.7$ ‰).

En el caso particular de la miel de abeja el 98% de las plantas mielíferas son del tipo C_3 y por otra parte la miel de abeja contiene proteínas de dos fuentes: del néctar y polen de las flores y otra producida por las abejas, el contenido isotópico de ^{13}C de ambas proteínas es muy semejante. Sin embargo los adulterantes (caña de azúcar y jarabe de maíz) no contienen proteínas, son solo carbohidratos de tipo C_4 . Por lo tanto cuando no existe adulteración los valores $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en miel de abeja y la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína contenida en ella serán iguales, y cuando exista diferencia esta será directamente proporcional a la cantidad de adulterante. De esta forma la variedad de flores mielíferas con las cuales se alimentan las abejas serán las responsables de transmitir su huella isotópica en primer término a la miel de abeja, la cual proviene del néctar de las flores y por correspondiente a la proteína que se encuentra en la miel de abeja.

La norma oficial mexicana para miel de abeja especifica las características fisicoquímicas y sanitarias que debe tener la miel de abeja, sin embargo ninguno de los análisis son concluyentes para determinar adulteraciones. Es por ello que en el presente trabajo se desarrolló la técnica analítica para la separación de la proteína de la miel de abeja así como para su análisis isotópico de ^{13}C , la cual sería la base de la norma oficial mexicana para detectar adulteraciones con azúcar de caña o jarabe de maíz (HFCS) en miel de abeja. Se aplicó esta técnica a miel de abeja certificada y comercial encontrando que al utilizar la medida de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en miel de abeja y su fracción de proteína, es posible determinar adulteraciones con un límite inferior de detección hasta de un 7%. Para calcular el porcentaje del contenido de adulterante, se tomó en cuenta el valor promedio de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de jarabe de maíz (HFCS), el cual es de -9.7 ‰. El criterio que se utilizó para considerar que una miel se encuentra adulterada es cuando la diferencia entre la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína y la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja sea negativa y menor a un -1.01 ‰ ($\approx 7\%$ de jarabe de maíz).

1.1 ANTECEDENTES.

De acuerdo con los informes obtenidos por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos en 1994, México es uno de los tres principales productores de miel de abeja en el mundo, en este año se produjeron 65,000 toneladas, precedido únicamente por EUA y la República Popular China. Hasta 1987 México fue el mayor exportador mundial de miel de abeja, siendo ahora superado por la República Popular China. La apicultura tiene para nuestro país gran importancia económica puesto que se exportaron 45,000 toneladas de miel de abeja (principalmente a la República Federal Alemana y a los EUA), generando un promedio de cincuenta millones de dólares al año en divisas. La miel de abeja mexicana, fundamentalmente la que proviene de la Península de Yucatán, es conocida por su calidad y cotizada por los compradores internacionales para su venta directa en Europa, así como para mejorar la calidad de miel en otros países, al utilizarse como base en mezclas de mieles.

Además del aspecto económico, la apicultura en México tiene gran importancia social ya que un mínimo de 50,000 familias participan en esta actividad, fundamentalmente campesinos de escasos recursos y muchos de origen indígena. Para la mayoría de los productores, la miel de abeja es el único producto de intercambio con la economía regional, que les genera recursos en moneda y que son posteriormente utilizados para la compra de avíos e insumos necesarios en los cultivos de autoconsumo.

La apicultura de México se desarrolla sobre una base de tres millones de colmenas, siendo la región Sureste la de mayor importancia con un promedio de 17 colonias por Km², (Campeche, Quintana Roo y Yucatán). En esta zona que representa una quinta parte del territorio, se localizan más de la mitad de las colmenas y más de la mitad de los 50,000 apicultores del país. En particular destaca el estado de Campeche donde se obtiene el 20% de la producción nacional de miel, y más del 50% de la producción regional en la Península de Yucatán contando aproximadamente con 10,000 apicultores. Las razones para esta concentración se encuentran tanto por las condiciones ambientales ya que permite recoger hasta tres cosechas anuales, así como en la organización social de los apicultores a través de grandes cooperativas que constituyen un hecho único característico de la región peninsular. Y a fenómenos históricos, dado que la parte sureste de México es uno de los tres centros de desarrollo de la apicultura a nivel mundial.

La abeja maya sin aguijón, (*Melipona beecheii* Bennett) fue domesticada y explotada tal vez desde tres mil años antes de la conquista española. En el código Trocortesiano se hace referencia a la crianza de las abejas, el cuidado de las colmenas, extracción de miel y preparación de manjares, el jeroglífico que representa a la abeja, es el signo del día "Caban", "Las deidades de la caza

cuentan con la asistencia de ayudantes que tienen a su cuidado animales heridos; y el Dios de las abejas está siempre alerta, para que en el momento que el hombre rompa la colmena en busca de miel, curarles las alas y patas a las abejas que resulten dañadas". "Los mayas domesticaron la abeja sin aguijón, la mantenían cerca de sus casas en colmenas hechas de cilindros de madera cerrados en los extremos con piedras, arcillas y con un hueco para que pudiesen salir. La miel se utilizó especialmente para la elaboración de una bebida fermentada llamada balché". "Los dioses llamados Bacabes, eran personificadores y patronos de los cuidadores de abejas y ejercían influencia sobre los años afortunados, en muchas ocasiones se les representa como ancianos con los brazos en alto, debido a que se creía que ellos sostenían al cielo". El cultivo de la abeja era tan importante y extendido que se mantuvo casi sin modificación durante toda la época colonial y hasta fines del siglo XIX. La apicultura basada en esta abeja sin aguijón (Meliponicultura), permitió la comercialización de distintos productos especialmente la "Cera de Campeche". La tradición se mantiene y muchas de las prácticas y manejos de las abejas europeas son heredadas directamente de la Meliponicultura. Según Luta y Cockerell, existen en total 66 especies y subespecies de meliponinos en México, Centroamérica y las Antillas. (Espina Darío, 1984).

En 1991 Rinder y colaboradores, en un estudio en el genoma de las abejas productoras de miel en la Península de Yucatán encontró que antes de llegar la abeja africana había 2 subespecies de abejas Europeas (*Apis mellifera*, sp). El estudio mostró que solo un 17% de las colonias Europeas se encontraban africanizadas, los dos tipos de abejas híbridas mostraron que el problema es debido a la usurpación de colonias europeas por una abeja reina africana o una abeja reina africanizada.

El nivel técnico de los apicultores del país es muy heterogéneo, pero en términos generales se puede considerar como mínimo; solo el 10% de los apicultores cambian anualmente la reina, actividad necesaria para una mayor productividad. Así mismo, pocos productores comercializan otros productos además de la miel de abeja, como son: la jalea real, cera, polen, productos derivados, etc., por falta de conocimientos técnicos ó de información sobre el mercado nacional e internacional. En términos generales, se puede decir que la mayoría de los apicultores desconocen el manejo adecuado de un mejor equipo, el cual les fue generalmente proporcionado por algún programa oficial sin posterior apoyo técnico ó capacitación adecuada.

El 70% de la miel de abeja de México se exporta como materia prima, sin agregar valor alguno a través de la modificación tecnológica, por lo cual la transformación, adición y mezcla del producto, se realiza por los compradores extranjeros sin conocimiento exacto del producto nacional. (Bioma 1991).

La apicultura en México podría continuar en la situación actual sin que requiriera de mayores inversiones y apoyos, de no ser por tres problemas recientes:

a) **La fuerte competencia internacional con la República Popular China y de otros países, lo cual amenaza los mercados tradicionales de México y favorece los bajos precios de la miel.**

Después de la segunda guerra mundial, México se convirtió en el primer exportador mundial de miel de abeja en el mundo, posición recientemente perdida por la mayor producción y comercialización de la República Popular China.

La actividad comercial de China ha llegado al punto de surtir más del 50% de la jalea real demandada por el mercado Nacional, en demérito de los posibles productores en México.

b) **El tratado de libre comercio con los EUA y Canadá.** Los EUA son el segundo productor mundial de miel de abeja y tienen almacenadas grandes cantidades del producto (aproximadamente 80,000 toneladas). Por otra parte, Canadá es el país con mayor tecnificación apícola y productividad por colmena en el mundo, con lo cual podría también competir con el mercado nacional.

c) **La presencia y multiplicación de la abeja africana (*Apis mellifera scutellata*, Lep),** cuyas características biológicas y genéticas son muy diferentes a la abeja europea y exigen un diferente manejo y un mayor nivel técnico por parte del apicultor.

Como respuesta a estos problemas es imperativo la modificación de la norma oficial mexicana por un método más preciso que certifique el origen de la miel de abeja mexicana, detectando adulteraciones, debido a las ganancias ilícitas que significa adulterar la miel de abeja pura con jarabe de maíz ó azúcar de caña.

La medida de los isótopos estables del carbono ha sido aplicada con éxito para determinar adulteraciones en: brandy, vinos, jugos de fruta, aceites, miel de abeja, etc. (Bricout, 1982 y NOM-032-SCFI-1993).

Con el contenido de ^{13}C en miel de abeja y su fracción de proteína es posible detectar adulteraciones, en esta tesis se describe con detalle la técnica de análisis, los métodos de extracción de la proteína y su aplicación a muestras de miel de abeja certificada así como a productos comerciales envasados con el nombre de miel de abeja.

1.2 Objetivos.

El presente trabajo tiene como propósito establecer las bases para el empleo de una prueba adicional a la medida de ^{13}C en miel de abeja completa, que determine el % de adulteración en miel de abeja con jarabe de maíz ó azúcar de caña. Se ha seleccionado para ello la prueba desarrollada por Jonathan W. White y Kenneth Winters, 1989, la cual compara la medida de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel completa con la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína de esta.

Dado lo anterior, pueden definirse como objetivos específicos del estudio:

- a) La caracterización isotópica de las plantas productoras del néctar y de carbohidratos en el Estado de Campeche.
- b) La caracterización isotópica de la miel de abeja producida en la República Mexicana, para encontrar la distribución estadística de valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.
- c) Establecer el método de separación y purificación de la proteína contenida en la miel de abeja descrito por White & Whithers utilizando la precipitación de la proteína mediante el ácido túngstico.
- e) Analizar muestras de miel de abeja de origen certificado para establecer la variabilidad de las diferencias de las relaciones isotópicas entre las mieles originales y su fracción de proteína.

El contenido de la presente tesis se puede dividir de la siguiente manera:

En el capítulo 2.0 se describe la teoría atómica, la definición de fraccionamiento isotópico, el efecto de la fotosíntesis en la composición isotópica de ^{13}C y lo que se ha realizado mediante el análisis isotópico en miel de abeja.

En el capítulo 3.0 se describe los resultados obtenidos con miel de abeja certificada y miel de abeja comercial.

En el capítulo 4.0 se describir las conclusiones de este trabajo.

En el capítulo 5.0 se encuentra la bibliografía utilizada.

En el apéndice I se describe detalladamente el funcionamiento del espectrómetro de masas para medir las abundancia isotópicas de carbono, las correcciones a los análisis obtenidos y los patrones de referencia internacional utilizados para la parte experimental.

En el apéndice II se describen con detalle el material y los métodos utilizados en la determinación y purificación de muestras de miel de abeja y su fracción de proteína, así como los diagramas de flujo de los métodos utilizados.

2.0 ANALISIS ISOTOPICO.

Teoría atómica: Las investigaciones sobre sustancias radioactivas llevaron a demostrar que existían elementos cuyos átomos tenían el mismo número atómico pero diferían en peso atómico. A estos átomos los llamó Frederick Soddy, en 1910, "isótopos" (en griego significa mismo lugar). Dos descubrimientos significantes dieron origen a los estudios en la espectrometría de masas, en 1914 J.J. Thomson descubrió los primeros isótopos al separar en el primer espectrógrafo al Neón 22 del Neón 20 y en 1919 F.W. Astor observa que las masas de todos los isótopos no son simples múltiplos de la unidad atómica fundamental.

La estructura atómica se pudo explicar en 1932 cuando Chadwick descubrió a los neutrones, ya que la presencia de éstos dentro del núcleo eran los responsables de la existencia de los isótopos.

A la fecha se han descubierto aproximadamente 300 isótopos que son estables en el tiempo y aproximadamente 1000 isótopos radioactivos.

De 1915 a 1920, la espectrometría de masas siguió dos caminos: uno concerniente a la determinación precisa de las masas atómicas y la otra a medir la abundancia relativa de las diferentes especies isotópicas.

En 1918 A.J. Dempster diseñó un espectrómetro magnético de 180° para estudiar partículas positivas y determinar su relación de carga a masa. Los iones positivos eran producidos por bombardeo de electrones. (Kiser. 1965).

Las medidas de variaciones isotópicas comenzaron con el trabajo de Nier y Gulbransen en 1938 con isótopos de carbono.

A.O. Nier en 1948, desarrolló un espectrómetro de masas con sector magnético con el cual, logró medir masas atómicas entre 12 y 500 amu y en 1950 analizó las relaciones de abundancia isotópica relativa de los elementos ligeros tales como; carbono, oxígeno, nitrógeno, argón y potasio en sustancias naturales. (Nier, A.O., 1950). Los espectrómetros de masas que actualmente se utilizan para este tipo de análisis están basados en los diseños del espectrómetro de Nier.

La espectrometría de masas es sin duda el método más adecuado para la determinación del contenido isotópico en diversos materiales y por ello se ha convertido en una técnica invaluable en muy diversos campos.

El Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFUNAM), cuenta con un espectrómetro de masas Finnigan Mat 250 (Figura 1), el cual es uno de los cuatro instrumentos de este

tipo en el país. En este instrumento se pueden analizar con alta precisión las abundancias relativas de los isótopos estables del carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre e hidrógeno. La posibilidad de aplicaciones interdisciplinarias incluyen entre otros; estudios hidrológicos, geológicos, ecológicos, fisiológicos (de plantas y animales), etc. En particular el análisis de isótopos estables ha llegado a ser una herramienta de gran utilidad para la detección de la adulteración en alimentos, jugos y bebidas alcohólicas. El mercado de productos terminados es muy competitivo y ahora en el comercio internacional es necesario probar analíticamente el origen de los alimentos para fijarles precio y calidad.

La proporción de isótopos estables $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ y D/H contenidos en los compuestos tanto inorgánicos (H_2O , el CO_2 , los carbonatos, etc.) como orgánicos (los azúcares, proteínas, enzimas, etc.) son típicos de los procesos que siguen en la naturaleza, porque dejan la huella de su procedencia, al intervenir en ciclos biológicos ó sintéticos.

La técnica de mayor precisión empleada para esta determinación es la medida del contenido natural de ^{13}C , por Espectrometría de Masas de Isótopos Estables. Esta determinación se expresa por los cocientes de las abundancias de los átomos estables de carbono 12 y 13, ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) los cuales están referidos a un patrón internacional y la unidad de reporte es δ (‰), (Craig, 1953):

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{MUESTRA}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} - 1 \right] 1000 \quad (1)$$

El patrón isotópico internacional para reportar la medida de abundancia isotópica de carbono es un carbonato de calcio (CaCO_3) de origen marino proveniente de la formación cretácica Peedee en Carolina del Sur, conocido como PDB (Pee Dee Belemnite Limestone).

En particular, para el caso del reino vegetal, las plantas durante la fotorrespiración fijan el carbono inorgánico CO_2 de la atmósfera por medio de ciclos biológicos integrando éste en las sustancias orgánicas que las constituyen. Esta fijación de CO_2 se puede realizar mediante 3 rutas metabólicas diferentes C_3 , C_4 ó CAM, en cada una de ellas se produce un efecto isotópico diferente de tal manera que las moléculas formadas tienen un contenido isotópico de carbono-13 distinto, como se puede observar en la Fig. 2. (Troughton, 1972).

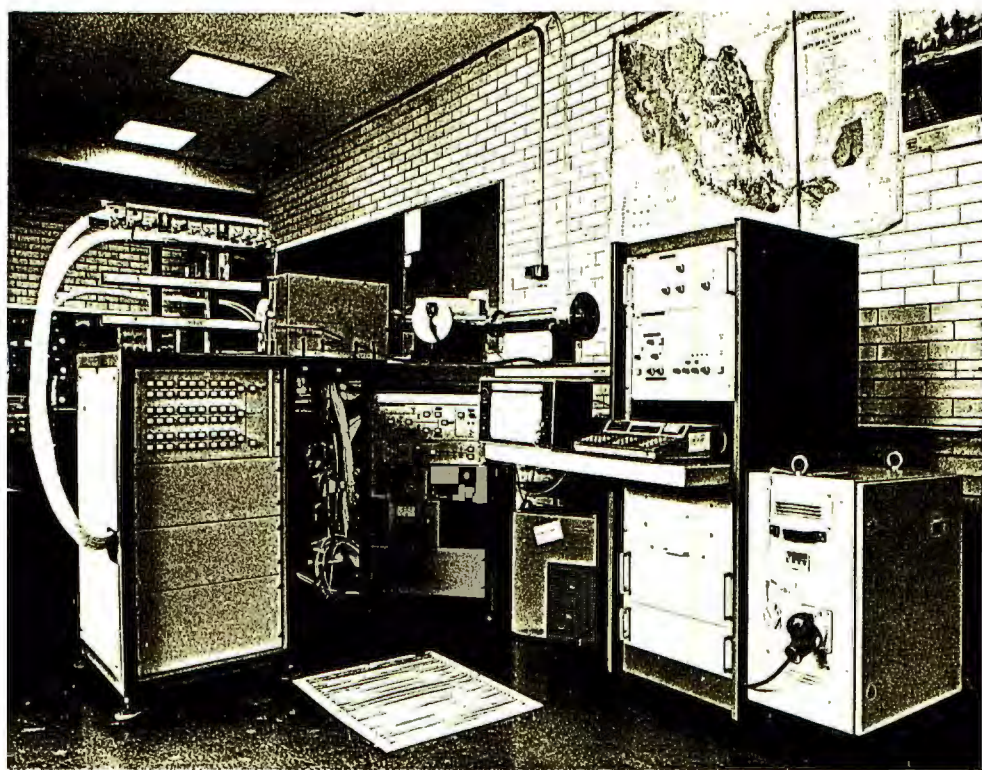


FIGURA 1

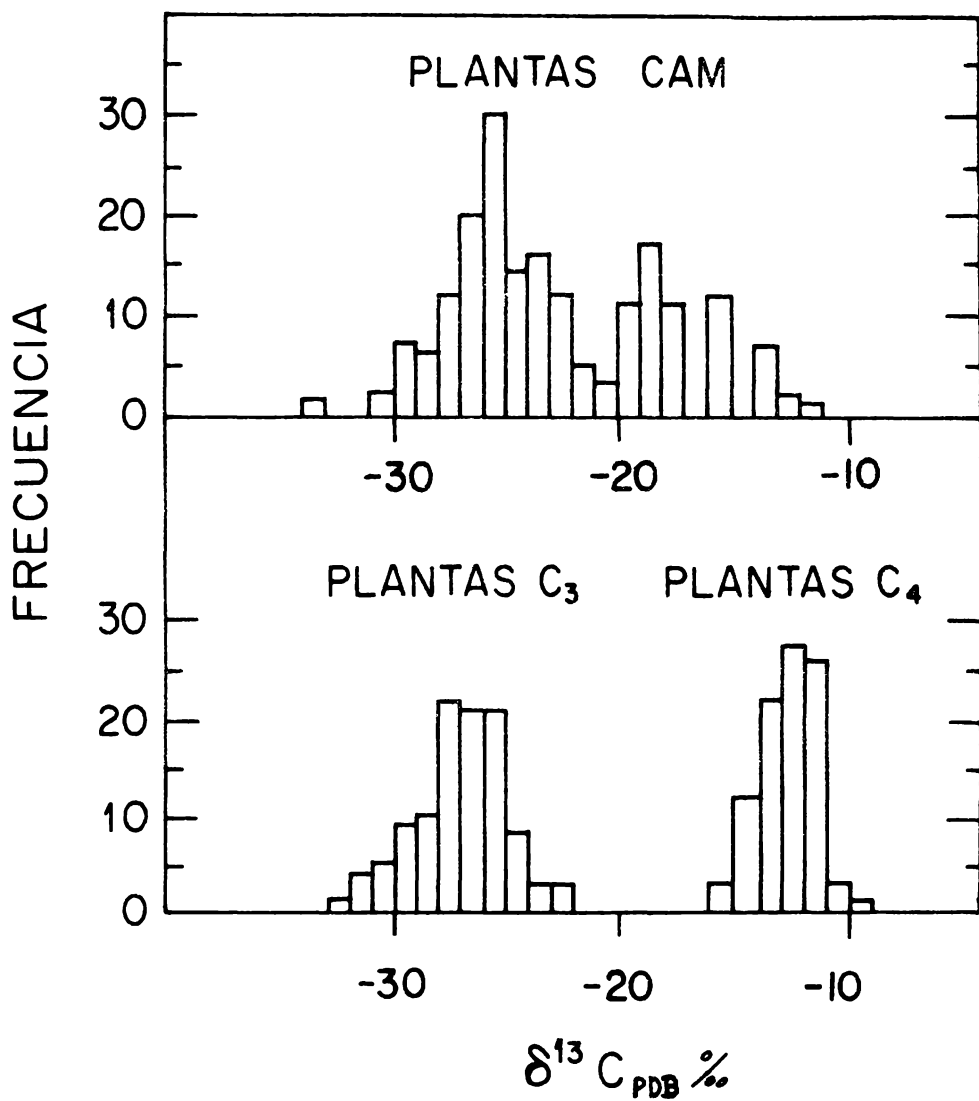


FIGURA 2

2.1 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO. Definición.

Al ocurrir los diferentes procesos fisicoquímicos en la naturaleza, los isótopos se redistribuyen en los diferentes componentes causando fraccionamiento isotópico. El fraccionamiento isotópico es causado por un fenómeno físico llamado efecto isotópico. Figura 3.

Este fraccionamiento isotópico se observa en términos de enriquecimiento ó empobrecimiento del isótopo pesado. Utilizando el término de cociente de abundancia isotópica decimos; si una sustancia se encuentra enriquecida en el isótopo pesado, es pesada por ejemplo para el caso de los carbonatos la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \approx 6\text{‰}$, y cuando se encuentra empobrecida, es ligera por ejemplo para el caso de las plantas C₃ la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \approx -27\text{‰}$. Un efecto isotópico, Figura 4, puede efectuarse en un sistema en equilibrio ó durante una reacción química (cinético).

Cuando ocurre un efecto isotópico en el equilibrio el isótopo pesado se acumula en particular en un componente de un sistema. Termodinámicamente el isótopo pesado se encuentra preferencialmente en el compuesto químico en el cual el elemento se encuentra con el enlace más fuerte. La magnitud de este efecto isotópico en el equilibrio puede ser representada por una constante de equilibrio. Por lo cual un factor de fraccionamiento puede ser reportado con respecto a la constante de equilibrio del sistema involucrado.

Un efecto isotópico cinético ocurre cuando la velocidad en una reacción química depende de la masa atómica de un elemento que se encuentre en una posición particular de una de las especies reactantes. Un efecto isotópico cinético primario se describe cuando la substitución isotópica se realiza en la posición en la cual hay cambios en los enlaces químicos. Un efecto isotópico cinético secundario ocurre cuando la substitución isotópica se realiza en una posición que no se encuentra involucrada con la reacción química. La magnitud de un efecto isotópico cinético puede ser representado en términos del cociente de constantes de velocidad. En el ejemplo de la Figura 4, para un efecto isotópico cinético las especies que contienen ^{12}C en la posición 2 reaccionan 1.0232 veces mas rápido que las especies que contienen ^{13}C en la misma posición. (Hayes, 1982).

Cuando en una reacción hay un efecto isotópico y la formación de productos no es cuantitativa siempre se observa un fraccionamiento isotópico.

En general los efectos isotópicos en el equilibrio se encuentran en la naturaleza en material inorgánico y los efectos isotópicos cinéticos en material orgánico.

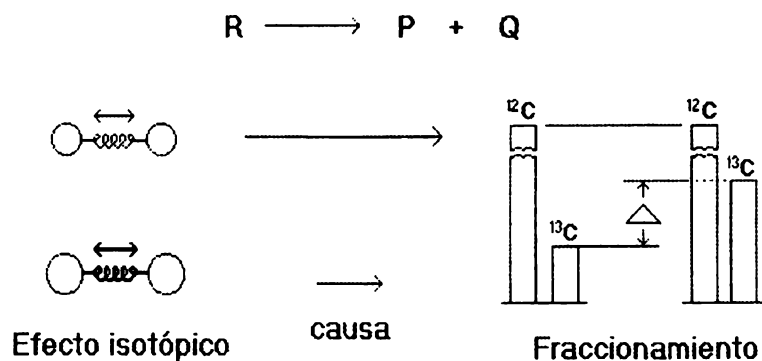
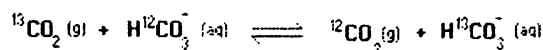


Figura 3. Representación esquemática de la relación entre efecto isotópico (fenómeno físico) y el fraccionamiento isotópico (en cantidad observable).

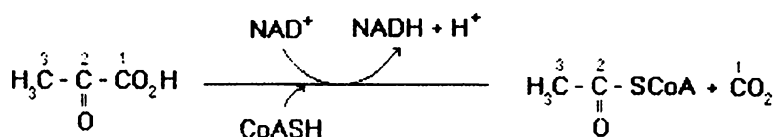
Efectos Isotópicos

a) Equilibrio.



$$K = \frac{1.0092}{1.0068} \quad \begin{matrix} (0^\circ\text{C}) \\ (30^\circ\text{C}) \end{matrix}$$

b) Cinética.



Piruvato deshidrogenasa

$$\left(\frac{^{12}\text{k}}{^{13}\text{k}} \right)_{\text{C}_2} = 1.0232$$

Figura 4. Ejemplos de efectos isotópicos.

2.2 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO DEL CARBONO EN LAS PLANTAS.

Durante la fotosíntesis, las plantas fijan el dióxido de carbono de manera que asimilan preferentemente al isótopo ligero del carbono (^{12}C), por lo que el contenido relativo del isótopo ^{13}C en la materia orgánica es menor que el contenido en el CO_2 atmosférico. Por lo tanto se dice que están empobrecidas en ^{13}C . Los principales mecanismos fotosintéticos para la fijación del carbono en las hojas de las plantas son conocidos como: C_3 , C_4 y CAM, y corresponden a diversas características anatómicas, bioquímicas, fisiológicas así como a distinto contenido de la relación de isótopos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

La gran mayoría de las plantas utiliza el mecanismo foto-sintético de la glucosa de tipo C_3 conocida también como Ciclo de Calvin (Fig. 5); en ella las plantas fijan el CO_2 por una reacción (oscura) catalizada por la ribulosa-1,5-difosfato (RUDP) formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato, de tres carbonos, al cual debe su nombre y esta substancia es posteriormente convertida en glucosa. A este ciclo pertenecen plantas principalmente de las zonas templadas, ejem: la vid, remolacha azucarera, papa, manzana, arce (maple), naranja, ciruela, cebada, arroz, centeno, trigo, durazno, plátano, tabaco, árboles, etc.

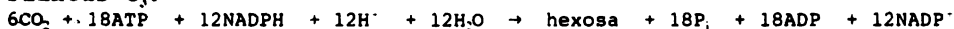
En las plantas que utilizan el ciclo C_4 ó de Hatch-Slack, de formación de glucosa (Fig. 6); las hojas de las plantas C_4 contienen dos tipos de células fotosintéticas, que presentan diferentes organizaciones bioquímica y estructural: las células tónico-vasculares rodean las venas y las células mesófilas están dispuestas libremente a su alrededor. Los primeros productos de fijación del CO_2 son ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (oxalacético, málico y aspártico), por los cuales se le da el nombre de plantas C_4 . El CO_2 se fija al inicio por una reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato-carboxilasa. Dando como resultado que el CO_2 se fije como oxalacetato en las células mesófilas. En algunas plantas C_4 , el malato formado por oxidación del oxaloacetato es transportado a las células tónico-vasculares, donde es descarboxilado por la enzima malato-deshidrogenasa (descarboxiladora). En otras plantas C_4 , el aspartato formado por la transaminación del oxaloacetato es finalmente descarboxilado en las células tónico-vasculares. Después el CO_2 liberado en estas dos reacciones, reacciona con la ribulosa-1,5-difosfato formando 3-fosfoglicerato, que es convertido en hexosa por el ciclo de Calvin en las células tónico-vasculares.

El ciclo de Hatch Slack, se completa por el transporte del piruvato a las células mesófilas, donde se transforma en oxaloacetato vía fosfoenolpiruvato. Se ha establecido que la fosfoenolpiruvato-carboxilasa del ciclo C_4 de las células mesófilas, posee una elevadísima afinidad por el CO_2 , mientras que, la ribulosa-difosfato-carboxilasa del ciclo de Calvin muestra una baja afinidad

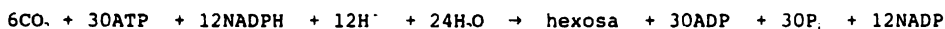
por el CO_2 . Por lo cual las células mesófilas sirven para coleccionar CO_2 con gran eficacia y después transferirlo a las células túnico-vasculares, para producir una elevada concentración de CO_2 , capacitando de esta forma a la ribulosa-difosfato-carboxilasa de las células túnico-vasculares para que fijen el CO_2 de un modo muy efectivo. A este ciclo pertenecen principalmente plantas tropicales, ejem: caña de azúcar, maíz, sorgo, amaranto, algodón, pastos, etc. (Hatch, Slack, Johnson, 1967 y Lenhinger, 1979).

Ecuaciones globales de la producción de hexosa por las plantas C_3 y C_4 :

Plantas C_3 :



Plantas C_4 :



Las plantas C_4 requieren, para sintetizar una unidad de hexosa, mucho más ATP que las plantas C_3 . A pesar del exceso de ATP que consumen, las plantas C_4 pueden sintetizar hexosa mucho más rápido por unidad de superficie de hoja, son más eficientes con las intensidades lumínicas. Las plantas C_3 muestran una fotorrespiración considerable por la oxidación del ácido glicólico que procede de una reacción con oxígeno (en vez de CO_2) con la ribulosa-difosfato. Sin embargo a pesar de que las plantas C_4 son mucho menos activas en fotorrespiración son mucho más eficientes en actividad fotosintética neta que las plantas C_3 . (Lenhinger, 1979).

El grupo de plantas CAM (Crasulacean Acid Metabolism), tienen un camino fotosintético similar a ambos grupos. En ausencia de luz se comportan como plantas C_3 , esto indica que durante la noche abren sus estomas y fijan el CO_2 con ayuda de la enzima ribulosa-1,5-difosfato (RUDP), y en presencia de luz cierran sus estomas y se comportan como plantas C_4 utilizando la enzima fosfoenol-piruvato-carboxilasa (PEP). (Ejem: en general plantas crasuláceas y cactáceas de las zonas desérticas: agave azul, piña, orquídeas, etc). (Somerville y colaboradores, 1984).

Las moléculas de bióxido de carbono atmosférico tiene diferentes variedades isotópicas $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (98.46%), $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (1.095%), $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ (0.195%), $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ (0.079%). Sin embargo, la relación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \sim -7.6\%$ y el los últimos 22 años casi no ha cambiado en ninguno de los dos hemisferios. Este valor se ha observado en aire marítimo lejos de influencias continentales y este valor esta corregido para eliminar el efecto de la presencia del N_2O que es un componente natural de la atmósfera. Es obvio que existan variaciones en el cociente de $\text{N}_2\text{O}/\text{CO}_2$ ($0.89 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ en 1978) que excedan un 5%, debido a cambios en la estación, latitud ó temporales en los cuales es necesario hacer correcciones significantes por el contenido de N_2C

(más de un 0.01 ‰). Valores más negativos de $\delta^{13}\text{C}_{\text{pDB}}$ han sido observados en aire continental, siempre y cuando se está lejos de zonas industriales. (Keeling, et al 1979, Mook y Jongsma 1987).

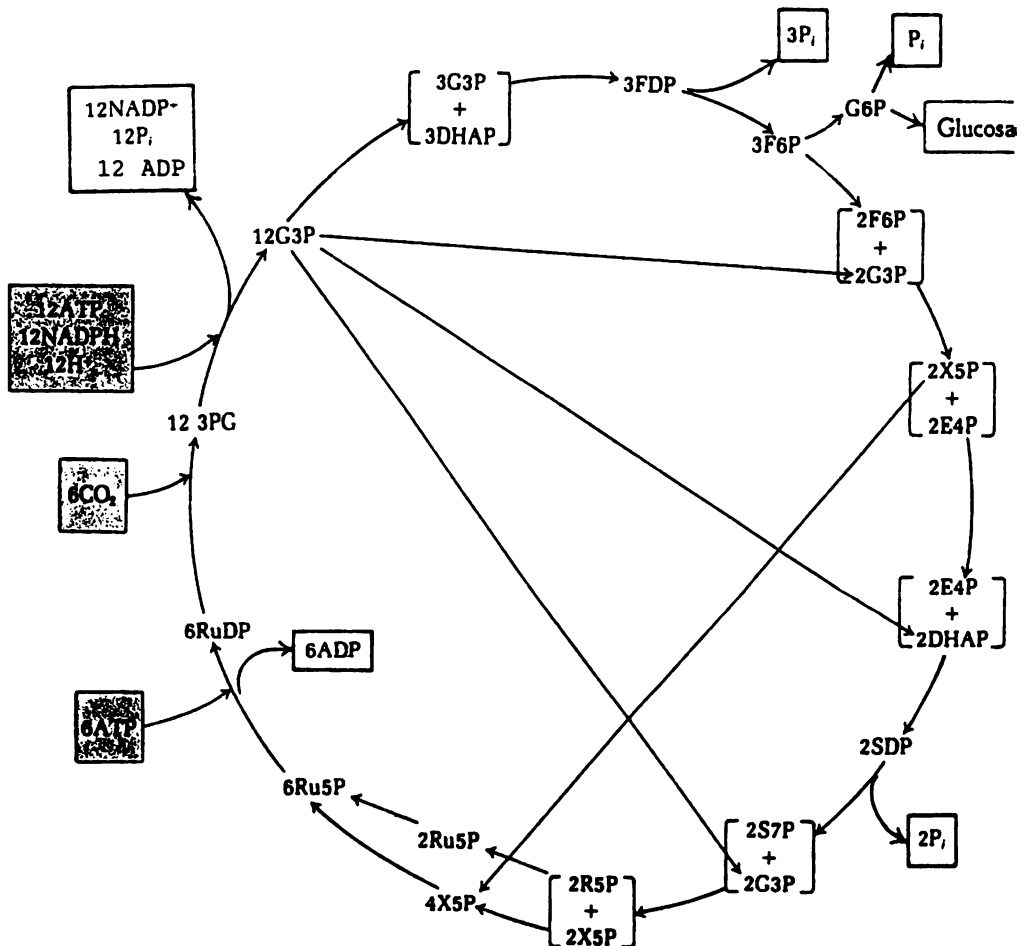
En todas las plantas, independientemente de la ruta fotosintética que utilicen, existe un fraccionamiento durante la fijación fotosintética del CO_2 en favor del isótopo ligero del carbono (^{12}C), por lo que tienen un bajo contenido de carbono-13 (^{13}C) con respecto al CO_2 atmosférico.

Este fraccionamiento isotópico se debe a las enzimas que catalizan los procesos primarios de carboxilación. Para las plantas C_3 la enzima RUBP-carboxilasa produce un fraccionamiento en el isótopo ^{13}C del orden de 17 ‰ y para las plantas C_4 , la enzima PEP-carboxilasa el fraccionamiento es menor, del orden de 2 a 5 ‰ en la fijación de CO_2 atmosférico. Los estudios realizados en plantas han ofrecido valores de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{pDB}}$ con un intervalo de -22 hasta -33 ‰, para las plantas C_3 , y para las plantas C_4 , se han encontrado valores en $\delta^{13}\text{C}_{\text{pDB}}$ con un intervalo de -10 a -20 ‰. (Bender, Margaret, 1971). Fig. 2 (Troughton, 1972).

Figura 5. Formación Fotosintética de la glucosa a partir de CO_2 , por el ciclo de Calvin.

Clave:

3PG = ácido 3-fosfoglicérico.
 G3P = gliceraldehído-3-fosfato.
 DHAP = fosfato de dihidroxiacetona.
 FDP = Fructosa-1-difosfato.
 F6P = Fructosa-6-fosfato.
 G6P = glucosa-6-fosfato.
 E4P = eritrosa-4-fosfato.
 X5P = xilulosa-5-fosfato.
 SDP = sedoheptulosa-1,7-difosfato.
 S7P = sedoheptulosa-7-fosfato.
 R5P = ribulosa-5-fosfato.
 Ru5P = ribulosa-5-fosfato.
 RuDP = ribulosa-1,5-difosfato.



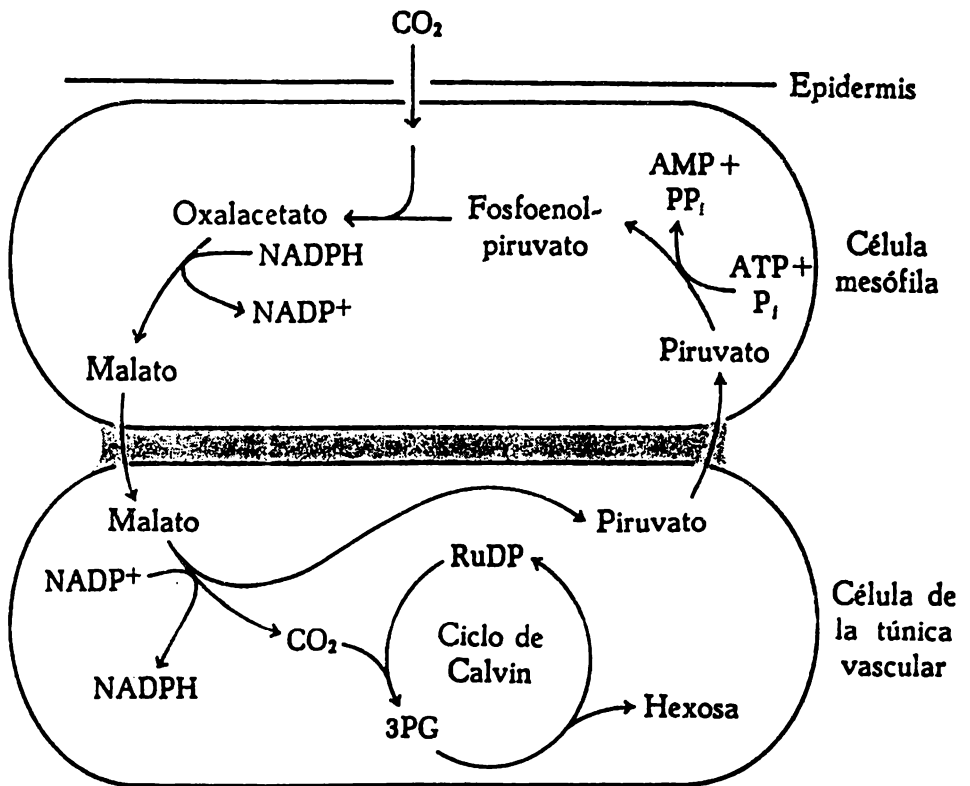


Fig 6. Ciclo de Hatch Slack de fijación del CO_2 en las plantas C_4 .

2.3 Análisis de Miel de Abeja.

La miel de abeja está considerada como un producto alimenticio proveniente del néctar de las flores ó de las secreciones de algunas partes de las plantas, la cual las abejas melíferas recogen, transforman, agregan sustancias específicas, guardan y dejan madurar en un panal de miel de una colmena.

El néctar de las flores es una solución acuosa que contiene azúcares, sales minerales, vitaminas, ácidos orgánicos y aceites esenciales, los cuales a pesar de encontrarse en pequeñas cantidades contribuyen significativamente al olor y sabor característico de la miel de abeja. La calidad de la miel de abeja además de ser un producto biológico con una compleja composición química depende de la naturaleza y cantidad de las especies botánicas que florecen durante el tiempo de la producción de la miel.

Tan pronto las abejas transfieren el néctar de las flores a su bolsa melaria, comienza la hidrólisis de (+)-sacarosa (rotación a $+66.5^\circ$) a D-(+)-glucosa (rotación a $+52.7^\circ$, denominada dextrosa) y D-(+)-fructosa (rotación a -92.4° denominada levulosa), por medio de la enzima invertasa secretada por las glándulas salivales de las abejas, a este proceso se le denomina inversión, ya que va acompañado de un cambio neto de rotación óptica, de dextro a levo, esta mezcla levógira se denomina azúcar invertido. Esta reacción bioquímica transforma el néctar en una sustancia diferente llamada miel inmadura. Una vez dentro de las celdas, la miel inmadura sigue siendo procesada por las abejas obreras hasta lograr la calidad deseada seguida de un proceso de secado hasta tener $\approx 18\%$ de humedad para ser finalmente operculada.

La miel de abeja madura es una solución supersaturada de azúcares, la cual solidifica como cristales de glucosa. Es necesario mantener la miel de abeja en recipientes y temperatura adecuados, de lo contrario sufre cambios químicos y biológicos, reduciendo su valor nutritivo y su calidad. Los tipos más importantes de deterioro resultan del proceso de fermentación, el cual causa: modificaciones químicas, que involucran la formación de alcohol etílico, dióxido de carbono y ácido acético; y modificaciones organolépticas como el deterioro del sabor y cambios en la apariencia de la miel. El fenómeno de la fermentación se promueve por la presencia de los siguientes factores: alto grado de humedad, alta concentración de enzimas y temperaturas entre los 20°C y 25°C .

El mayor componente de la miel de abeja son los azúcares (alrededor del 80%). De estos azúcares, la dextrosa ($31.28 \pm 3.03\%$) y levulosa ($38.19 \pm 2.07\%$) exceden el 70% de la miel, mientras que la sacarosa ($1.31 \pm 0.95\%$) y la maltosa ($7.31 \pm 2.09\%$) se encuentran en diferentes proporciones dependiendo del tipo de miel, también están presentes polisacáridos (1.50 ± 1.03) y azúcares sin determinar (3.1 ± 1.97).

La miel contiene de un 16 a un 18% de agua, desde el punto de vista tecnológico, el contenido de agua en miel de abeja es una característica cualitativa importante del producto, una cantidad mayor del 18% de agua propicia la fermentación de la miel.

La fracción ácida es muy importante en la miel aunque el mecanismo de formación no es claro. Esta incluye los ácidos orgánicos siguientes: ácido acético, ácido cítrico, ácido butírico, ácido fórmico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido málico, ácido oxálico, ácido piroglutámico y ácido succínico; y como ácidos inorgánicos incluye al ácido clorhídrico y al ácido fosfórico. La miel de abeja tiene un intervalo de pH entre 3.42 a 6.10 para 490 muestras con un promedio de pH = 3.91, (White, 1978).

El contenido de cenizas es muy bajo y muy variable desde 0.03 a 1%. La presencia de un alto contenido de sales minerales se observa en miel de abeja oscura en comparación con la miel de abeja clara. Se han encontrado cloruros (23-201 ppm), sulfuros (36-126 ppm) y fosfuros (23-58 ppm) de: potasio (100-4733 ppm), calcio (23-266 ppm), sodio (6-400 ppm), fierro (1.2-33.5 ppm), manganeso (0.17-9.53 ppm), magnesio (7-126 ppm), cobre (0.14-1.04 ppm). (White, 1978).

La miel de abeja es pobre en sustancias nitrogenadas; el valor promedio de contenido de proteínas es menor a 0.26%. Dieciocho aminoácidos generalmente están presentes, de los cuales la prolina, lisina, ácido glutámico y el ácido aspártico se encuentran en mayor cantidad.

Se asume que las enzimas presentes en la miel de abeja son de gran importancia. Por una parte, determinan el proceso biológico de la hidrólisis del azúcar y por otra parte permiten que la calidad de la miel pueda ser medida, ya que son sustancias termolábiles. La fuente de las enzimas proviene de: fuente vegetal, como lo son las flores que proporcionan el néctar y el polen y la fuente animal como lo son las enzimas de la glándula paringeal de las abejas. Las enzimas mas comunes son: la diastasa, la cual hidroliza el almidón a glucosa y consiste de α -amilasa y β -amilasa. La invertasa, que hidroliza la sacarosa en D-fructuosa y D-glucosa; la glucosa oxidasa, que transforma la glucosa en ácido glucónico; y la catalasa, la cual cataliza la reacción $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$, descomponiendo el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

El contenido de vitaminas en miel de abeja es bajo, e incluye las siguientes vitaminas hidrosolubles: tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina, ácido pantotémico, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico.

El sabor es una de las características más importantes de la miel de abeja, ya que obtenemos información acerca del origen y autenticidad de la miel, sin embargo esto es altamente subjetivo.

La presencia de hidroximetilfurfural (HMF) en la miel ha sido utilizado como indicador de calidad en cuanto a su procesamiento, tipo de envase y tiempo de almacenamiento, su cantidad se incrementa cuando aumenta la degradación de fructuosa. (Macrae R, y colaboradores, 1993).

La norma oficial mexicana NOM-F-36-A-1981, para la miel de abeja, indica que se deben cumplir las siguientes especificaciones:

- a) Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido con un mínimo de 63.88%.
- b) Contenido de sacarosa % (g/100g), con un máximo de 8%.
- c) Contenido de glucosa % (g/100g), con un máximo de 38%.
- d) Humedad (g/100g), con un máximo 20%. (La norma oficial de los Estados Unidos de Norteamérica acepta hasta 21%.)
- e) Sólidos insolubles en agua % (g/100g), con un máximo 0.3%, excepto la miel en panal. (La norma oficial de los Estados Unidos de Norteamérica acepta hasta 0.1%.)
- f) Cenizas % (g/100g), con un máximo 0.60%.
- g) Hidroximetilfurfural (HMF) expresado en mg/Kg, con un máximo de 150 mg/Kg. (La norma oficial de los Estados Unidos de Norteamérica acepta hasta 40 mg/Kg.)
- h) Dextrinas % (g/100g), con un máximo de 8%.
- i) Índice de diastasa, con un máximo de 4.

Así mismo el análisis microbiológico en miel de abeja no debe contener microorganismos patógenos, toxinas o inhibidores microbianos.

La miel de abeja deberá estar libre de fragmentos microscópicos de insectos, excretas de roedores u otra materia extraña.

No se permite el uso de aditivos alimentarios para su conservación, aguarla, ni mezclarla con almidón, melazas, glucosa, dextrinas o azúcares.

No deberá contener ningún contaminante químico (plaguicidas u otros) en cantidades que puedan presentar riesgo para la salud.

En cuanto a la cantidad de Hidroximetilfurfural (HMF), este dato es informativo en cuanto al procesamiento y almacenamiento de la miel de abeja, pero no conclusivo en cuanto a la adulteración con jarabes invertidos, solamente que se tengan valores muy altos (>50 mg/100g) debido a que el calentamiento a 60°C ó más para tamizarla y el tipo de envase modifican la cantidad de HMF, hasta 3 mg/100gr. Por lo cual es necesario adicionar otra técnica más precisa para detectar la adulteración en miel de abeja.

La norma oficial de miel en Estados Unidos de Norteamérica hasta 1978 tenía las mismas especificaciones que la mexicana. Sin embargo ya que ninguna de las especificaciones anteriores detectar

adulteraciones de la miel de abeja con jarabe de maíz (HFCS) ó de azúcar de caña y había un gran lucro económico en esta práctica de adulteración se hicieron grandes esfuerzos para mejorar la norma en Estados Unidos de Norteamérica.

En 1977 L. W. Donner y J. White iniciaron los trabajos para utilizar la composición isotópica de la miel en la determinación de su origen, basándose en el hecho de que los azúcares adulterantes como son el jarabe de maíz (HFCS) y el azúcar de caña provienen de plantas C_4 que son isotópicamente distintos de los azúcares de las plantas mielíferas que son generalmente del tipo C_3 .

Estos investigadores, analizaron 84 mieles certificadas representativas de 34 estados de Estados Unidos de Norteamérica cuyo intervalo de valores isotópicos para $\delta^{13}C_{PDB}$ va de -34.4 a -24.2 ‰ con un promedio de -25.2 ± 3.7 ‰, comprobando que la fuente de néctar de estas mieles corresponden a plantas C_3 y que estos análisis isotópicos podían utilizarse con un límite de detección hasta de 5.4% de jarabe de maíz (HFCS). Ziegler en Alemania obtuvo resultados similares a J. White pero empezaron a publicar resultados de $\delta^{13}C_{PDB}$ para miel de abeja de floraciones de cítricos y plantas CAM con una composición isotópica mucho más positiva. (-22.5 ‰ cítricos en Hawaii, -22.7 ‰ Arizona, -17.10 ‰ Aloe marthothii en Sudáfrica y -21.5 ‰ mezquite en México).

Estos resultados de $\delta^{13}C_{PDB}$ redujeron el poder de detección de la técnica e hicieron necesario que se desarrollara una técnica más refinada.

En 1980 White y Siciliano utilizaron varios métodos analíticos (clasificación de color; Hidroximetilfurfural; Coeficiente de transferencia de calor; cromatografía en capa fina; contenido de azúcar reductor, sacarosa y glucosa; contenido de cenizas; acidez; humedad; actividad de glucosa-oxidasas, invertasa, diastasa, etc) como métodos alternativos para detectar la adulteración en la miel de abeja con jarabe de maíz (HFCS) ya que esta contiene grandes cantidades de polímeros de glucosa no presentes en la miel.

Sin embargo ninguno de los métodos resultó concluyente aunque si pueden utilizarse como criterios parciales para determinar adulteración. Si el valor de HMF es mayor de 20mg HMF/100 gr de miel, si hay ausencia de polen ó el contenido de glucosa es mayor de 40%.

Basándose en el hecho que Bregner y Diemair (1975), encontraron 5 proteínas en miel, tres de las cuales eran procedentes de las abejas; y que D. J. Minson en 1975 demostró que existe una estrecha relación entre la composición isotópica de la dieta de los animales con la composición isotópica de sus cuerpos y productos, confirmados después en 1978 por Michael DeNiro y Samuel Epstein, White

desarrolló un nuevo método para detectar la adulteración con jarabe de maíz.

En este método White, 1989, separó la proteína de la miel mediante diálisis y precipitación con ácido túngstico y utilizó la diferencia entre la composición isotópica de la miel completa y la composición isotópica de la proteína como un indicador de la adulteración ya que la proteína de la miel, elaborada por la abeja debe tener una composición isotópica similar a la miel completa ya que ambas provienen del mismo néctar de las flores.

Esta técnica resultó ser de gran utilidad ya que permite la evaluación objetiva de adulteraciones de miel con un límite de detección de 7% y permite resolver la zona de incertidumbre para muestras cuyos valores de $\delta^{13}C_{PDB}$ están en un intervalo de -23.5 ‰ a -21.5 ‰. Para calcular el porcentaje de adulteración desarrollaron una fórmula en la cual utilizan la media obtenida de jarabe de maíz(HFCS), la cual tiene un valor promedio para la $\delta^{13}C_{PDB} = -9.7$ ‰. Consideran que una miel se encuentra adulterada si la diferencia entre $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína menos la $\delta^{13}C_{PDB}$ de miel completa es negativa, la fórmula que utilizan para determinar el porcentaje del contenido de adulterante es (White, 1989):

$$\% \text{ Adulteración} = 100 \left[\frac{\delta^{13}C_{PDB}(\text{proteína}) - \delta^{13}C_{PDB}(\text{miel})}{\delta^{13}C_{FDE}(\text{proteína}) - \delta^{13}C_{PDB}(\text{jarabe de maíz})} \right] \quad (2)$$

Esta técnica ha sido validada y mejorada por varios autores Brookes 1991, Krueger 1993, Coa Yachen 1993, así como por un estudio interlaboratorio realizado entre 9 laboratorios en 1992, White 1992 y a partir de esta fecha forma parte de la Norma Oficial de Miel de Abeja en los Estados Unidos de Norteamérica.

El objetivo del presente trabajo es dominar y utilizar el método analítico de separación y purificación de la proteína de miel de abeja mediante diálisis y precipitación directa con ácido túngtico para caracterizar las mieles producidas en México y proponer la adición de esta prueba a la norma Oficial Mexicana para la miel de abeja, para salvaguardar la autenticidad de la miel mexicana y desalentar las técnicas fraudulentas y lucrativas de la adulteración.

3.0 Resultados y Discusión.

3.1 Evaluación de las Técnicas Analíticas.

3.1.1 Reproducibilidad de patrones internacionales:

En esta sección se presenta la precisión y exactitud de los análisis isotópicos con un espectrómetro de masas, para ello como primer paso se realizaron las determinaciones de patrones internacionales de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ conocidos, cuyos resultados se encuentran en la Tabla I:

TABLA I

PATRONES INTERNACIONALES	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{‰} \pm \sigma$ Valores certificados por el NIST.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{‰} \pm \sigma$ LAB. IFUNAM Valores Experimentales.	Dif. P.I.	No.
SRM 8539 NBS-22 (Aceite)	-29.73 $\pm$ 0.09	-29.72 $\pm$ 0.02	0.01	20
SRM 8540 PEFI (Polietileno)	-31.77 $\pm$ 0.08	-31.81 $\pm$ 0.02	-0.04	20
SRM 8542 SUCROSE ANU (Sacarosa)	-10.47 $\pm$ 0.13	-10.39 $\pm$ 0.04	0.08	20
NBS-16 (CO ₂ puro)	-41.48 $\pm$ 0.03	-41.48 $\pm$ 0.03	0.00	20
NBS-17 (CO ₂ puro)	- 4.41 $\pm$ 0.02	- 4.43 $\pm$ 0.08	-0.02	05
NBS-18 (CaCO ₃ carbonatita)	- 5.04 $\pm$ 0.06	- 5.06 $\pm$ 0.08	-0.02	08
NBS-19 (CaCO ₃ mármol)	+ 1.95 $\pm$ 0.02	+ 1.95 $\pm$ 0.05	0.00	10
NBS-20 (CaCO ₃ mármol)	- 1.06 $\pm$ 0.02	- 1.04 $\pm$ 0.01	0.02	06
NBS-21 (Grafito)	-28.10 $\pm$ 0.03	-28.10 $\pm$ 0.02	0.00	05

Dif P.I: Es la diferencia de los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ certificados proporcionados por el NIST menos los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ experimentales obtenidos en el laboratorio.

No. Número de muestras analizadas en el laboratorio.

Los patrones internacionales; NBS-22, PEFI, Sacarosa ANU y NBS-21 se prepararon cuidadosamente con la técnica IFUNAM. C13. ORG. de combustión a 900°C para muestras orgánicas en tubo de cuarzo, descrita en el apéndice II, basada en la técnica descrita por Boutton y colaboradores en 1983.

Los patrones internacionales NBS-16 y NBS-17, son muestras de CO₂ gaseoso contenidas en tubos de vidrio, las cuales únicamente se

trasladan a frascos contenedores y una alícuota se determina directamente en el espectrómetro de masas (Coplen Taylor B., Kendall Carol & Hopple Jessica, 1983).

Los patrones internacionales NBS-18, NBS-19, y NBS-20 al ser muestras de carbonatos se prepararon con la técnica IFUNAM.C13.CA. la cual se encuentra descrita detalladamente en el apéndice II, basada en la técnica descrita por Craig, 1953.

De la Tabla I podemos asegurar que el espectrómetro de masas está calibrado y los métodos de preparación de las muestras se encuentran bajo control estadístico; ya que los valores son precisos y exactos.

Para asegurar el control estadístico de las muestras de miel de abeja y su fracción de proteína que se analizaron, simultáneamente se realizó el análisis de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de una alícuota de los siguientes patrones internacionales: SRM 8539 NBS-22, SRM 8540 PEFI y SRM 8542 Sacarosa ANU.

3.1.2 Reproducibilidad de los métodos de combustión.

Para estudiar la reproducibilidad de los métodos de combustión se eligió como patrón interno una miel de abeja sin procesar, no fermentada de extracción reciente, originaria de Tepic, Nayarit.

Se probaron tres métodos de combustión:

a) En tubo de pyrex a 550°C con óxido cúprico y plata basada en la técnica descrita por Zvi Sofer en 1980.

b) En tubo de cuarzo con óxido cúprico, plata y cobre metálico a 900°C y posteriormente a 650°C, basada en la técnica descrita por Mook y Jongsma 1987 quienes implementan el uso del cobre metálico en un sistema de combustión dinámico utilizando además O_2 ; y la técnica descrita por Boutton y colaboradores en 1983 que lo adecuan a la combustión en tubo de cuarzo.

c) Finalmente un tercero en tubo de cuarzo a 900°C con CuO y plata sin utilizar cobre metálico.

Se prepararon y analizaron 23 muestras de miel de abeja pura de Tepic, Nayarit con el método IFUNAM.C13.ORG. (Ver apéndice II) modificando solamente la temperatura de combustión y la presencia del cobre metálico.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

TABLA II. En Miel de Abeja Completa.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ Pyrex	No	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ Cuarzo	No	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ Cuarzo/SC	No
-25.98 ± 0.14	10	-26.15 ± 0.02	10	-26.18 ± 0.03	3

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰. Pyrex; es el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja obtenida por combustión a 500°C en tubo de pyrex con óxido cúprico y Ag^0 .

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰. Cuarzo; es el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja obtenida por combustión a 900°C y 650°C en tubo de cuarzo con óxido cúprico, Ag^0 y Cu^0 .

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰. Cuarzo/SC; es el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja obtenida por combustión a 900°C en tubo de cuarzo con óxido cúprico, Ag^0 sin Cu^0 .

No. Es el número de muestras realizadas.

La diferencia entre el valor de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja por combustión en pyrex menos el valor de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja por combustión en cuarzo es 0.16 ‰ y la diferencia entre la combustión en cuarzo con cobre y sin cobre metálico es de 0.03 ‰.

Los resultados de los análisis de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenidos muestran:

a) Una mejor precisión de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ utilizando el método de combustión en tubo de cuarzo con cobre metálico a 900°C (± 0.02) en comparación con la precisión obtenida para el método de combustión con tubo de pyrex a 550°C (± 0.14). El incremento de la desviación estándar se debe a que cuando se utiliza el método de combustión en tubo de pyrex a 550°C la combustión es incompleta. Esto se corrobora al medir la cantidad de CO_2 obtenida por la combustión; con 20 mg de miel la técnica de combustión en pyrex generó en promedio 8.43 cm^3 TPS ± 1.41 ; en contraste con la técnica de combustión en cuarzo la cual genera un promedio de 11.52 cm^3 TPS ± 0.67 .

Para tener una buena reproducibilidad en la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ es importante obtener un buen rendimiento en la combustión, no solo por la cantidad de gas que se requiere para realizar el análisis isotópico en el espectrómetro de masas sino porque una combustión incompleta produce un fraccionamiento isotópico.

b) La $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenida por la combustión de la miel de abeja en tubo de pyrex a 550°C fue más positiva 0.16 ‰ que la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenida por la combustión de la miel de abeja en tubo de cuarzo. A pesar de que la precisión de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenida por la combustión en tubo de pyrex a 550°C es aceptable. Así mismo observamos una pequeña diferencia negativa de 0.03 ‰, no significativa de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenida por la combustión en tubo de cuarzo sin cobre metálico a

900°C en comparación a la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenida por combustión en tubo de cuarzo con cobre metálico.

c) Otra aportación a la desviación de los análisis utilizando el método de combustión en tubo de pyrex ó en tubo de cuarzo sin cobre metálico es causado por el contenido de nitrógeno en la proteína, ya que de no tomarse precauciones especiales para eliminarlo es posible que se formen cantidades no controladas de N_2O cuyas masas isotópicas corresponden a las masas de CO_2 , por consiguiente causa discrepancias en las medidas entre las masas 45/44 y 46/44 en el espectrómetro de masas. Para eliminar este efecto es necesario utilizar cobre metálico. Durante la combustión a 650°C el N_2O se convierte en N_2 el cual es fácilmente removido al purificar el CO_2 (Técnica IFUNAM.C13.ORG). Como un ejemplo de esta interferencia podemos mencionar que el N_2O en el análisis de CO_2 atmosférico produce una desviación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = + 0.23 \text{ ‰}$. (Mook y Jongsma, 1987).

Considerando que la miel de abeja completa contiene pequeñas cantidades de nitrógeno, el efecto del cobre metálico no se aprecia con claridad en la tabla II por lo que se realizó el mismo experimento, utilizando una proteína pura de miel de abeja utilizando el método de combustión con tubo de cuarzo a 900°C con y sin cobre metálico. Obteniendo los siguientes resultados:

TABLA III Pirólisis de la proteína.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$ P/sCu	No.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$ P/cCu	No.	Dif.
-25.74	3	-25.67	3	0.07

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$ P/sCu; es el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína de la miel de abeja obtenida por combustión a 900°C en tubo de cuarzo con CuO y Ag^+ ; sin cobre metálico.

No. Es el número de muestras realizadas.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$ P/cCu; es el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína de la miel de abeja obtenida por combustión a 900°C y 650°C en tubo de cuarzo con CuO , Ag^+ y Cu^+ .

Dif. Es la diferencia entre el valor de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína de la miel de abeja por combustión en cuarzo con cobre metálico menos el valor de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína de la miel de abeja por combustión en cuarzo sin cobre metálico.

En el análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína se obtuvo una diferencia para $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = + 0.07 \text{ ‰}$ (Tabla III), este valor no tiene significado estadístico por la cantidad de muestras analizadas, sin embargo nos indica que es necesario utilizar el Cu^+ durante la combustión de las muestras.

Para poder corroborar la eficiencia de los dos métodos de combustión, se analizaron 47 muestras de miel de abeja (Tabla IV), obteniendo una relación entre la combustión de miel de abeja en pyrex a 550°C y combustión de miel de abeja en cuarzo con cobre metálico a 900°C y 650°C, gráfica I, expresado por $y = 0.624 + 1.02x$; $r = 0.899$; a partir de los siguientes resultados:

TABLA IV. Pirólisis de miel de abeja.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{‰}$ Pyrex	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{‰}$ Cuarzo	Diferencia
-26.85	-26.05	-0.80
-24.43	-24.74	0.31
-23.16	-23.45	0.29
-24.13	-24.63	0.50
-24.84	-25.21	0.37
-22.96	-23.46	0.50
-24.84	-26.08	1.24
-25.25	-26.17	0.92
-26.11	-26.26	-0.15
-25.33	-26.00	0.67
-25.44	-25.64	0.20
-25.81	-25.98	0.17
-25.55	-25.82	0.27
-26.25	-26.35	0.10
-25.29	-24.91	-0.38
-25.50	-24.25	-1.25
-24.19	-24.44	0.25
-24.31	-24.38	0.07
-24.32	-24.36	0.04
-26.09	-26.26	0.17
-25.90	-25.99	0.09
-24.62	-24.90	0.28
-25.85	-25.66	-0.19
-25.44	-25.64	0.20
-25.81	-25.98	0.17
-26.36	-25.75	-0.61
-26.27	-25.66	-0.61
-26.19	-26.00	-0.19
-26.02	-25.64	-0.38
-26.85	-25.88	-0.97
-24.71	-25.96	1.25
-25.49	-25.51	0.02
-25.26	-25.53	0.27
-25.54	-25.49	-0.05
-25.36	-25.87	0.51
-27.28	-25.59	-1.69
-27.20	-25.60	-1.60
-25.28	-25.54	0.26
-25.36	-25.43	0.07
-26.23	-25.42	-0.81
-25.43	-25.45	0.02
-25.48	-25.57	0.09
-25.46	-25.44	-0.02
-24.63	-24.72	0.09
-19.07	-19.26	0.19
-26.18	-25.99	-0.19
-22.28	-22.56	0.28

Pie de la Tabla IV.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Pyrex; es el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja obtenida por combustión a 500°C en tubo de pyrex con CuO y Ag°.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Cuarzo; es el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja obtenida por combustión a 900°C y 650°C en tubo de cuarzo con CuO, Ag° y Cu°.

Dif. Es la diferencia entre el valor de la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja por combustión en pyrex menos el valor de la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja por combustión en cuarzo.

Para determinar si los dos métodos son equivalentes se efectuó el análisis de variancia aplicado a los dos métodos de combustión de la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la combustión de miel de abeja en pyrex y la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la combustión de miel de abeja en cuarzo con cobre metálico:

TABLA V. Análisis de Variancia.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Métodos	1	0.000776	0.000776	0.00047
Error	92	151.8874	1.65095	
Total	93	151.8882		

($F_{0.05} = 3.92$ con 1 y 92 grados de libertad).

Hipótesis nula: $\delta^{13}C_{PDB}$ (cuarzo) = $\delta^{13}C_{PDB}$ (pyrex)

Hipótesis alterna: $\delta^{13}C_{PDB}$ (cuarzo) $\neq$ $\delta^{13}C_{PDB}$ (pyrex)

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

La hipótesis nula se acepta, por lo que se asegura que en el método de combustión en pyrex se obtienen resultados de $\delta^{13}C_{PDB}$ equivalentes al método de combustión en cuarzo, dado que:

$F = 0.00047$ no sobrepasa 3.92 para 1 y 92 grados de libertad.

Sin embargo a pesar de que estadísticamente ambos métodos de combustión son semejantes. Los resultados de los análisis de $\delta^{13}C_{PDB}$ obtenidos muestran:

a) En lo general la $\delta^{13}C_{PDB}$ (Tabla IV) obtenida por la combustión de miel en tubo de pyrex es más positiva 0.58 ‰ aproximadamente que la $\delta^{13}C_{PDB}$ obtenida en la combustión de miel en tubo de cuarzo. Sin embargo la diferente precisión de la $\delta^{13}C_{PDB}$ obtenida para cada muestra y la imposibilidad de utilizar cobre metálico a 650°C en el caso del método de combustión en pyrex hace que el método de combustión en cuarzo con cobre metálico a 900°C y 650°C se considere como el método más adecuado para realizar la combustión de la miel de abeja y su proteína.

b) No se puede utilizar el patrón internacional NBS-22 como medio de control estadístico para corregir las desviaciones del análisis de $\delta^{13}C_{PDB}$ cuando se realiza la combustión en tubo de pyrex a 550°C.

El NBS-22 es un aceite cuya combustión se realiza fácilmente tanto a 550°C como a 900°C (Tabla I). Mientras que la combustión a 550°C de miel de abeja, cuya composición química es más compleja y varía de muestra a muestra produce valores más positivos ó negativos con respecto a la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenida por combustión en tubo de cuarzo a 900°C. Es por ello que la miel de abeja requiere una pirólisis total utilizando el método de combustión en tubo de cuarzo a 900°C y 650°C con CuO , Ag^0 y Cu^0 .

3.1.3 Reproducibilidad de los métodos para extraer y purificar la fracción de proteína de la miel de abeja.

Como se mencionó anteriormente las muestras de miel de abeja con un contenido de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ entre -21 ‰ y -23.5 ‰ de origen certificado, (White 1989), pueden ser consideradas como adulteradas, por lo que es necesario realizar el análisis isotópico en la proteína de la miel de abeja.

El análisis de la proteína de la miel de abeja requiere que esta sea separada y purificada previamente a su análisis de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, en la literatura se encontraron reportados dos métodos para este propósito y a continuación describiré la evaluación de ambos métodos.

Método de precipitación directa: la proteína se precipita con ácido túngstico en un baño a 80°C con agitación, y posteriormente se separan los carbohidratos de la proteína por medio de 5 ciclos de lavado y centrifugado. (White, 1989).

Método de diálisis-precipitación: inicialmente los carbohidratos y levaduras son separados de la proteína utilizando una membrana de celulosa para diálisis, posteriormente la muestra se centrifuga para retirar el polen u otras partículas. La proteína se precipita con ácido túngstico alrededor de 80°C en una parrilla y es separada por centrifugación; se procede a un solo ciclo de lavado y centrifugado. (White, 1992).

La descripción detallada de ambos métodos para la extracción y purificación de la proteína de la miel de abeja se encuentran en el Apéndice II.

Para realizar la evaluación completa de ambos métodos de separación y purificación de la proteína se diseñaron los siguientes experimentos:

- a) Evaluación utilizando una miel pura certificada como patrón interno.
- b) Evaluación utilizando mezclas artificiales preparadas con miel de abeja pura y un adulterante.

c) Evaluación utilizando muestras de miel de abeja comerciales.

a) Evaluación utilizando una miel pura certificada como patrón interno.

Se extrajo y purificó la proteína de 20 alícuotas de la miel de abeja utilizada como patrón interno de Tepic, Nayarit, utilizando los dos métodos descritos anteriormente. Las muestras de proteína se pirolizaron utilizando el método de combustión en tubo de cuarzo a 900°C y 650°C con CuO, Ag^o y Cu^o, (IFUNAM.C13.ORG), el CO₂ producido y purificado se analizó en el espectrómetro de masas y se obtuvieron los resultados de la tabla VI:

TABLA VI Evaluación de la precisión de $\delta^{13}C_{PDB}$ de los métodos de purificación de la proteína utilizando una miel certificada.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ W	No.	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ DP	No.	Dif.
-25.67 ± 0.05	10	-25.79 ± 0.09	10	0.12

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ W. Es el valor de la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína obtenida por el método de precipitación directa con ácido túngstico.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ DP. Es el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína obtenida por el método de diálisis-precipitación.

No. es el número de muestras que se realizaron para obtener la desviación estándar.

Dif. es la diferencia que hay entre la $\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ W (precipitación directa y la $\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ DP (diálisis - precipitación).

Para este caso de una miel de abeja pura, la precisión y exactitud en ambos métodos es excelente.

b) Evaluación utilizando mezclas artificiales preparadas con miel de abeja pura y un adulterante.

Para realizar esta evaluación se prepararon dos juegos de mezclas; a partir de miel de abeja pura y como adulterante en el primer juego se utilizó azúcar de caña y en el segundo caso jarabe de maíz (HFCS). Ambas mezclas contenían 0%, 25%, 50%, 75% y 100% en peso para cada adulterante y para cada una de ellas se realizó la extracción de la proteína por ambos métodos.

Cada una de las diez mezclas preparadas se pirolizaron (IFUNAM.C13.ORG) y se analizaron, los resultados de $\delta^{13}C_{PDB}$ en el espectrómetro de masas fueron los siguientes: (Tablas VII y VIII; gráficas II y III).

TABLA VII Resultados de $\delta^{13}C_{PDB}$ de mezclas de miel de abeja con azúcar de caña.

Azúcar de Caña	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Miel	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ DP	%	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ W	%
0	-26.15	-25.79	0.00	-25.67	0.00
25	-21.89	-25.79	26.97	-25.54	25.69
50	-18.19	-25.70	52.26	-25.44	51.38
75	-14.65	-25.72	76.93	-23.12	71.84
100	-11.33		100.00		100.00
		-25.75 ± 0.04		-24.94 ± 1.06	

Azúcar de Caña % en peso.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰. Miel. Es el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

$\delta^{13}C$ DP. Es el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína obtenida por el método de diálisis-precipitación.

$\delta^{13}C$ W. Es el valor de la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína obtenida por el método de precipitación directa con ácido tungstico.

%. Es el porcentaje de adulteración, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Adulteración} = 100 * \frac{\delta^{13}C_{PDB}(\text{proteína}) - \delta^{13}C_{PDB}(\text{miel})}{\delta^{13}C_{PDB}(\text{proteína}) - (-11.33)} \quad (3)$$

GRAFICA II
ADULTERACION CON AZUCAR DE CAÑA

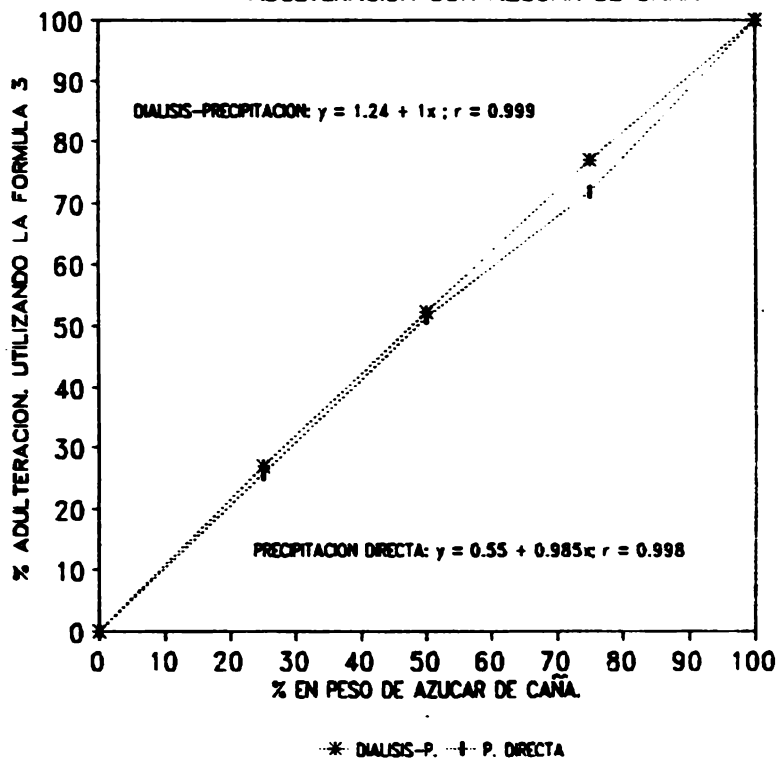


TABLA VIII Resultados de $\delta^{13}C_{PDB}$ de mezclas de miel de abeja con jarabe de maíz (HFCS).

Jarabe de maíz	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Miel	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ DP	%	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ W	%
0	-26.15	-25.79	0.00	-25.67	0.00
25	-22.39	-25.79	21.99	-25.54	20.71
50	-18.54	-25.79	48.90	-25.46	45.74
75	-14.58	-25.78	72.49	-23.16	66.87
100	-10.33		100.00		100.00
		-25.79 ± 0.004		-24.96 ± 1.04	

Jarabe de maíz (HFCS). % en peso.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ miel. Es el $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

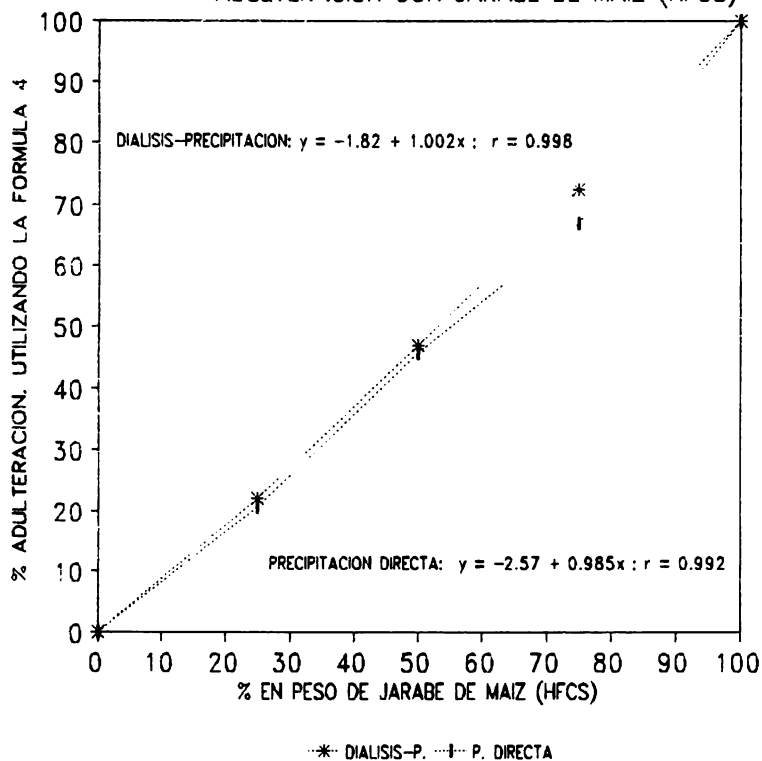
$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ DP. Es el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína obtenida por el método de diálisis-precipitación.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ W. Es el valor de la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína obtenida por el método de precipitación directa con ácido túngstico.

%. Es el porcentaje de adulteración, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Adulteración} = 100 * \frac{\delta^{13}C_{PDB}(\text{proteína}) - \delta^{13}C_{PDB}(\text{miel})}{\delta^{13}C_{PDB}(\text{proteína}) - (-10.33)} \quad (4)$$

GRAFICA III
ADULTERACION CON JARABE DE MAIZ (HFCS)



Como se puede observar en las tablas VII y VIII para el caso de las adulteraciones con miel de maíz (HFCS) ó azúcar de caña, el método de precipitación directa de la proteína mostró ineficiencia para purificar la proteína de los azúcares disueltos en mezclas con un porcentaje mayor al 25% de adulteración, a pesar de que estas muestras se lavaron 10 veces. Esto se observa claramente con los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ obtenidos por el método de precipitación directa; que a medida en que hay una adulteración mayor la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína es semejante a la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ del adulterante, en comparación con el método de diálisis - precipitación en el cual la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ permanece siempre constante, por lo tanto se recomienda utilizar el método de diálisis-precipitación.

Las mezclas anteriores se pueden utilizar también como curvas de calibración para calcular el % de adulteración que de acuerdo con White y Winters (1989) se puede obtener utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Adulteración} = 100 * \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{proteína}) - \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{miel})}{\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{proteína}) - \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{adulterante})} \quad (5)$$

Donde si la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{miel de abeja}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{proteína})$ el % de adulteración es cero. Y cuando la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{miel de abeja}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{adulterante})$ el % de adulteración es 100%.

Aplicando la ecuación 5 a los resultados de las tablas VII y VIII, substituyendo la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{adulterante})$ por -11.33 ‰ para el azúcar de caña y -10.33 ‰ para el jarabe de maíz (HFCS), se obtienen los porcentajes de adulteración de las columnas 4 y 6 de dichas tablas, cuyos valores se encuentran en las gráficas II y III.

En las gráficas II y III se puede observar lo siguiente:

- En ambas existe una correlación mejor que $r = 0.99$ entre los porcentajes de adulteración calculados a partir de los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína y la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja contra los porcentajes en peso de las mezclas preparadas. Esta correlación es mejor para el método de diálisis precipitación de la proteína que para el método de precipitación directa de la proteína.

En algunos casos al utilizar las fórmulas de adulteración, ésta produce valores negativos de adulteración, estos se reportan como 0.0% de adulteración por carecer de sentido físico. (Gráficas II y III).

Nota: Para el jarabe de maíz utilizado en este experimento (una muestra) la $\delta^{13}C_{PDB} = -10.33 \text{ ‰}$, mientras que; White y Winters, 1989, sugiere utilizar el valor promedio para jarabe de maíz (HFCS) de -9.7 ‰ , este hecho tiene como objetivo homologar criterios, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Adulteración} = 100 \left[\frac{\delta^{13}C_{PDB} (\text{proteína}) - \delta^{13}C_{PDB} (\text{miel})}{\delta^{13}C_{PDB} (\text{proteína}) - (-9.7)} \right] \quad (6)$$

Por lo tanto los resultados indican que: se debe utilizar el método de diálisis-precipitación para extraer y purificar la proteína. La pirólisis de la miel de abeja y la proteína se debe realizar por el método de combustión en tubo de cuarzo a 900°C y 650°C (IFUNAM.C13.ORG), y utilizar la fórmula 6 para determinar el porcentaje de adulteración.

Como una prueba adicional se trato ver si existía una correlación entre la cantidad de proteína contenida en la miel de abeja con respecto a la adulteración. No se encontró ninguna correlación entre la cantidad de proteína de la miel y la adulteración, mediante el método de precipitación directa se obtuvo un promedio de 210 mg. de proteína/100 gr de miel de abeja con un intervalo de 56 a 900 mg. Y para el caso del método de diálisis-precipitación se obtuvo un promedio de 327.8 mg de proteína/100 gr de miel de abeja con un intervalo de 75 a 340 mg.

c) Evaluación de los métodos de purificación y extracción de la proteína con muestras de miel de abeja comercial.

Como última prueba de evaluación de los métodos de purificación de la proteína se analizaron 20 muestras reales de miel de abeja para hacer una evaluación estadística mediante análisis de variancia. Los resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de las muestras que se obtuvieron se muestran en la tabla IX.

TABLA IX Evaluación de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de los métodos de purificación para muestras de miel de abeja comercial.

Procedencia	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ Miel	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ W.	%	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ DP	%	Dif. W-PD
Nayarit	-26.15	-25.67		-25.79		0.12
Campeche	-24.38	-24.70	2.13	-24.67	1.94	-0.03
Campeche	-24.36	-24.55	1.28	-24.48	0.81	-0.07
Campeche	-26.23	-24.32		-25.47		1.15
Campeche	-25.99	-25.27		-25.48		0.21
Yucatán	-24.90	-25.78	5.47	-24.94	0.26	-0.84
Yucatán	-25.91	-26.63	4.25	-25.06		-1.57
Yucatán	-25.88	-25.72		-25.48		-0.24
Campeche	-25.53	-25.48		-24.93		-0.55
Campeche	-25.49	-25.72	1.43	-25.00		-0.72
Campeche	-25.60	-25.97	2.27	-25.09		-0.88
Campeche	-25.54	-25.78	1.49	-25.18		-0.60
Campeche	-25.43	-25.70	1.69	-24.08		-1.62
Campeche	-25.45	-25.62	1.07	-25.63	1.30	0.01
Campeche	-25.57	-25.83	1.61	-25.79	1.37	-0.04
Yucatán	-24.74	-26.02	7.84	-25.35	3.90	-0.67
Ags.	-22.56	-22.19		-22.55		0.36
S.L.P.	-24.18	-25.55	8.64	-24.56	2.56	-0.99
*	-27.14	-24.39		-23.50		-0.89
D.F.	-19.26	-20.56	11.97	-20.53	11.73	-0.03

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ miel. Es el valor de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ W. Es el valor de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína obtenida por el método de precipitación directa con ácido túngstico.

%. Es el porcentaje de adulteración calculado con la fórmula 6.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ ‰ DP. Es el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína obtenida por el método de diálisis - precipitación.

Dif. W-DP. Es la diferencia entre la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína obtenida por el método de precipitación directa con ácido túngstico y la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína obtenida por el método de diálisis-precipitación.

TABLA X. Análisis de Variancia de los resultados de la tabla IX.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
Materiales	2	1.81	0.91	0.43
Error	57	120.55	2.11	
Total	59	122.36		

($F_{0.05} = 3.15$)

Hipótesis nula: $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{miel de abeja}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{proteína precipitación directa}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{proteína diálisis-precipitación})$.

Hipótesis alterna: $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{miel de abeja}) \neq \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{proteína precipitación directa}) \neq \delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{proteína diálisis-precipitación})$.

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

La hipótesis nula no puede rechazarse debido a que el valor obtenido $F = 0.43$ no excede 3.15, que corresponde al valor de $F_{0.05}$ con 2 y 57 grados de libertad, por lo cual concluimos que los resultados son consistentes para los métodos involucrados.

Para este caso de miel de abeja, el análisis de variancia nos indica resultados consistentes entre ambos métodos, sin embargo las diferencias que se observan son:

a) Mayor desviación en los resultados en el método de precipitación directa con ácido túngstico ya que hay mayor probabilidad de precipitar polen y levaduras conjuntamente con la proteína, porque el tamizado no es eficiente para retirar este tipo de partículas, que aunque se encuentren en pequeñas proporciones, alteran los resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.

b) Durante la precipitación de la proteína por el método directo como se mencionó anteriormente se precipitan las levaduras que contenga la miel, dando resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ más negativos para el caso de la proteína y una $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ más positiva en el caso de la miel de abeja completa. Por lo cual es importante detectar las mieles que se encuentren fermentadas y desecharlas.

c) En el método de precipitación directa se realizan 5 ciclos de lavado para retirar los carbohidratos presentes, en contraste con un solo ciclo de lavado para el método de diálisis-precipitación, el múltiple lavado hace más probable la pérdida de proteína y por lo tanto se tiene una mayor dispersión en el análisis de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.

Debido a lo anterior se tomaron en cuenta para los tratamientos estadísticos preferentemente los resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína obtenidos por el método de diálisis-precipitación de las muestras de las tablas XIII y XV, ya que no fue posible purificar la fracción de proteína por este método para todas las mieles debido al tamaño de las muestras.

3.2 Composición Isotópica en Plantas:

Con el objeto de conocer la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de las principales plantas de la región apícola más importante de México se tomaron muestra de diferentes partes de las plantas.

3.2.1 Plantas: Primero se determinó el contenido isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de hojas, tallo, flor, polen y néctar de algunas plantas pertenecientes a los 3 grupos fotosintéticos, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla XI):

TABLA XI.

PLANTA	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$
1. Procedencia: Planta C_3 .	
Hojas	-28.85
Tallo	-27.74
Flor	-27.50
2. Procedencia: Maíz C_4 .	
Hojas	-14.39
Polen	-14.53
Tallo	-13.73
HFCS (Comercial)	-10.33
3. Procedencia: Nopal CAM.	
Hojas	-13.59
Néctar	-13.61

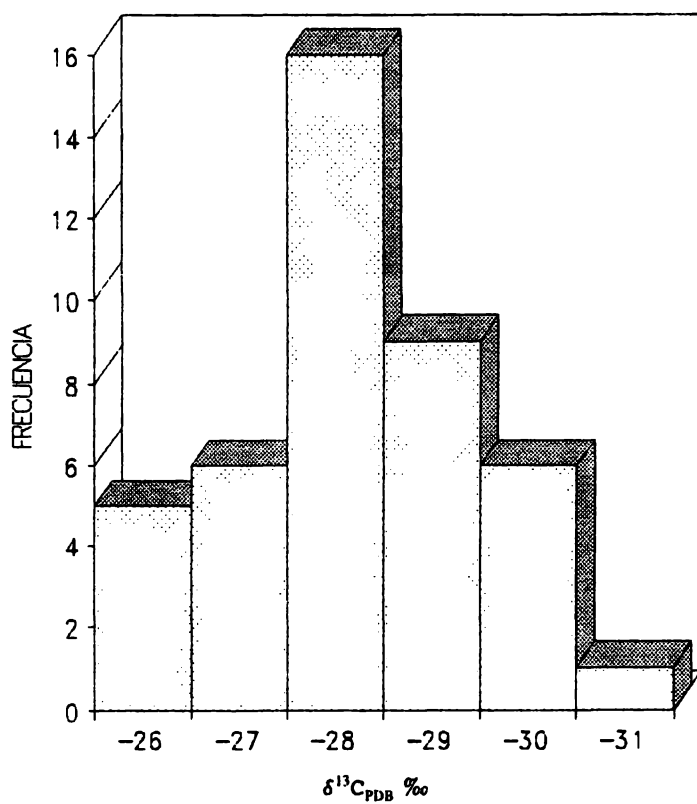
Los resultados anteriores muestran lo que ya ha sido reportado previamente en la literatura, que el efecto más fraccionante con respecto al ^{13}C es la fotosíntesis y por lo tanto los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ más negativos de compuestos orgánicos se encuentran en las hojas y a medida que se transforman estos compuestos se hacen más positivos.

3.2.2 Hojas: Debido a que la primera fijación de CO_2 durante la fotosíntesis se lleva a cabo en las hojas, se eligieron éstas para determinar la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de las plantas mielíferas del estado de Campeche y el segundo factor por el cual se determinó este valor en las hojas fue debido a que las flores muestreadas eran insuficientes para el análisis.

Se midió la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ para 42 muestras de hojas de plantas mielíferas obteniendo un promedio de $-28.22 \pm 1.22 \text{ ‰}$, todas estas plantas son C_3 y con valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ muy negativos, como se puede observar su distribución en la Gráfica No. IV.

GRAFICA IV

HOJAS DE PLANTAS MIELIFERAS
DEL ESTADO DE CAMPECHE



3.2.3 Polen: También se midió la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de 20 muestras de polen procedente del Estado de Morelos obteniéndose valores de -14.4 a -30.05 ‰. el promedio de 3 mezclas = -19.6 ‰ correspondiente a un 40% de plantas C_4 y a un 60% de plantas C_3 . Lo anterior indica que aunque las abejas son muy selectivas al tomar preferentemente el néctar de plantas C_3 , cuando recolectan el polen para sus necesidades de crianza, éste puede ser de cualquier tipo de planta ya sea C_3 , C_4 ó CAM.

En el análisis microscópico del polen (efectuado en la Universidad Autónoma de Campeche) no se ha encontrado una miel de abeja que provenga de una sola especie vegetal, por lo que el polen más frecuente en por ciento se considerará como determinante y dará su nombre a la muestra si contiene por lo menos un 50% de un mismo polen (Espina y Ordetx, 1984). En nuestro caso el análisis isotópico de polen no mostró ser un método que indicara procedencia, debido a la gran variedad que representa y su dispersión en la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ afecta en gran medida el valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja.

3.3 Composición isotópica de miel de abeja:

Se midió la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ para 77 muestras de miel de abeja recolectadas en los Estados de Campeche y Yucatán obteniéndose un promedio para $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en miel completa de -25.21 ± 1.21 ‰, la distribución de estas mieles se puede observar en la gráfica No. V, en el caso de estas mieles cada una de ellas fue colectada como producto terminado para su exportación ó venta. En el Estado de Campeche se observa un cambio homogéneo en la floración dominante de acuerdo al siguiente calendario:

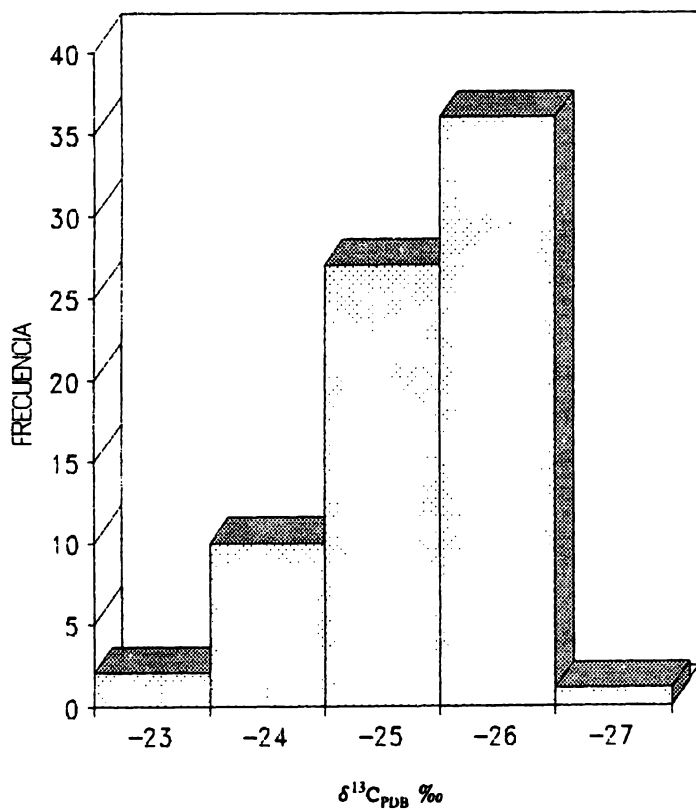
- | | |
|-------------------|--------------------|
| - Febrero-Marzo | Floración Amarilla |
| - Marzo-Mayo | Floración Blanca |
| - Mayo-Septiembre | Floración Diversa |
| - Octubre-Enero | Enredaderas |

Es importante mencionar que estas épocas pueden variar un poco en función a las lluvias que se presenten durante el año.

A pesar de ello es difícil obtener una miel exclusiva de algún tipo de floración. Algunas de las plantas mielíferas más importantes en el Estado de Campeche y Yucatán son:

- Tah ó Tajonal (*Viguiera helianthoides*), florece de finales de diciembre, enero y febrero, de esta planta se obtiene el 80% aproximadamente de toda la miel que se produce en el Estado de Campeche durante estos meses.
- Tsitsilché ó Dzidzilché (*Gymnopodium antigonoides*) y la Tzalam (*Lysiloma bahamensis*), son árboles que florecen en los meses de marzo y abril dando lugar a una segunda etapa fuerte de producción.

GRAFICA V
MIEL DE ABEJA DE LOS ESTADOS DE
CAMPECHE Y YUCATAN



- Xtabentun (*Rivea corymbosa*), su época de floración de esta enredadera es en los meses de noviembre y diciembre, la cual es dominante en la región.

De acuerdo con estas plantas predominantes en la región se clasifican las mieles, algunas se clasifican con el nombre de mil flores, ya que la floración es diversa y no predomina ninguna de ellas.

De esta forma se encontró que la miel de abeja en determinada cosecha era homogénea con respecto a la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, de acuerdo a los siguientes resultados (Tabla XII):

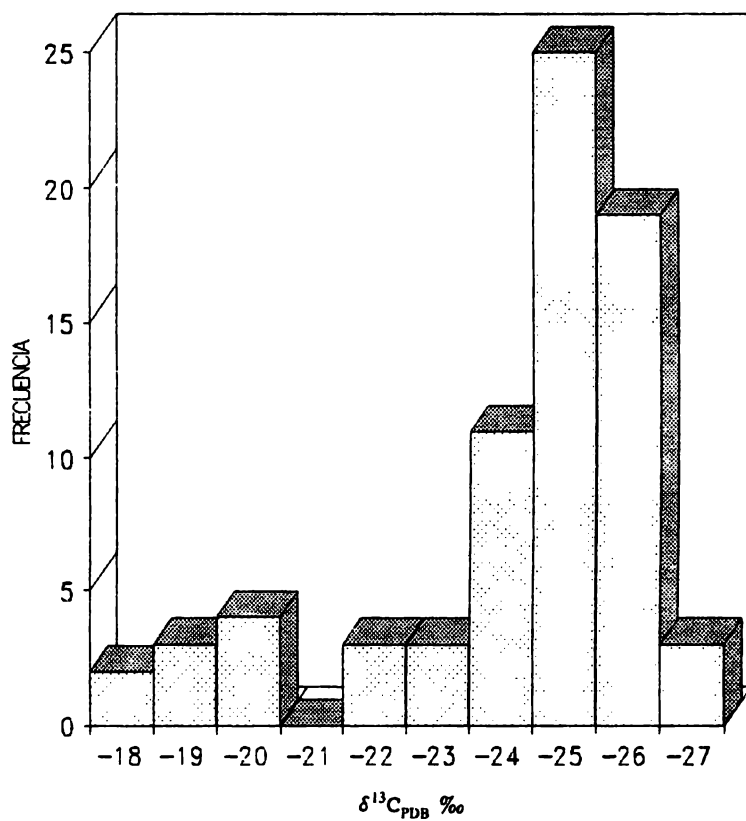
TABLA XII. $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en miel de abeja.

Estado	Planta	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰} \pm \sigma$	No. de muestras
Campeche	Xtabentun, Tajonal, Dzidzilché	-26.03 ± 0.53	11
Campeche	Dzidzilché, Jabín	-24.31 ± 0.08	10
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	-25.72 ± 0.49	23
Yucatán	Mil Flores, Tajonal	-25.73 ± 0.39	13
Campeche	Mil Flores	-25.52 ± 0.24	14
Yucatán	Mil Flores, Dzidzilché, Tajonal	-24.30 ± 0.72	5

Como se puede observar en la tabla XII la variación natural de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja certificada de una región (Campeche : Yucatán) es de 2 ‰ (con un intervalo de -26.03 ‰ a -24.31 ‰) lo cual implica que una muestra de miel de abeja con un valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -26.03 \text{ ‰}$ puede adulterarse con 10% de azúcar de caña ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -11.33 \text{ ‰}$) y su valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ sería -24.31 ‰ correspondiente a una miel certificada con un valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ más positivo.

Considerando que la producción de miel de abeja en otros estados de la República Mexicana es generada por una gran variedad de plantas mielíferas que pueden ser CAM ó C_3 , la variación natural de la flora no es homogénea, la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ puede llegar a ser hasta de -21.9 ‰ (miel de abeja proveniente de mezquite, White 1989), e

GRAFICA VI
MIEL DE ABEJA COMERCIAL
DE LA REPUBLICA MEXICANA



necesario utilizar el método de prueba que compara la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja y la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína en muestras de miel de abeja representativas de la población de la República Mexicana.

Se muestrearon 87 mieles que se expenden comercialmente en la Ciudad de México para consumo doméstico y miel de abeja procedente de apicultores distintos lugares del país, proporcionadas por Miel Carlota S.A. de C.V., la distribución de estas muestras se puede observar en la gráfica VI, cuyo promedio es de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -24.65 \pm 2.04 \%$. La miel de cítricos en nuestro país tiene una $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ dentro del promedio, sin embargo algunas mieles comerciales muestran valores que se encuentran en un intervalo de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} -18$ a -23% , por lo cual se considera necesario medir tanto la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en miel de abeja como la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína de la miel de abeja para poder evaluar el % de adulteración.

3.4 Composición isotópica de la fracción de proteína de la miel de abeja:

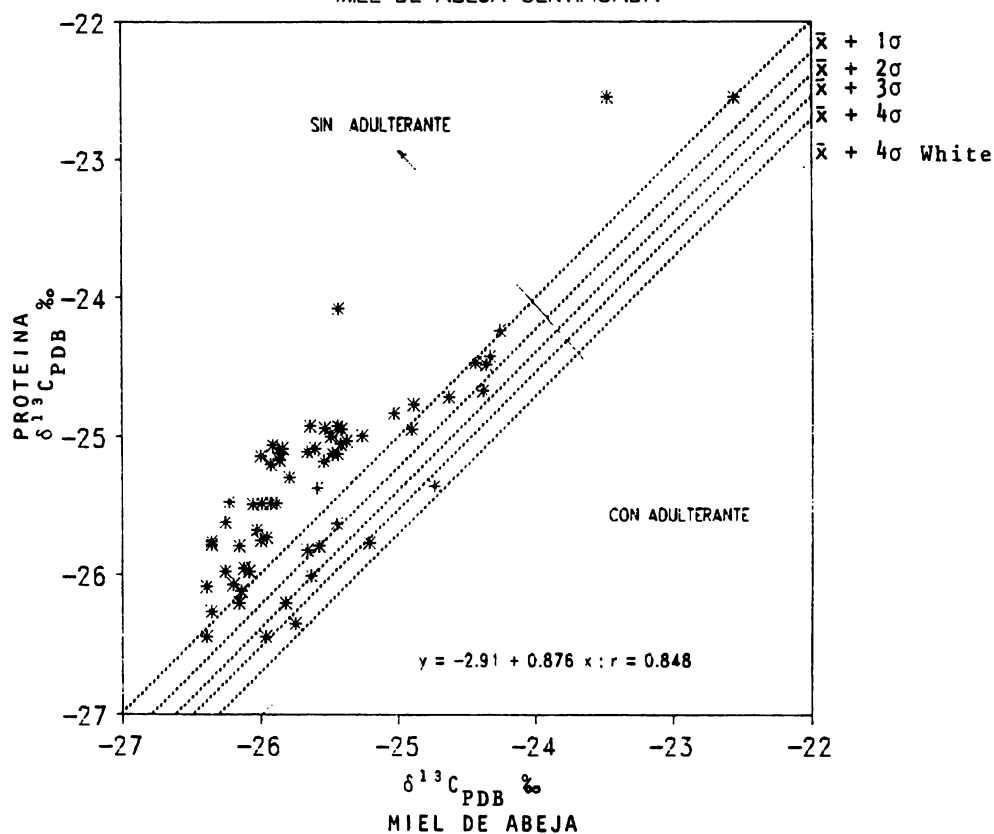
3.4.1 Miel de abeja certificada:

Los resultados de la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína se separó en su mayoría por el método de precipitación directa con ácido túngstico y posteriormente por el método de diálisis-precipitación, es por ello que se denota cual fue el método de purificación en cada caso, tomando como preferencia el resultado obtenido por método de diálisis-precipitación, por las razones expuestas con anterioridad. Cabe hacer notar que no se repitió esto en el caso de todas las mieles por falta de muestra, así mismo en el caso de algunas muestras de miel de abeja proporcionada para determinar la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \%$ en miel de abeja completa, ésta fue insuficiente para purificar su proteína. Los resultados de la miel de abeja certificada para este trabajo son los siguientes, Tabla XIII:

TABLA XIII Miel de abeja certificada.

Estado.	Planta.	T	$\delta^{13}C_{PUB}$ ‰ Miel	$\delta^{13}C_{PUB}$ ‰ Proteína	P - M	%
Campeche	Xtabentun	W	-26.36	-26.27	0.09	
Campeche	Xtabentun, Tajonal	W	-26.14	-26.11	0.03	
Campeche	Tajonal	W	-26.05	-25.49	0.56	
Campeche	Tsalam, Dzidzilché	W	-25.03	-24.83	0.20	
Campeche	Box-Katsim	D	-25.82	-26.20	-0.38	2.30
Campeche	Solen-Ak, Sak-Ak	W	-26.39	-26.09	0.30	
Campeche	Tajonal	D	-26.35	-25.78	0.57	
Campeche	Dzidzilché, Jabin	D	-24.44	-24.46	-0.02	0.14
Campeche	Dzidzilché, Jabin	D	-24.38	-24.67	-0.29	1.94
Campeche	Dzidzilché, Jabin	D	-24.36	-24.48	-0.12	0.81
Campeche	Dzidzilché, Jabin	W	-24.26	-24.23	0.03	
Campeche	Dzidzilché, Jabin	W	-24.33	-24.42	-0.09	0.61
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.26	-24.99	0.27	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.48	-25.12	0.36	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.00	-25.75	0.25	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.08	-25.98	0.10	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.12	-25.95	0.17	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-26.23	-25.47	0.76	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.03	-25.68	0.35	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.26	-25.98	0.28	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.35	-25.76	0.59	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.93	-25.48	0.45	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.86	-25.17	0.69	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-26.26	-25.62	0.64	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.99	-25.48	0.51	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.79	-25.29	0.50	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.93	-25.20	0.73	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-26.15	-26.20	-0.05	0.30
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.44	-24.92	0.52	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.84	-25.09	0.75	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.41	-24.94	0.47	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-24.89	-24.76	0.13	
Yucatán	Mil Flores	D	-24.90	-24.94	-0.04	0.26
Yucatán	Mil Flores	W	-25.66	-25.82	-0.16	0.99
Yucatán	Mil Flores	W	-26.20	-26.07	0.13	
Yucatán	Mil Flores, Tajonal	W	-26.39	-26.45	-0.06	0.36
Yucatán	Mil Flores, Tajonal	W	-25.21	-25.77	-0.56	3.48
Yucatán	Tajonal	D	-25.91	-25.06	0.85	
Yucatán	Tajonal	D	-25.66	-25.10	0.56	
Yucatán	Tajonal	D	-26.00	-25.14	0.86	
Yucatán	Tajonal	W	-25.75	-26.35	-0.60	3.60
Yucatán	Tajonal	D	-25.64	-24.92	0.72	
Yucatán	Tajonal	D	-25.88	-25.48	0.40	
Yucatán	Tajonal	D	-25.96	-26.45	-0.49	2.93
Yucatán	Tajonal	W	-25.38	-25.03	0.35	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.63	-26.01	-0.38	2.33
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.53	-24.93	0.60	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.49	-25.00	0.48	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.87	-25.11	0.76	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.59	-25.37	0.22	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.60	-25.09	0.51	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.54	-25.18	0.36	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.43	-24.08	1.35	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.42	-25.05	0.37	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.45	-25.63	-0.18	1.13
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.57	-25.79	-0.22	1.37
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	D	-25.44	-25.12	0.32	
Campeche	Dzidzilché, Tajonal	W	-25.95	-25.73	0.22	
Yucatán	Mil Flores	D	-24.74	-25.35	-0.61	3.90
Yucatán	Tajonal	D	-24.63	-24.71	-0.08	0.53
Nayarit		D	-26.15	-25.79	0.36	
Ags.		D	-22.56	-22.55	0.01	
Veracruz	Naranjo	W	-23.47	-22.55	0.92	
	Promedio		-25.55	-25.29	0.26	
	Desviación estándar		0.72	0.74	0.40	

GRAFICA VII
MIEL DE ABEJA CERTIFICADA



Pie de la Tabla XIII.

T = Técnica.

W: Método de precipitación directa con ácido túngstico.

D: Método de diálisis-precipitación.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Miel: es la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Proteína: es la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína.

P-M: es la diferencia entre la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína y la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

‰: Porcentaje aparente de adulteración utilizando la fórmula 6.

En la gráfica VII, se muestran los resultados obtenidos de $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja y la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína de las muestras de miel de abeja certificada, la correlación entre ambos resultados es de $r = 0.848$ y se ajusta a la ecuación: $y = -2.91 + 0.876x$, la desviación estándar para miel de abeja = 0.72 y para la proteína = 0.74, son similares, así mismo en la prueba t con $t = 1.99$ (t calculada $t_{0.005} = 2.576$) confirma que la diferencia no es significativa y en el caso del análisis de variancia nos indica que los resultados son consistentes.

TABLA XIV. Análisis de Variancia.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Materiales	1	2.116	2.116	3.88
Error	124	67.619	0.545	
Total	125	69.735		

$F_{0.05} = 3.90$

Hipótesis nula: $\delta^{13}C_{PDB} \text{ (miel completa)} = \delta^{13}C_{PDB} \text{ (proteína)}$

Hipótesis alterna: $\delta^{13}C_{PDB} \text{ (miel completa)} \neq \delta^{13}C_{PDB} \text{ (proteína)}$

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Puesto que el valor obtenido para F no excede 3.90, que corresponde al valor de $F_{0.05}$ con 1 y 124 grados de libertad, la hipótesis nula no puede rechazarse con un nivel de significancia de 0.05; concluimos que el valor de $\delta^{13}C_{PDB}$ para la miel completa y su fracción de proteína tienen resultados consistentes.

Por lo cual podemos concluir que cuando las muestras no se encuentran adulteradas ó fermentadas la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja es igual a la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína. El porcentaje de adulteración obtenido en la tabla XIII para algunas de las muestras puede ser aparente por lo que es necesario buscar un criterio para establecer un límite de detección.

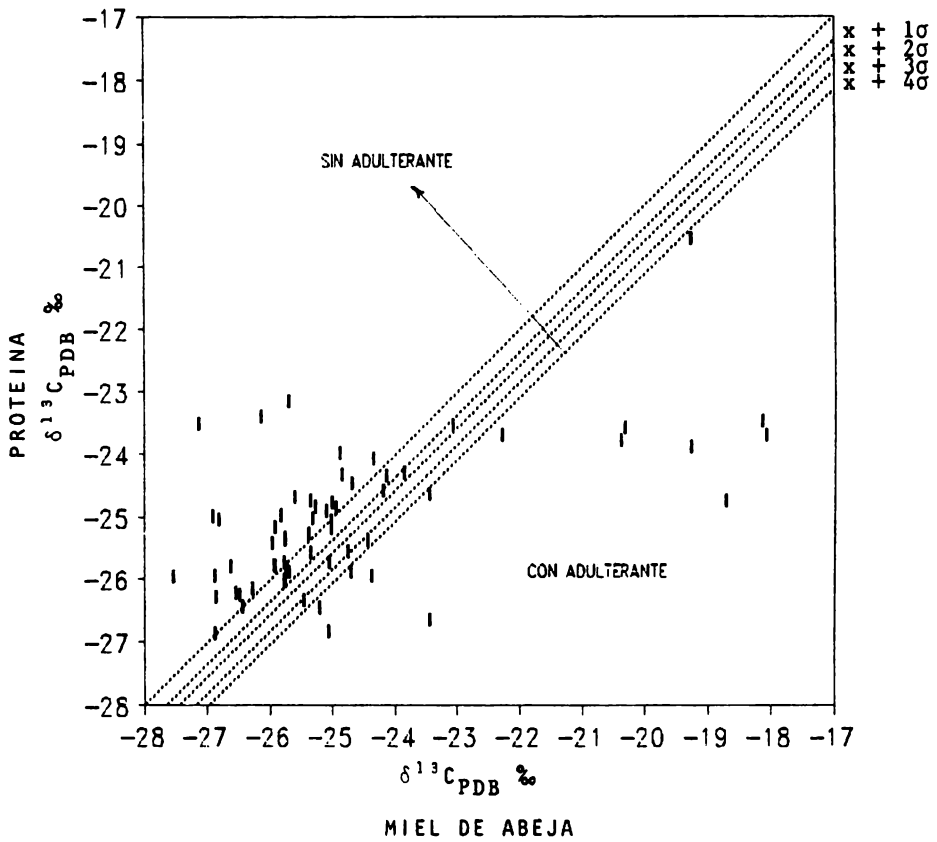
3.4.2 Miel de abeja comercial:

De la misma forma se hizo un muestreo con miel de abeja proveniente directamente de apicultores, marcada con un asterisco (*), proporcionada por Miel Carlota S.A. de C.V. y miel de abeja que se expende comercialmente; cabe hacer notar que la miel proveniente de un apicultor es homogénea en cuanto a las abejas productoras como al territorio del que obtienen el néctar, y la miel netamente comercial, representa a muchos apicultores, de diferentes estados y a un proceso de calentamiento y tamizado. En la Tabla XV se muestran los resultados obtenidos con miel de abeja de tipo comercial sin adulterar y en la Tabla XVI se muestran los resultados de miel de abeja adulterada, todas las muestras se encuentran en la gráfica VIII.

TABLA XV Miel de abeja comercial.

Procedencia	T	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{‰}$ Miel	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{‰}$ Proteína	Dif. P - M	%
*Guerrero	w	-25.00	-24.76	0.24	
*Guerrero	w	-24.88	-23.98	0.90	
*Guerrero	w	-25.10	-24.90	0.20	
*Guerrero	w	-25.36	-25.56	-0.20	1.26
Guerrero	w	-25.75	-25.82	-0.07	0.43
*Sonora	w	-23.06	-23.53	-0.47	3.40
*Sonora	w	-23.86	-24.28	-0.42	2.88
*Sonora	w	-24.35	-24.05	0.30	
*Sonora	w	-25.60	-24.68	0.92	
*Sonora	w	-25.02	-25.17	-0.15	0.97
*Durango	w	-25.27	-24.82	0.45	
*Michoacán	w	-26.14	-23.40	2.74	
Michoacán	w	-24.94	-24.85	0.09	
Michoacán	w	-25.38	-25.26	0.12	
*Edo.de Méx.	w	-26.91	-24.98	1.93	
Edo.de Méx.	w	-25.78	-25.72	0.06	
Edo.de Méx.	w	-25.97	-25.41	0.56	
Edo.de Méx.	w	-25.94	-25.76	0.18	
Edo.de Méx.	w	-26.45	-26.43	0.02	
*Tlaxcala	w	-25.76	-25.32	0.44	
*Tlaxcala	w	-25.78	-26.02	-0.24	1.47
*Veracruz	w	-25.77	-25.35	0.42	
Veracruz	w	-25.47	-26.34	-0.87	5.23
Veracruz	w	-25.77	-26.03	-0.26	1.59
Veracruz	w	-25.91	-25.14	0.77	
Veracruz	w	-26.63	-25.79	0.84	
*Chiapas	w	-25.69	-25.86	-0.17	1.05
Yucatán	w	-26.88	-25.94	0.94	
Ags.	w	-25.36	-24.73	0.63	
Ags.	w	-25.92	-25.78	0.14	
Ags.	w	-24.44	-25.35	-0.91	5.81
*Jalisco	w	-26.55	-26.22	0.33	
*S.L.P.	d	-24.18	-24.56	-0.38	2.56
D.F.	w	-25.05	-25.72	-0.67	4.18
D.F.	w	-25.33	-25.02	0.31	
D.F.	w	-26.88	-26.86	0.02	
*Puebla	w	-26.48	-26.24	0.24	
*Morelos	w	-24.15	-24.33	-0.18	1.23
*Morelos	w	-26.81	-25.04	1.77	
*Morelos	w	-26.86	-26.27	0.59	
*Morelos	w	-25.03	-25.06	-0.03	0.20
Morelos	w	-24.69	-24.45	0.24	
Morelos	w	-24.76	-25.55	-0.79	4.98
Morelos	w	-29.29	-26.15	0.14	
*	w	-25.82	-24.96	0.86	
*Naranja	w	-24.85	-24.31	0.54	
*	w	-25.71	-23.15	2.54	
*	w	-27.54	-25.95	1.59	
*	d	-27.14	-23.50	3.64	
Promedio		-25.09	-24.69		
σ		3.70	3.63		

GRAFICA VIII
MIEL DE ABEJA COMERCIAL



Pie de la Tabla XV.

T = Técnica.

W: Método de precipitación directa con ácido túngstico;

D: Método de diálisis-precipitación.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Miel: es la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Proteína: es la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína.

Dif.P-M: es la diferencia entre la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína y la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

‰: Porcentaje aparente de adulteración utilizando la fórmula 6.

TABLA XVI Miel de abeja comercial adulterada.

Estado	T	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Miel	$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Proteína	P-M	‰
Campeche	w	-23.45	-24.62	-1.17	7.84
Campeche	w	-25.21	-26.44	-1.23	7.35
Campeche	d	-23.46	-26.63	-3.17	18.72
*D.F.	d	-19.26	-20.53	-1.27	11.73
Ags.	w	-22.28	-23.68	-1.40	10.01
Edo.Méx.	w	-24.38	-25.94	-1.56	9.61
*Jalisco	w	-24.71	-25.86	-1.15	7.11
Jalisco	d	-18.71	-24.74	-6.03	40.09
Jalisco	d	-18.09	-23.67	-5.58	39.94
Jalisco	d	-18.14	-23.45	-5.31	38.62
Gto.	d	-20.38	-23.77	-3.39	24.09
Gto.	d	-20.32	-23.57	-3.25	23.43
Gto.	d	-19.25	-23.86	-4.61	32.56
Mezquite	w	-25.07	-26.82	-1.75	10.22

T = Técnica.

W: Método de precipitación directa con ácido túngstico.

D: Método de diálisis-precipitación.

$\delta^{13}C_{PDB}$ ‰ Miel: es la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

$\delta^{13}C$ Prot: es la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína.

P-M: es la diferencia entre la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la proteína y la $\delta^{13}C_{PDB}$ de la miel de abeja.

‰: es el porcentaje de adulteración utilizando la fórmula 6.

El criterio que se utilizó para determinar el límite de adulteración en las tablas anteriores fue propuesto por Jonathan W. White (1989).

White encontró que debido a la variación natural del néctar de las flores y el polen con los cuales se alimentan las abejas, los valores de $\delta^{13}C_{PDB}$ de 50 muestras de miel de abeja certificadas y su proteína se ajustaban por mínimos cuadrados a una recta con la siguiente ecuación: $y = -5.67 + 0.756 x$, con una correlación $r = 0.75$; esto implicaba que la pendiente no era 1, ya que el promedio de la $\delta^{13}C_{PDB}$ la proteína difiere -0.26 ‰ con respecto al promedio

obtenido para la $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja. El mismo autor determinó mediante estadística (4σ) que una diferencia negativa en la $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$ de la proteína menos la $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja en valor absoluto igual ó mayor a 1.01‰ indicaba adulteración (el valor de -1.01 ‰ puede representar aproximadamente un 7% de adulteración con azúcar de caña ó jarabe de maíz (HFCS), utilizando la fórmula no. 6). En caso de que la diferencia anterior sea positiva, el % de adulteración será considerado como cero ya que este hecho puede deberse a que las abejas se alimentan con polen de plantas C_4 ó CAM.

Tomando como criterio la discusión anterior, se realizaron los cálculos para determinar los límites de adulteración en miel de abeja certificada por la Universidad Autónoma de Campeche y miel de abeja comercial certificada por Miel Carlota, S.A. de C.V. (Tabla XVI).

TABLA XVII Probabilidad de error de las poblaciones.

Límite	P. error	White 1989	Certifica- da	Comercial
No.		50	63	49
$\bar{x}$		-0.13‰	-0.07‰	-0.12‰
σ		$\pm 0.22\%$	$\pm 0.15\%$	$\pm 0.24\%$
$\bar{x} + \sigma$	1 en 6	-0.35‰	-0.22‰	-0.36‰
$\bar{x} + 2\sigma$	1 en 44	-0.57‰	-0.38‰	-0.59‰
$\bar{x} + 3\sigma$	1 en 770	-0.79‰	-0.53‰	-0.83‰
$\bar{x} + 4\sigma$	1 en 25000	-1.01‰	-0.69‰	-1.06‰

No. Número de muestras de miel de abeja.

$\bar{x}$; promedio de la diferencia negativa de la $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$ de proteína menos la $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja, considerando la diferencia positiva como cero.

σ ; desviación estandar de la diferencia negativa.

P. error: probabilidad de error.

Como se puede observar la dispersión mostrada por la miel de abeja certificada por la Universidad Autónoma de Campeche, tiene un margen muy pequeño de error, esto principalmente se debe a que la floración de donde provienen estas muestras es muy homogénea. Es por ello que se utilizará como criterio para determinar el límite de adulteración en la miel de abeja comercial no el - 0.69 ‰ sino el -1.01 ‰ propuesto por White (1989) que coincide con el límite calculado para la miel de abeja comercial certificada. Aceptando el valor de -1.01 ‰ como límite de la diferencia negativa para considerar que una muestra se encuentra adulterada podemos observar

en la gráficas VII y VIII el área de muestras con y sin adulterante.

En la tabla XVI, 3 muestras de miel de abeja se encuentran en los límites de adulteración entre 7 y 8%, 4 muestras de miel de abeja contienen una baja adulteración en un intervalo de 9 a 12% y 7 muestras de miel de abeja se encuentran francamente adulteradas en un intervalo de 18 a 40%.

Las muestras de miel de abeja adulterada representan un 18% de las muestras de miel de abeja de tipo comercial analizadas, sin embargo es pertinente aclarar que de las 7 muestras de miel de abeja que se encontraron con un alto porcentaje de adulteración 6 de ellas provienen de una misma envasadora y se expenden en el comercio con diferentes nombres.

Por otro lado es importante considerar las razones por las cuales hay una variación natural en la composición isotópica de la miel de abeja y su fracción de proteína.

a) El radio normal de pecoreo de las abejas es de 3 Km, y la distancia máxima que logran recorrer es de 13 Km, debido a lo cual en un lugar con vegetación completamente heterogénea, la miel que se obtenga será la media de las flores mielíferas de ese lugar.

b) Otra causa es la constante renovación de la colonia, considerando que una reina pone de 1500 a 2000 huevos al día. Después de 3 días de incubación nacen las larvas, durante 2½ días recibe jalea real, posteriormente es alimentada con una mezcla de miel y polen durante 2½ días más, se sellan las celdas después de 8-9 días, en el duodécimo día, después de tejer su capullo, la larva se convierte en pupa y emergen entre los 20-21 días, las obreras jóvenes comienzan a pecorear entre los 10-18 días después de emerger, de acuerdo a los requerimientos de la colonia.

c) En algunos lugares de la República Mexicana cuando la floración es pobre los apicultores alimentan a las abejas con azúcar de caña. También existe el problema cuando es época de la zafra, las abejas toman las exudaciones del corte de la caña de azúcar, produciendo una miel oscura y de baja calidad conocida con el nombre de mielada.

d) La dispersión de los resultados puede deberse a que las abejas obreras toman polen de plantas C₃ y CAM.

En las tablas XIII y XIV las muestras de miel de abeja que tienen una diferencia positiva entre la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína y la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la miel de abeja se considera como 0% de adulteración. Este tipo de muestras indican la diferencia que puede existir cuando el néctar que colectan las abejas proviene de una fuente

como lo son las plantas C₃ y algo de polen que ingieren las abejas proviene de otra fuente diferente probablemente plantas C₄ ó CAM.

La adulteración en México, por parte de los apicultores se realiza principalmente con azúcar de caña, porque el jarabe de maíz tiene un costo más alto y en cuanto al azúcar de remolacha es muy difícil de conseguir en nuestro país. No hay duda en que la adulteración con jarabe de maíz ó azúcar de caña se realiza principalmente en las envasadoras de miel de abeja, para su venta al público.

4.0 Conclusiones.

- El método de combustión de pyrex a 550°C para muestras de miel de abeja y su proteína no es adecuado.
- Se debe realizar la combustión de la miel de abeja y de su proteína en tubo de cuarzo a 900°C durante 2 horas y posteriormente bajar la temperatura lentamente a 650°C y mantener una hora.
- Para extraer y purificar la proteína el mejor método es el de diálisis - precipitación (AOAC 991.41).
- Se debe tener cuidado al analizar miel de abeja completa, ya que si ésta se encuentra fermentada el análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ será más positivo hasta un 3 ‰, por lo cual este tipo de miel de abeja se debe desechar y analizar otra muestra en buen estado.
- Las muestras de miel de abeja completa con una $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ más positivo a -23.5 ‰ tienen mayor probabilidad de encontrarse adulteradas con más del 10%, por lo que para asegurar la calidad de su origen se debe realizar el análisis isotópico de su proteína.
- Para comprobar que existe adulteración en una muestra de miel de abeja, es necesario hacer ambos análisis isotópicos de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$; en miel completa y en proteína.
- Una miel se encuentra adulterada, si la diferencia entre el análisis de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la fracción de proteína y la miel de abeja completa es menor que -1.01 ‰ ($\approx$ 7% de jarabe de maíz, HFCS).
- El análisis isotópico en miel de abeja y su fracción en proteína es aplicable en nuestro equipo y con la miel de abeja nacional para determinar adulteración con azúcar de caña ó jarabe de maíz (HFCS), por lo tanto debe proponerse la adición de este método a la Norma Oficial Mexicana para certificar el origen de la miel de abeja.

5.0 Bibliografía.

- Bender, Margaret.N. Variation in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in Relation to the Pathway of Photosynthetic Carbon Dioxide Fixation. *Phytochemistry*. Vol. 10, pp. 1239-1244. 1971.
- Bergner, K.G;Diemair, S. Proteine des Bienenhonings. II. Gelchromatographie, enzymatische Aktivität und Herkunft von Bienenhonig-Proteinen. *Z. Lebensmittelunters. u. - Forch.* 157: pp. 7-13, 1975.
- Bonner, J. y J.C. Vari. Plant Biochemistry. Academy Press, Varren. Cap. 24. 1976.
- Bricout, J. Possibilities of Stable Isotopes Analysis in the Control of Food Products. *Stable Isotopes*. pp. 483-493. 1982.
- Brookes Steven T, Barrie Andrew y Davies Jonathan E. A Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Test for Determination of Corn Syrups in Honey. *J. Off. Anal. Chem.* Vol. 74, No. 4, pp 627-629, 1991.
- Carro Odette, Hillare-Marcel Claude y Gagnon Marcel. Detection of Adulterated Maple Products by Stable Carbon Isotope Ratio. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 63, No. 4, pp 840-844, 1980.
- Casar, I., Cienfuegos, E y Morales P. Manual de Métodos de Prueba y Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Física de la U.N.A.M., Febrero de 1994.
- Coplen Tyler B., Kendall Carol & Hopple Jessica. Comparison of stable isotope reference samples. *Nature*, Vol. 302, No. 5905, pp. 236-238, 17 Marzo de 1983.
- Craig Harmon. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 3, pp 53-92, 1953.
- Craig, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim Acta* 12, pp. 133-149, 1957.
- De Niro, M.J. y Epstein, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*. Vol. 42, pp. 495-506, 1978.
- Dempster, *Physics Rev.* 11, 316 (1918).
- Doner Landis W. y White Jonathan W. Carbon-13/Carbon-12 Ratio Is Relatively Uniform Among Honeys. *Science*, Vol. 197. pp. 891-892, 26 de agosto de 1977.
- Doner, Landis W., Kushnir Irene y White Jonathan W. Assuring the Quality of Honey. Is It Honey or Syrup?. *Analytical Chemistry*. pp 224A - 232-A, February 1979.
- Espina Pérez Darío y Ordetx S. Gonzalo. Apicultura Tropical. Editorial Tecnológica de Costa Rica, IV Edición, 1984.
- Espina Pérez Darío y Ordetx S. Gonzalo. Flora Apícola Tropical. Editorial Tecnológica de Costa Rica, I Edición, 1983.
- Finnigan Mat. Operating Manual. Mass Spectrometer Finnigan Mat. 250. Bremen Germany, 1982.
- Gala, T.R, Farhas, J.M., Morales, P., Labougle, J.M., Yong, M.T., Soto, A. y Osorno, H. Programa Bioma. Universidad Autónoma de Campeche. 1991. Sin publicar.

- Hachey, D. L., Wong, William W, Boutton, T. W. y Klein P. Isotope Ratio Measurements in Nutrition and Biomedical Research. *Mass Spectrometry Reviews*. Vol. 6, pp. 289-238, 1987.
- Hatch. M.D., Slack. C.R., & Johnson, Hillary S. Further Studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar - cane and its occurrence in other plant species. *Biochem. J.* 102, pp 417 - 422, 1967.
- Hayes, J.M. Fractionation, et al.: An Introduction to Isotopic Measurements and Terminology. *Spectra, A Finnigan Mat Publication*. Vol. 8, Num.. 4, pp. 3-8, December 1982.
- Hillaire Marcel G. Isotopes and Food. *Handbook of Environmental Isotopes, Vol II, Geochemistry, Fritz and Fontes, Elsevier. Chapter 12, pp 507 - 549, 1985.*
- Keeling. Charles, Mook. W. G., Tans. Pieter P. Recent trends in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of atmospheric carbon dioxide. *Nature*, 277, pp. 121- 123, 11 January 1979.
- Kiser Robert W. Introduction to Mass Spectrometry and its Applications. *Prentice-Hall, INC.. Englewood Cliffs, N.J.* 1965.
- Krueger, H. W. y Reesman R.H. Carbon Isotope Analyses in Food Technology. *Mass Spectrometry Reviews*, 1, pp. 205-236, 1982.
- Krueger Dana A. Sample Preparation Bias in Carbon Stable Isotope Ratio Analysis of Fruit Juices And Sweeteners. *Journal Of AOAC International*. Vol. 76, No. 2, pp 418-420, 1993.
- Lehninger. Biochemistry. *Worth Publishers, INC. Cap. 23, 1979.*
- Mc.Crea, J.M. On the Isotopic Chemistry of Carbonates and Paleotemperature Scale. *The Journal of Chemical Physics*. Vol. 18, No. 6, pp. 849-857, June, 1950.
- Miller, Irwin y Freund John E. Probability and Statistics for Engineers. *Prentice Hall Inc.* 1985.
- Mison, D.J., Ludlow, M.N., y Trughton, J.H. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. *Nature* 256, pp. 602, 1975.
- Mook, Willem Gerrit. Geochemistry of the Stable Carbon and Oxygen Isotopes of Natural Waters in the Netherlands. Tesis. *Rijksuniversiteit te Groningen.* 1968.
- Mook, W.G. and Grootes, P.M. The measuring procedure and corrections for high-precision mass-spectrometric analysis of isotopic abundance ratios, especially referring to carbon, oxygen and nitrogen. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 12, pp. 273-298, 1973.
- Mook, W.G. Principles of Isotope Hydrology. Introductory Course on Isotope Hydrology. Centre of Isotope Research University of Groningen, The Netherlands. September, 1989. 104-107, 1984.
- Mook, Willem G y Jongsma, Jaap. Measurement of the N_2O corrections for $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of atmospheric CO_2 by removal of N_2O . *Tellus*, 39B, pp.96-99, 1987.

- Morales, P., Gaona, S. y Alba, F. Espectrómetro de masas con triple colector para el análisis preciso de relaciones isotópicas entre carbonos y oxígenos. *Revista Mexicana de Física*, 19, FA77-FA90, (1970).
- Morrison, Robert y Boyd, Robert. Organic Chemistry. Allyn and Bacon, Inc. 1973.
- Nier, A.O., Abbott, T.A., Pickard, J.K., Leland, W.T., Taylor, T.I., Stevens, C.M., Dukey, D.L. and Goertzel G. Recording Mass Spectrometer for Process Analysis. *Analytical Chemistry* 20: pp 188-192, 1948.
- Nier, A. O., A redetermination of the relative abundances of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon and potassium. *Phys. Rev.* 74:789, 1950.
- NOM-F-36-A-1981. Norma Oficial Mexicana: "Miel de Abeja - Especificaciones". Dirección General de Normas. D.G.A.-C.F.I. No. 231.1-27. C.D.U. 638.16.
- Norma de los Estados Unidos de Norteamérica. 18 Federal Register (CFR) 8005, dic, 9, 1953. Redesignado en 42 FR 32514, junio 27, 1977, y en 46 FR-63203. Dic.31, 1981. Code of Federal Register (CFR), USA, 1984. AOAC Methods (1980), No. 31.107, a) 31.176. pp. 520-529 del No. 31. Sugars and Sugar Product.
- NOM-V25-1985 Bebidas alcohólicas destiladas - Brandy - determinación del origen de los alcoholes en los aguardientes de uva y brandies - Espectrometría de masas - Método de prueba, y la NOM-032-SCFI-1993, información comercial - Brandy - Bebida alcohólica.
- Reed William P, Chief. Standards Reference Materials Program. National Institute of Standards & Technology. Report of Investigation. Gaithersburg, MD 20899. June 22, 1992.
- Rinderer, T.E., Stelzer, J.A., Oldroyd, B.P., Bucco, S.M., Rubink, W.L. Hybridization Between European and Africanized Honey Bees in the Neotropical Yucatan Peninsula. *Science*, Vol. 253, pp. 309 - 311. 19 July 1991.
- Saliege, J.F. y Fontes, J.Ch. Essai de Détermination Experimentale du Fractionnement des Isotopes ^{13}C et ^{14}C du Carbone au cours de Processus Naturels. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* Vol. 35, No.1. pp. 55-62, 1984.
- Smith, B.N. y Epstein, S. Two Categories of $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ Ratios for Higher Plants. *Plant Physiol.*, vol. 47, pp. 380-384, 1971.
- Sofer, Zyl. Preparation of Carbon Dioxide for Stable Carbon Isotope Analysis of Petroleum Fractions. *Anal. Chem.* Vol.52, pp. 1389-1391, 1980.
- Somerville, Christopher R., Somerville, Shauna C. Las fotosíntesis de las plantas. *Mundo Científico*, No. 37, Vol. 4, pp. 612 - 623, 1984.
- Taylor John K. Standards Reference Materials, Handbook for SMF Users. NIST Special Publication 260-100. February 1993.
- Troughton, J.H. Carbon isotope fractionation in plants. *Proc. 8th Conf., Radio carbon Dating, Wellington* 2. pp 39-57, 1972.

- Turner, F.T. y Feinleib, M. Performance Criteria for Sorption Pumps. Varian Associates, Palo Alto California. Presented at Eighth Annual Symposium of the American Vacuum Society, Washington, D.C., October 16-19, 1961.
- Urey, H.C., Lowenstam, H.A., Epstein, S and McKinney, C.R. Measurements of paleotemperatures of the Upper Cretaceous of England, Denmark and the south-eastern United States. *Bull. Geo. Soc. A.* 62, pp. 399-416, 1951.
- Yachen, Cao., Keyu, Zhou., y Guoging Sun. Mass Spectrometric Analysis. Method for carbon isotopes in honey and its protein. Nanjing Inst. of Soil, Chinese Academy of Sciences, *Food Science*, Vol.3, 159, pp.70-73 y 20, 1993.
- Yoshida, Naohiro., Yoneguchi, Takahiro y Kitano, Manabu. Determination of Stable Isotope Ratios of Atmospheric Water Vapor and Carbon Dioxide. *Mass Spectroscopy*, Vol. 39, No. 5, October 1991.
- Whelan, T. y Benedic C.R. Carbon Isotope Discrimination in a Plant Possessing The C Dicarboxylic Acid Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol.41, No.5, pp. 1205 - 1210. 1970.
- White, Jonathan W. The protein content of honey. *Journal of Apicultural Research* 17 (4): pp. 234-238, 1978.
- White, J.W. Honey. *Advances in Food Research*. Vol. 24, pp. 287-375, 1978.
- White, Jonathan W., Doner, Landis W. Mass Spectrometric Detection of High-Fructose Corn Sirup in Honey by use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratio: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 61, No. 3, pp 746 - 750, 1978.
- White, J.W., Doner, L.W., y Phillips, J.G. Gas-Liquid Chromatographic Test for Honey Adulteration by High Fructose Corn Sirup. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 62, No.1, pp. 186-189, 1979.
- White, Johnathan W y Siciliano James. Hidroxymethylfurfural and Honey Adulteration. *J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.* Vol. 63, No. 1, pp. 7 - 18, 1980.
- White, Jonathan W. High-Fructose Corn Syrup Adulteration of Honey: Confirmatory Testing Required with Certain Isotope Ratio Values. *J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.* Vol 63. No. 5, pp 1165, 1980.
- White, Jonathan W. y Robinson Frank A. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios of Citrus Honeys and Nectars and their Regulatory Implications. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol 66, No. 1, pp. 1-3, 1983.
- White, J.W. Instrumental Color Classification of Honey: Collaborative Study. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* Vol. 67, No. 6, 1984.
- White, J.W., Meloy Robert W., Probst Jerry L y Huser William F. Detection of Beet Sugar Adulteration of Honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 69, No. 4, pp. 652-654, 1986.
- White, Jonathan W. Wiley Led the Way: A Century of Federal Honey Research. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 70, No. 2, pp. 181-188, 1987.

- White, J.W. y Winters, K. Honey Protein as Internal Standar for Stable Carbon Isotope Ratio Detection of Adulteration Honey. J. Assoc. Off. Anal. Vol. 72, No. 6, pp. 907-911, 1989.
- White, Jonathan W. Internal Standard Stable Carbon Isotope Ratio Method for Determination of C-4 Plant Sugars in Honey: Collaborative Study, and Evaluation of Improved Protein Preparation Procedure. *Journal of AOAC International* Vol. 75, No. 3, pp. 543 - 548, 1992.
- Ziegler Hubert, Stichler Willibald, Maurizio Anna y Vorwohl Günther. Die Verwendung Stabiler Isotope Zur Charakterisierung Von Honigen, Ihrer Herkunft und ihrer Verfälschung. *Apidologie*, 8 (4), pp 337-347, 1977.
- Ziegler Hubert, Maurizio Anna y Stichler Willibald. Die Charakterisierung Von Honingen Nach Ihrem Gehalt An Pollen Und An Stabilen Isotopen. *Apidologie*, 10 (4), pp. 301-311, 1979.

APENDICE I

I.1 ESPECTROMETRO DE MASAS PARA ANALISIS DE ISOTOPOS ESTABLES.

El espectrómetro de masas es un aparato diseñado para separar moléculas de acuerdo a su relación carga-masa mediante campos eléctricos y/o magnéticos.

Un espectrómetro de masas para análisis isotópico consiste de tres partes principales:

- a) Fuente de Iones.** En ella las moléculas y átomos neutros son convertidos en iones positivos mediante ionización por impacto de electrones.
- b) Analizador Magnético.** La separación de los iones de acuerdo a sus masas se realiza mediante un campo magnético.
- c) Colectores.** Los haces de iones una vez separados con respecto a su masa son medidos con un instrumento capaz de detectar a bajas corrientes como lo es un amplificador eléctrico (Espectrómetro de masas). (P. Morales, 1970).

I.2 Descripción del Espectrómetro de Masas para Análisis de Isótopos Estables.

Todos los análisis isotópicos realizados en este trabajo se efectuaron en un espectrómetro de masas comercial, diseñado por Finnigan Mat, modelo 250, (Finnigan, Operating Manual, 1982), el cual está diseñado para medir las abundancias isotópicas de carbono, oxígeno e hidrógeno.

I.1.1 Sistema de Vacío.

Para poder realizar con precisión, exactitud y reproducibilidad las medidas de cualquier especie isotópica, es necesario tener la seguridad de que estas corresponden al gas que se quiere analizar, por lo que es esencial:

- Reducir al máximo la presión dentro de la cámara de ionización para evitar perturbaciones causadas por colisiones de los iones con moléculas de gas residual contenidas en el tubo analizador a través de su trayectoria en el tubo de vuelo.
- Evitar colisiones del haz con moléculas de gas cuando los iones cruzan desde la cámara de ionización a la región de los colectores.
- Evitar variaciones de presión en la región de ionización mediante un bombeo uniforme.

Por otra parte para garantizar que el análisis sea representativo de la muestra, es necesario tener un sistema hermético para evitar las contribuciones generadas por la atmósfera exterior ó por gas residual que puede penetrar a la cámara de ionización y por tanto los iones formados son medidos junto con la muestra. Para evitar los problemas generados por el gas residual, el sistema de vacío debe tener una presión dentro de la cámara de ionización y el tubo de vuelo respectivamente del orden de 10^{-8} mbar.

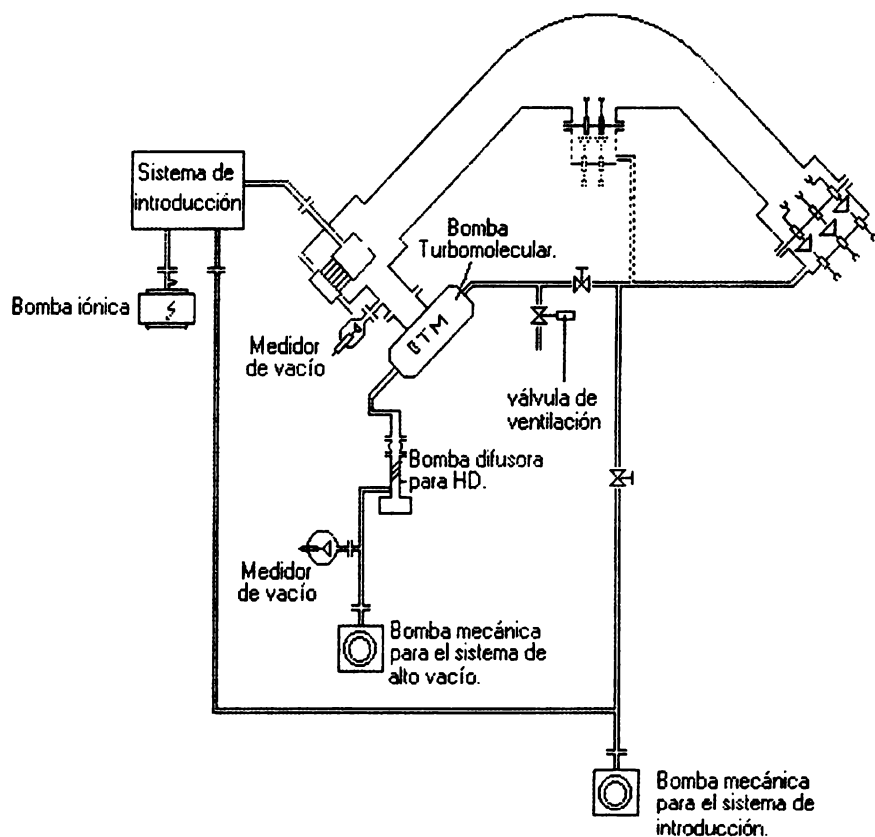
En la Fig. 7, se muestra un esquema de la configuración del sistema de vacío del espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, el cual para alcanzar esta presión cuenta con dos bombas mecánicas que operan de presión atmosférica a 10^{-3} mbar, con una velocidad de bombeo de $4\text{ m}^3/\text{h}$, una bomba iónica con placas de titanio (como una bomba de desecho para la muestra) que opera de 10^{-3} a 10^{-9} mbar, para evacuar el tubo de vuelo se utiliza una bomba turbomolecular con una velocidad de bombeo de 170 l/s que opera en un intervalo de 10^{-6} a 8×10^{-9} mbar acoplada a una bomba mecánica a través de una bomba difusora que se opera cuando se realizan análisis isotópico de hidrógeno.

Para lograr un alto vacío se requiere seleccionar el material de construcción del espectrómetro de masas, el cual deberá tener las siguientes características:

- Deben ser estructuralmente cerrados para no permitir el paso de gas entre el exterior e interior.
- A una temperatura de 100°C deberá tener una presión de vapor muy baja.
- Debe ser resistente a temperaturas de 200°C , para poder desgasificar las superficies expuestas al vacío.
- No debe liberar cantidades excesivas de gases ocluidos disueltos.

Una vez satisfechas las condiciones de operación del espectrómetro de masas, las cuales deben ser: para el sistema de introducción de muestras de 10^{-2} mbar y la presión en el tubo de vuelo de ser del orden de 10^{-8} mbar sin muestra y de 2×10^{-7} mbar con muestra.

En el caso del Espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, Fi 1, los materiales empleados son de acero inoxidable para la cámara de ionización, tubo de vuelo colectores y bridas. Todas las uniones del espectrómetro de masas, incluyendo el sello de las válvulas neumáticas son de oro de 24 K, esto es para tener un ensamble perfecto en todas las uniones, evitando fugas. Y cerámica para los atravesadores.



Sistema de Vacío del Espectrómetro
Finnigan Mat 250

Figura 7

La presión en el sistema de introducción automático de muestras se evalúa con un medidor de vacío tipo pirani, y para medir el alto vacío se cuenta con un ion gauge.

1.1.2 Sistema de Introducción de Gases.

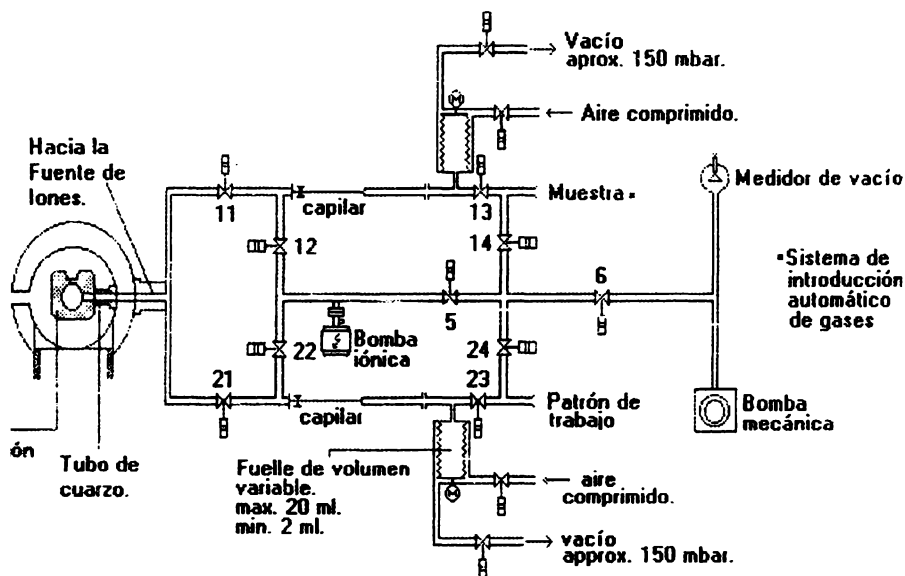
La sustancia a analizar es CO_2 en estado gaseoso, se maneja a través del sistema dual de introducción de gases y el análisis de masas se maneja dentro del espectrómetro en sí.

Con el sistema de doble introducción de gases, que facilita la comparación entre la muestra y el estándar, Fig. 8. Tiene dos fuelles de volumen variable en los cuales la presión es ajustada independiente y automáticamente hasta alcanzar igual flujo entre el patrón de trabajo y la muestra para que cada uno produzca la misma intensidad en la corriente de iones en el colector de la masa más abundante (masa <44> para CO_2 , $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$); los dos sistemas de introducción son conectados independientemente a la fuente de iones por medio de un capilar de 0.1 mm de diámetro interno y aproximadamente 50 cm de largo para el Finnigan Mat 250, al final de cada capilar se tiene una constricción que va a la fuente de iones provocando un flujo en el gas, de viscoso a molecular después de la constricción, (Nier, A.O., 1950), la combinación de ambos flujos asegura un fraccionamiento isotópico constante en el capilar. Una vez que se logra igualar la corriente de iones para ambos gases, el gas problema y el gas patrón el espectrómetro inicia su operación para obtener la δ de reporte de análisis. La definición de δ implica la determinación de las relaciones isotópicas del estándar y de la muestra, por lo cual es conveniente analizar el CO_2 de la muestra en las mismas condiciones que el CO_2 patrón para tener la precisión que se requiere, es por ello que se cuenta con válvula de operación neumática que se encuentran en el sistema de introducción automático de gases, operan rápidamente y su sello hace despreciable la contaminación de gases.

Para poder llevar a cabo un análisis satisfactorio de gases se deben considerar los siguientes requerimientos:

- La intensidad de la corriente del haz de iones debe ser directamente proporcional a la presión del gas de la muestra
- El flujo de gas, y por tanto la intensidad del haz de iones debe permanecer constante durante todo el análisis.

Todos estos requerimientos los puede llenar el flujo molecular, si escogemos adecuadamente las presiones.



SISTEMA DE INTRODUCCION (FINNIGAN MAT 250)

Figura 8

I.1.3 Fuente de Iones.

La fuente de iones consiste principalmente de: la cámara de ionización y el sistema de lentes para enfocamiento del haz.

El gas que se desea determinar entra a la cámara de ionización vía un tubo de cuarzo, en ella el gas es parcialmente transformado en iones positivos por bombardeo de electrones producidos por un filamento de tungsteno caliente (cátodo). Figura 9. La reacción de ionización es la siguiente:



La colimación del haz de electrones es importante para tener un alto rendimiento en la producción de iones, esto se logra con dos barras magnéticas que se encuentran montadas en la cámara de ionización, que producen un campo magnético paralelo al haz de electrones, con lo cual se enfoca a los electrones para que siga una trayectoria de forma helicoidal, aumentando de esta forma la probabilidad de ionización del gas.

La energía cinética de los electrones, está determinada por la diferencia de potencial entre el cátodo y la cámara de ionización y es aproximadamente de 100 eV, la emisión de electrones de filamento se mantiene constante gracias a un regulador de emisión (BLE) y la corriente es del orden de 2 mA.

Para tener una mejor precisión en las medidas de las relaciones isotópicas deben considerarse los siguientes puntos:

- El haz de iones producido deberá tener una intensidad suficiente para ser medido con precisión, (del orden de $\pm 3 \cdot 10^{-9}$ Amperes).
- El haz de iones debe ser estable, con un ruido menor a 0.1%.
- La dispersión de energía de los iones del haz formado debe mantenerse lo más baja posible, del orden de 1 eV.
- Los efectos de ionización de gas residual deben de ser mínimos así como la contribución de los gases atmosféricos.
- No debe haber efectos de memoria entre muestras sucesivas ni contaminación permanente en el sistema de introducción de gases.
- El gas que se introduce al sistema debe ser puro, evitando mezclas ó contaminaciones que puedan dañar al filamento.

- El número de iones producidos depende de la energía cinética y de la corriente de los electrones emitidos por el filamento, por lo cual es necesario llevar un control de la eficiencia de ionización de un gas determinado.

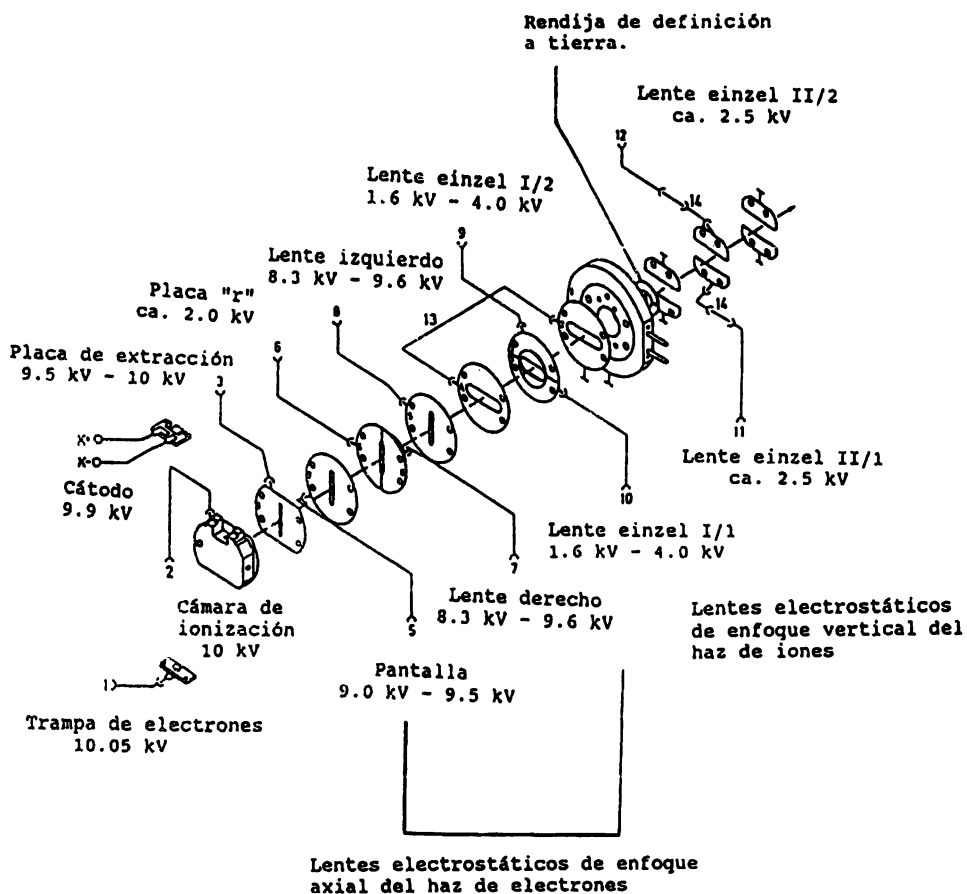
El haz de electrones deja la cámara de ionización vía una rendija opuesta al cátodo en una trampa de electrones, la cual se encuentra en un potencial ligeramente positivo con respecto a la cámara de ionización.

Los iones positivos formados en la cámara de ionización son acelerados y colimados fuera de la cámara de ionización mediante unas placas de extracción de iones que operan con un potencial constante, con valores que oscilan entre los 3,000 a 10,000 volts, dependiendo del haz de iones que se quiera analizar, la energía cinética adquirida por los iones se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$eV = \frac{mv^2}{2} = 10^7 qV \text{ (en erg)} \quad (8)$$

Donde e es la carga eléctrica del ion, generalmente es 1, V es el potencial de aceleración en volts, m es la masa en gramos de los iones, v su velocidad en cm/seg, q que es la carga eléctrica en coulombs y V es el potencial de aceleración en volts.

El haz de iones es enfocado por un sistema de lentes electrostáticas de enfoque axial, cuyo voltaje es variable entre 1.6 y 9.6 KV y en general es menor al voltaje de la cámara de ionización. Una vez enfocado el haz pasa por una rendija de definición a tierra por medio de la cual es colimado pasando posteriormente a otro sistema de lentes electrostáticos para provocar el enfoque vertical del haz de iones. Todos los voltajes del sistema electrostático de lentes se controlan en la unidad denominada BLU del espectrómetro de masas Finnigan Mat 250.



Fuente de Iones
Figura 9

I.1.4 Analizador magnético (Finnigan Mat 250).

Está constituido por un sector de campo magnético con una configuración de 90° y un radio central de 23 cm, Fig. 10, generado por un imán permanente de 0.325 Tesla (3250 Gauss). Cuando el haz de iones deja la fuente de iones tiene 0.5 mm de ancho y 4mm de alto, los iones son acelerados a una energía aproximada de 10 KeV, y son proyectados con un ángulo de 26.5° en el sector magnético de 90° , del cual emergen con este mismo ángulo. Este arreglo de campo magnético se conoce como de doble dispersión porque produce una separación entre dos masas consecutivas equivalente al doble de un sistema convencional de entrada normal por lo cual sería equivalente a tener un espectrómetro con un radio de curvatura de 46 cm.

Los iones formados en la cámara de ionización viajan a través de una región equipotencial desde la fuente de iones hasta llegar al campo magnético, cuyas fronteras forman 26.5° con la trayectoria del haz. En el interior del sector magnético se genera una fuerza sobre los iones que se conoce con el nombre de fuerza de Lorentz. Es determinada por:

$$F = 10 qvB \quad (9)$$

Utilizando el sistema de unidades cgs, si F está en dynas, donde q y v es la carga y la velocidad del ion respectivamente y B la intensidad del campo magnético.

Por ser un sistema en equilibrio dinámico, la magnitud de la fuerza de Lorentz se encuentra equilibrada con la fuerza centrífuga de los iones que siguen una trayectoria circular de radio r, dada en cm y que dependerá directamente de la masa m de las partículas.

$$\frac{mv^2}{r} = 10qVB \quad (10)$$

$$mv = 10 qBr \quad (11)$$

Combinando las ecuaciones 8 y 11 tenemos:

$$m = \frac{100 B^2 r^2 q}{2V \cdot 10^7} \quad (12)$$

Esta ecuación es la que describe el movimiento de los iones dentro del campo magnético, si utilizamos las unidades convencionales queda de la siguiente forma:

$$m = \frac{B^2 r^2}{20,721.59 V} \quad (13)$$

ó

$$r = \frac{143.95 \sqrt{mV}}{B} \quad (14)$$

donde: m es la masa del ión, en unidades de masa atómica; B, es la intensidad del campo magnético, en gauss; r, es el radio de curvatura de la trayectoria en centímetros y V, es la energía del electrón en electrón-volts.

La relación matemática entre el voltaje y la masa, sirve para calcular la relación entre las masas, de esta forma podemos saber a diferentes voltajes que masas aparecen en el colector, esto es muy útil cuando se hace un barrido de fondo para determinar si tenemos contaminación por algún gas residual. Siendo el radio de curvatura y la intensidad del campo magnético constantes, utilizamos la siguiente ecuación para predecir las masas.

$$\frac{m_1 V_1}{V_2} = m_2 \quad (15)$$

En la siguiente tabla podemos observar un ejemplo de un barrido experimental que se realizó con el triple colector en la posición III, con 300 mv de sensibilidad y 10 mbar de presión en el tubo de vuelo (Tabla XVIII).

TABLA XVIII.

Voltaje	Masa	Posibilidad de tener:
10300	28	$^{14}\text{N}_2^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}_2\text{H}_4^+$
9899	29	$^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$, $^{12}\text{CH}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}_2\text{H}_5^+$
9560	30	$^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}_2\text{H}_2^+$, $^{12}\text{C}_2\text{H}_6^+$, $^{12}\text{CH}_2^{16}\text{O}^+$
8971	32	$^{16}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}^+$, $^{14}\text{N}_2\text{H}_4^+$
6526	44	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$
6367	45	$^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^+$
6117	46	$^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}^+$, $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^+$

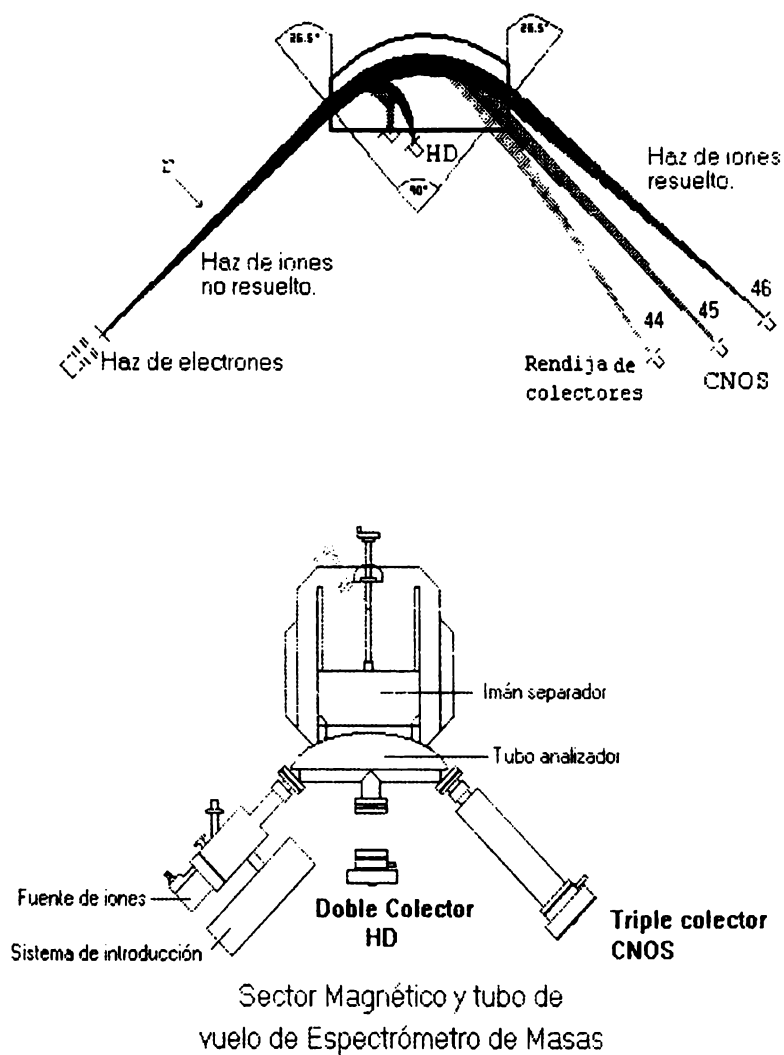


Figura 10

I.1.5 Detector de Iones.

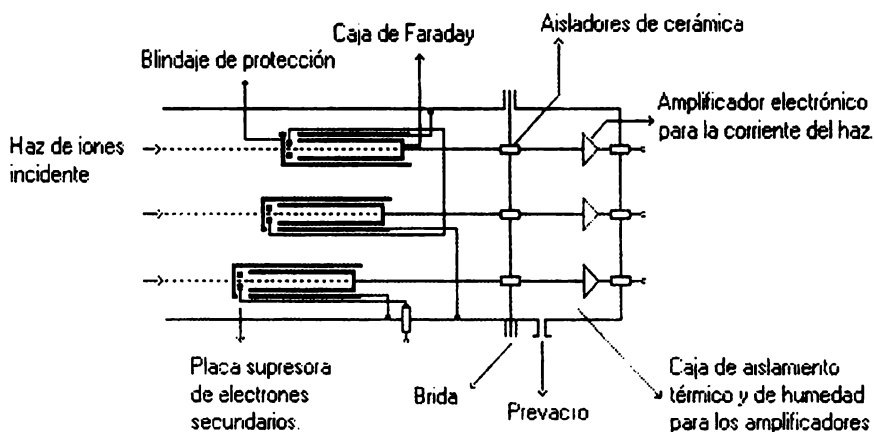
La detección cualitativa y cuantitativa del haz de iones es muy importante, ya que el número de iones de cada masa del haz dará una señal proporcional a la abundancia isotópica de la especie que se desea determinar, la cual es detectada mediante señales eléctricas captadas por aparatos de alta sensibilidad. Para la detección simultánea de iones se utiliza un triple colector para medir las masas 44, 45 y 46 correspondientes a las diferentes especies isotópicas del CO_2 , cada uno de estos colectores neutralizan y miden el haz incidente utilizando cajas de Faraday colocadas en regiones previamente calculadas.

La interacción de haz de iones incidente con las cajas de Faraday es bastante compleja y puede provocar la salida de electrones secundarios provenientes de la superficie metálica, debida al impacto de los iones que poseen una alta energía y los átomos que constituyen las placas de la caja de Faraday. Para evitar una alteración en la corriente del haz de iones por cada especie isotópica, se coloca un electrodo con un voltaje negativo, del orden de 90 volts, llamado supresor de electrones. Una de las formas de corregir estos efectos es con el uso de un buen diseño de las cajas de Faraday, como se observa en la Figura 11.

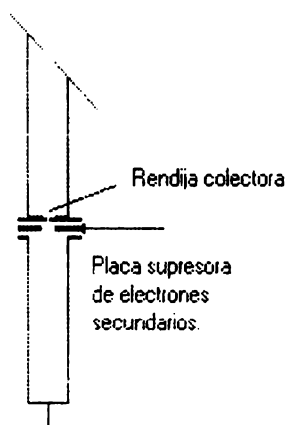
Debido a la gran separación entre los colectores del sistema analizador (aproximadamente 10 mm entre las masas 44 y 45), permite la construcción de cajas de Faraday profundas y protegidas con un integrador secundario de supresión de electrones, con el objeto de eliminar interferencias y los efectos antes mencionados así como la pérdida de señal.

La señal producida por la corriente de iones en las cajas de Faraday alimenta a los amplificadores. La salida de cada amplificador alimenta a los convertidores de voltaje a frecuencia, que convierten la corriente de iones de cada colector en una sucesión de pulsos.

Estos pulsos alimentan a un contador durante un tiempo de integración preseleccionado. Después de cada intervalo de integración la calculadora HP 9815A almacena los datos y después de un determinado número de lecturas en operaciones múltiples; tanto para la muestra como para el patrón de trabajo, la calculadora efectúa una serie de operaciones y nos proporciona el resultado del análisis efectuado.



Esquema del arreglo del triple colector de iones.



Forma del Colector

Figura 11

I.2 Correcciones de los Análisis Obtenidos.

En todos los espectrómetros de masas existen dos tipos de fuentes de error; azarosos, que en la mayoría de los casos, son despreciables y los sistemáticos.

Las fuentes de error sistemáticas se deben identificar, eliminar, reducir ó controlar.

Durante los análisis isotópicos de ^{13}C , ^{18}O ó deuterio, ocurren varios efectos que pueden alterar los resultados de las relaciones isotópicas, por lo que es necesario aplicar correcciones para compensar dichos efectos y con ellos se pueden obtener buenos resultados ya que deben ser precisos y exactos.

Posteriormente a los valores de las corrientes detectadas en los colectores del espectrómetro se les deben aplicar varias correcciones pequeñas para compensar por diferentes especies de CO_2 y así poder transformar las diferencias relativas de los haces generados por los iones en valores δ para reportarse en las unidades internacionales usuales. Entre las principales correcciones tenemos:

- a) Corrección por efectos de presión.
- b) Corrección por impurezas en las muestras, gas residual y efecto de memoria.
- c) Corrección por el uso de un patrón de trabajo en lugar de un patrón internacional.
- d) Corrección por abundancia isotópica.

I.2.1 Corrección por efectos de presión:

Para obtener el valor correcto de la δ entre la muestra y el patrón ambos gases deben tener la misma presión. Este efecto se controla en el espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, utilizando los fuelles de volumen variable, los cuales ajustan automáticamente la presión del gas de la muestra hasta ser igual con la presión del gas patrón. Sin embargo cabe hacer notar que si se introduce una muestra muy pequeña, el espectrómetro no podrá ajustar la presión y el fuelle es comprimido más allá de su límite mecánico y corre el riesgo de perforarse. Por lo que es importante controlar la presión del gas muestra en los procesos de preparación y purificación antes de introducir el gas al espectrómetro, para evitar errores posibles por efecto de presión, los cuales provocan falta de precisión y exactitud en la medida.

En el caso del Finnigan Mat 250 al no poder igualar la presión entre el gas muestra y el gas patrón el espectrómetro aborta el análisis. En caso de reportar un número, este no es adecuado porque el software de la máquina no tiene como calcular este efecto descrito por Mook y Grotes (1973), por lo que es muy crítico controlar las cantidades de gas muestra que se introducen en el espectrómetro.

I.2.2 Corrección por impurezas en el gas muestra, gas residual y por efecto de memoria

Impurezas en las muestras.

Las impurezas en una muestra de gas que puedan tener un componente con una masa similar al CO_2 contribuyen a la corriente de iones causando errores en la δ , entre los principales están:

a) Trazas de solventes orgánicos utilizados para limpiar las válvulas, los cuales pueden ser fácilmente determinados y evitados calentando los frascos contenedores antes de usarlos. Como un ejemplo; son los fragmentos de ionización que interfieren en el espectro de masas, como pueden ser: para el ether las masas relevantes son de la masa <24> a la <30> y de la <40> a la <44>, para el tetracloruro de carbono la masa <47> (iones CCl^+), para la acetona la masa <43> (CH_3CO^+), para el alcohol la masa <45> ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$).

b) Las muestras por sí mismas pueden contener hidrocarburos ó compuestos inorgánicos (SO_2 masa <64>, H_2S masa <34>, NO_2 masa <46>, NO masa <30>, CH_4 masa <16>, etc), las cuales no pueden ser removidas durante la preparación de la muestra sin utilizar procedimientos especiales.

c) Durante ó después de la preparación de la muestra de gas a determinar hay una pequeña cantidad de aire, (N_2 , O_2 , ^{40}Ar). Esto se puede reducir a un mínimo si se cuenta con un buen sistema de vacío en las líneas de preparación y purificación de las muestras, con juntas apropiadas y utilizando válvulas adecuadas en los frascos contenedores.

d) Si la impureza tiene una masa igual a las masas que se desean determinar como lo es el caso del óxido nitroso (m/z <44> ($^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}^+$), <45> ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$ y $^{14}\text{N}_2^{17}\text{O}^+$) y <46> ($^{14}\text{N}_2^{18}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}^{17}\text{O}^+$ y $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$)), provocan que la magnitud de la contaminación no podrá ser medida directamente. El cociente de los isótopos de ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) es 3.663×10^{-3} el cual es significativamente menor al cociente de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.122 \times 10^{-2}$), esto causa un aparente empobrecimiento de los cocientes de los isótopos de carbono y oxígeno en el bióxido de carbono que se encuentra contaminado con óxido nitroso. En particular la contaminación de la masa <45> tiene una influencia considerable en la δ^{13} , <46> en la δ^{18} , desde el haz de iones de esas masas con una intensidad baja. El óxido nitroso se

puede eliminar de la muestra con cobre metálico a 650°C. (Mook y Jongsma, 1983).

Gas residual.

El error por gases residuales, vapores desasorbidos por las paredes de los tubos y analizador ó por pequeñas fugas eventuales, debe eliminarse.

Para cuantificar este efecto es necesario realizar un barrido de masas cuando el espectrómetro está evacuado a 1×10^{-8} para determinar la presencia de masas oscuras derivadas de estos compuestos, ya que esas contribuciones aumentan el espectro de fondo de manera incontrolada.

Esto hace que en el espectro de fondo generalmente contiene picos de masas distintas a las que contiene el patrón de trabajo, si la contribución de este espectro de fondo es constante en la corriente del colector no afecta el valor de δ .

La corrección por gas residual en el espectrómetro de masas Finnigan Mat 250 se hace automáticamente antes de iniciar su operación.

Efecto de memoria.

Cuando el espectro de fondo depende de la muestras previa, esta pequeña corriente de iones se sumará a la corriente de la muestra que se desea determinar alterando los valores delta. Este efecto aunque pequeño en el CO_2 es particularmente importante para el caso de las determinaciones de delta de SO_4 . Para evitar este efecto de memoria es necesario desgasificar los capilares del sistema de introducción.

Por último mencionaré la posibilidad de error causada por fallas en las válvulas del sistema que introduce el patrón y la muestra causado por falta de hermeticidad al cerrar ó por no tener la velocidad de respuesta adecuada. Cuando ocurre este efecto no existe corrección sencilla por lo que es necesario mantener en óptimo estado las válvulas de sello de oro que operan a este sistema.

I.2.3 Corrección por el uso de un patrón interno de trabajo en lugar de un patrón internacional.

Otro aspecto importante es el hecho de que el patrón internacional PDB al que se refiere el análisis isotópico de carbono y oxígeno ya se agotó, por lo cual la comunidad de isótopos estables utiliza otros patrones internacionales los cuales tienen valores certificados referidos al PDB y distribuidos por el NIST (National Institute of Standards and Technology).

Sin embargo estos patrones no están diseñados para utilizarse como patrones de trabajo por lo que es necesario obtener una cantidad homogénea de CO_2 con composición isotópica determinada contra varios patrones internacionales, para ser utilizado como patrón de trabajo, para analizar muestras problema.

Este patrón de trabajo se caracteriza por medio de patrones internacionales y se le hacen las correcciones necesarias para que la computadora del Espectrómetro de Masas HP 9815A tenga los valores correctos del CO_2 patrón que se va a utilizar referido a PDB y a su vez con este patrón de trabajo podremos medir la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ y $\delta^{18}\text{O}_{\text{PDB}}$ del CO_2 de una muestra referidos a PDB.

Por otra parte el gas patrón que se utiliza debe tener una composición similar a las muestras que se desean medir, debido a que los errores de medición se reducen de esta forma.

Para saber el valor correcto del CO_2 patrón que se va a utilizar, en el programa de la calculadora HP9815A del espectrómetro de masas en el programa 9, inciso 1, fila 13 se graban los valores certificados de un patrón internacional, como lo es el NBS-19, se preparan tres patrones y se utiliza uno de ellos como patrón de trabajo, al mismo tiempo se preparan como mínimo 5 frascos contenedores con el CO_2 patrón que se utilizará, para saber su valor exacto y posteriormente ese valor será grabado en el programa 9, inciso 1, fila 13, y en la fila 19 del mismo inciso quedarán grabados los valores de PDB. Para que el espectrómetro realice las correcciones apropiadas por el uso del patrón de trabajo.

I.2.4 Corrección por Abundancia Isotópica:

En la corrección por abundancia isotópica natural de los valores de δ^{45} y δ^{46} para obtener la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ y la $\delta^{18}\text{O}_{\text{PDB}}$, se deben considerar las siguientes especies isotópicas que conforman las moléculas de CO_2 .

Siendo R = cociente de abundancia isotópica

		Abundancia Natural
R^{13}	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en cualquier compuesto	≈ 0.011
R^{17}	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ en cualquier compuesto	0.00038
R^{18}	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ en cualquier compuesto	0.0021
R^{45}	$\langle 45 \rangle / \langle 44 \rangle$	$^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
		$^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
R^{46}	$\langle 46 \rangle / \langle 44 \rangle$	$^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
		$^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
		$^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
R^{47}	$\langle 47 \rangle / \langle 44 \rangle$	$^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
		$^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{17}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
		$^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
R^{48}	$\langle 48 \rangle / \langle 44 \rangle$	$^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
		$^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{17}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
R^{49}	$\langle 49 \rangle / \langle 44 \rangle$	$^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O} / ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$

El análisis de CO_2 en el espectrómetro determina los resultados $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ y $\delta^{18}\text{O}_{\text{PDB}}$ en función de las corrientes de iones 44, 45 y 46 principalmente por lo que es necesario convertir estas medidas de corriente en valores delta, a continuación se describen las correcciones por abundancia isotópica:

Para utilizar un patrón de trabajo diferente a PDB es necesario utilizar una ecuación para medir la muestra contra el patrón de trabajo interno y posteriormente referir este valor contra PDB. Para obtener la siguiente ecuación a continuación se describen los siguientes pasos; en donde δ_1^3 es la muestra (m) relativa a PDB; δ_1^2 es el patrón de trabajo (WS) relativo a PDB y δ_2^3 es la muestra relativa al patrón de trabajo.

Ecuación para cambio de patrón:

$$\delta_1^3 = \delta_1^2 + \delta_2^3 + \frac{\delta_1^2 \delta_2^3}{1000} \quad (16)$$

donde:

$$\delta_x^r = \left[\frac{R_x}{R_y} - 1 \right] \cdot 1000 \quad (17)$$

Donde R es el cociente de 2 isótopos i, j (i = isótopo pesado o raro y j = isótopo ligero o abundante) de un elemento (E) tal que:

$$R_x = \left(\frac{E_i}{E_j} \right)_x \quad (18)$$

X y Y son gases de diferente composición isotópica, tenemos:

$$\delta_1^3 = \left(\frac{R_1}{R_3} - 1 \right) 1000 \quad (19)$$

$$\delta_1^3 = \left[\left(\frac{R_1}{R_2} \cdot \frac{R_2}{R_3} \right) - 1 \right] 1000 \quad (20)$$

$$\delta_1^3 = \left[\left\{ \left(\frac{R_1}{R_2} \cdot \frac{R_2}{R_3} \right) - 1 \right\} + \left(\frac{R_1}{R_2} - \frac{R_1}{R_2} \right) + \left(\frac{R_2}{R_3} - \frac{R_2}{R_3} \right) + (1-1) \right] 1000 \quad (21)$$

$$\delta_1^3 = \left[\left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) + \left(\frac{R_2}{R_3} - 1 \right) + \left(\frac{R_1}{R_2} \cdot \frac{R_2}{R_3} - \frac{R_1}{R_2} - \frac{R_2}{R_3} + 1 \right) \right] 1000 \quad (22)$$

$$\delta_1^3 = \left[\left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) + \left(\frac{R_2}{R_3} - 1 \right) + \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) \cdot \left(\frac{R_2}{R_3} - 1 \right) \right] 1000 \quad (23)$$

$$\delta_1^3 = \left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) 1000 + \left(\frac{R_2}{R_3} - 1 \right) 1000 + \frac{\left(\frac{R_1}{R_2} - 1 \right) 1000 \cdot \left(\frac{R_2}{R_3} - 1 \right) 1000}{1000} \quad (24)$$

En nuestro caso considerando que 1 es el patrón internacional PDB; 2 es nuestro patrón de trabajo (WS) y 3 es la muestra (m), la fórmula es la siguiente:

$$\delta_{PDB}^m = \delta_{PDB}^{NS} + \delta_{NS}^m + \frac{\delta_{PDB}^{NS} \delta_{NS}^m}{1000} \quad (25)$$

Dado lo anterior las fórmulas para corregir la presencia de masas parásitas en el CO₂ (¹²C¹⁷O¹⁶O + ¹³C¹⁶O¹⁷O¹³C¹⁷O¹⁶O + ¹³C¹⁶O¹⁷ + ¹²C¹⁷O¹⁷O) se siguen las siguientes consideraciones:

Examinando las señales de los isótopos m/e en el colector para CO₂, consideraremos las siguientes especies:

$$\begin{aligned} m/e <44> & \quad ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} \\ m/e <45> & \quad ^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O} \\ m/e <46> & \quad ^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O} \\ & \quad ^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + ^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O} \\ & \quad ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O} \end{aligned}$$

Si consideramos Sⁱ es el cociente de dos isótopos (i,j) de un elemento (E) en un gas patrón, tal que:

$$S^i = \frac{E^i}{E^j} \quad (26)$$

Por lo que tenemos que refiriendo la R para el gas de la muestra y S para el patrón de trabajo ó gas standard:

$$\delta_{\text{muestra}}^{\text{patrón}} = \delta^i = \left[\frac{R^i}{S^i} - 1 \right] 1000 \quad (27)$$

$$S^{13} = \frac{{}^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2} = \frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{12}\text{C}} = \left[1 + \frac{\delta_{\text{W.S}}^{13\text{I.S}}}{1000} \right] \cdot \left[\frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{12}\text{C}} \right]^{\text{I.S}} \quad (28)$$

Donde W.S es el patrón de trabajo e I.S es el patrón internacional PDB.

$$2S^{17} = \frac{{}^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2} = 2 \frac{{}^{17}\text{O}}{{}^{16}\text{O}} = 2 \sqrt{\left(1 + \frac{\delta_{\text{W.S}}^{18\text{I.S}}}{1000} \right)} \cdot \left(\frac{{}^{17}\text{O}}{{}^{16}\text{O}} \right)^{\text{I.S}} \quad (29)$$

Donde:

$$\left(1 + \frac{\delta^{17}}{1000} \right) = \sqrt{\left(1 + \frac{\delta^{18}}{1000} \right)} \quad (30)$$

$$2S^{18} = \frac{{}^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}} = 2 \frac{{}^{18}\text{O}}{{}^{16}\text{O}} = 2 \left(1 + \frac{\delta_{\text{W.S}}^{18\text{I.S}}}{1000} \right) \left(\frac{{}^{17}\text{O}}{{}^{16}\text{O}} \right)^{\text{I.S}} \quad (31)$$

$$S^{45} = \frac{{}^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}} = \frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{12}\text{C}} + 2 \frac{{}^{17}\text{O}}{{}^{16}\text{O}} = S^{13} + 2 S^{17} \quad (32)$$

$$S^{46} = \frac{{}^{12}C^{18}O^{16}O + {}^{12}C^{16}O^{18}O + \frac{{}^{13}C^{17}O^{16}O + {}^{13}C^{16}O^{17}O + {}^{12}C^{17}O^{17}O}{{}^{12}C^{16}O^{16}O}} \quad (33)$$

$$S^{46} = 2 \frac{{}^{18}O}{{}^{16}O} + \left(\frac{{}^{13}C}{{}^{12}C} \right)^2 \cdot \left(\frac{{}^{17}O}{{}^{16}O} \right) + \left(\frac{{}^{17}O}{{}^{16}O} \right)^2 \quad (34)$$

$$S^{46} = 2 S^{18} + 2 S^{13} S^{17} + (S^{17})^2 \quad (35)$$

$$\delta^{45} = \left(\frac{R^{45}}{S^{45}} - 1 \right) 1000 = \left(\frac{R^{13} + 2 R^{17}}{S^{45}} - 1 \right) 1000 \quad (36)$$

$$R^{13} = S^{45} \left(\frac{\delta^{45}}{1000} + 1 \right) - 2 R^{17} \quad (37)$$

$$R^{13} = S^{45} \left(\frac{\delta^{45}}{1000} + 1 \right) - 2 S^{17} \left(\frac{\delta^{17}}{1000} + 1 \right) \quad (38)$$

$$\delta^{13} = \left(\frac{R^{13}}{S^{13}} - 1 \right) 1000 \quad (39)$$

$$\delta^{13} = \left[\frac{S^{45} \left(\frac{\delta^{45}}{1000} + 1 \right) - 2 S^{17} \left(\frac{\delta^{17}}{1000} + 1 \right)}{S^{13}} - 1 \right] 1000 \quad (40)$$

$$\delta^{13} = \left[\frac{S^{45}}{S^{13}} \left(\frac{\delta^{45}}{1000} \right) + \frac{S^{45}}{S^{13}} - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} \left(\frac{\delta^{17}}{1000} \right) - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} - 1 \right] 1000 \quad (41)$$

$$\delta^{13} = \left[\frac{S^{45}}{S^{13}} \left(\frac{\delta^{45}}{1000} \right) - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} \left(\frac{\delta^{17}}{1000} \right) + \frac{S^{45} - 2S^{17}}{S^{13}} - 1 \right] 1000 \quad (42)$$

$$\delta^{13} = \left[\frac{S^{45}}{S^{13}} \left(\frac{\delta^{45}}{1000} \right) - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} \left(\frac{\delta^{17}}{1000} \right) + \frac{S^{13}}{S^{13}} - 1 \right] 1000 \quad (43)$$

$$\delta^{13} = \frac{S^{45}}{S^{13}} (\delta^{45}) - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} (\delta^{17}) \quad (44)$$

$$\delta^{13} = \frac{S^{45}}{S^{13}} (\delta^{45}) - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} \left[\frac{\sqrt{1 + \delta^{18}}}{1000} - 1 \right] 1000 \quad (45)$$

$$2\delta^{17} + (\delta^{17})^2 = \delta^{18} \quad \circ \quad \delta^{17} = \pm \sqrt{1 + \delta^{18}} - 1 \quad (46)$$

$$\delta^{13} = \frac{S^{45}}{S^{13}} (\delta^{45}) - 2 \frac{S^{17}}{S^{13}} (\sqrt{1 + \delta^{18}} - 1) \quad (47)$$

Debemos medir la δ^{46} y queremos la δ^{18} .

$$\delta^{46} = \left(\frac{R^{46}}{S^{46}} - 1 \right) 1000 \quad (48)$$

$$\delta^{46} = \left[\frac{2 R^{18} + 2 R^{13} R^{17} + (R^{17})^2}{S^{46}} - 1 \right] 1000 \quad (49)$$

$$R^{18} = \frac{S^{46}}{2} \left(1 + \frac{\delta^{46}}{1000} \right) - R^{13} R^{17} - \frac{(R^{17})^2}{2} \quad (50)$$

$$\delta^{18} = \left(\frac{R^{18}}{S^{18}} - 1 \right) 1000 \quad (51)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{\frac{S^{46}}{2} \left(1 + \frac{\delta^{46}}{1000} \right) - R^{13} R^{17} - \frac{(R^{17})^2}{2} - 1}{S^{18}} \right] 1000 \quad (52)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{S^{46}}{2S^{18}} + \frac{S^{46}\delta^{46}}{2S^{18}1000} - \frac{R^{13}R^{17}}{S^{18}} - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} - \frac{2S^{18}}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (53)$$

$$\delta^{18} = \left[\left(\frac{2S^{18}}{2S^{18}} + \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} + \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \right) + \frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{R^{13}R^{17}}{S^{18}} - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} - \frac{2S^{18}}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (54)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} + \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} + \frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{R^{13}R^{17}}{S^{18}} - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (55)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} + \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} + \frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(\frac{R^{13}R^{17}}{S^{13}S^{17}} \right) \right. \\ \left. + \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(\frac{R^{13}}{S^{13}} \right) - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(\frac{R^{13}}{S^{13}} \right) - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (56)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} + \frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(\frac{R^{13}}{S^{13}} \right) \left(\frac{R^{17}}{S^{17}} - 1 \right) - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(\frac{R^{13}}{S^{13}} \right) \right. \\ \left. + \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} + \left(\frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \right) - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (57)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} + \frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left((1 - 1) + \frac{R^{13}}{S^{13}} \right) \frac{\delta^{17}}{1000} \right. \\ \left. - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(\frac{R^{13}}{S^{13}} - 1 \right) - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (58)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \frac{\delta^{13}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(1 + \frac{\delta^{13}}{1000} \right) \frac{S^{17}}{1000} \right. \\ \left. + \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} - \frac{(R^{17})^2}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (59)$$

$$\delta^{18} = \left[\frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \frac{\delta^{13}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(1 + \frac{\delta^{13}}{1000} \right) \frac{\delta^{17}}{1000} \right. \\ \left. + \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \left(\frac{(R^{17})^2}{(2S^{17})^2} \right) + \frac{(2S^{17})^2}{2S^{18}} \left(\frac{2R^{17}}{S^{17}} \right) \right. \\ \left. - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \left(\frac{2R^{17}}{S^{17}} - 1 \right) + 2 \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} - 2 \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \right] 1000 \quad (60)$$

$$\delta^{18} = \left\{ \frac{S^{46}}{2S^{18}} \frac{\delta^{46}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \frac{\delta^{13}}{1000} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(1 + \frac{\delta^{13}}{1000} \right) \frac{\delta^{17}}{1000} \right. \\ \left. - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \left[\left(\frac{(R^{17})^2}{(S^{17})^2} - 2 \frac{R^{17}}{S^{17}} + 1 \right) + 2 \left(\frac{R^{17}}{S^{17}} - 1 \right) \right] \right\} \quad (61)$$

Si :

$$\delta^{17} = \left[\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - 1 \right] 1000 \quad (62)$$

Entonces.

$$\delta^{18} = \frac{(\delta^{17})^2}{1000} + 2\delta^{17} \quad (65)$$

$$\delta^{18} = \frac{S^{46}}{2S^{18}} \delta^{46} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \delta^{13} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left(1 + \frac{\delta^{13}}{1000} \right) \\ \cdot \left[\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - 1 \right] 1000 - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \delta^{18} \quad (64)$$

$$\delta^{18} = \frac{S^{46}}{2S^{18}} \delta^{46} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} [\delta^{13} + (1 + \delta^{13}) (\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - 1)] \\ - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \delta^{18} \quad (63)$$

$$\delta^{18} = \frac{S^{46}}{2S^{18}} \delta^{46} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left[\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} + \delta^{13} \left(\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - 1 \right) \right] - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \delta^{18} \quad (66)$$

$$\delta^{18} = \frac{S^{46}}{2S^{18}} \delta^{46} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \left\{ \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} + \left[\frac{S^{45}}{S^{13}} \delta^{45} - \frac{2S^{17}}{S^{13}} \cdot \left(\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - 1 \right) 1000 \right] \left(\sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} \right) - 1 \right\} - \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} \delta^{18} \quad (68)$$

$$\delta^{18} = \frac{S^{46}}{2S^{18}} \delta^{46} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - \frac{S^{17}S^{45}\delta^{45}}{S^{18}} \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} + 2 \frac{(S^{17})^2}{S^{18}} \delta^{18} - 2 \frac{(S^{17})^2}{S^{18}} \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} 1000 + \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} - \frac{(S^{17})^2}{S^{18}} \delta^{18} \quad (67)$$

$$= - \frac{S^{17}S^{45}\delta^{45}}{S^{18}} \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} - 2 \frac{(S^{17})^2}{S^{18}} \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} 1000 \left[\delta^{18} + \frac{(S^{17})^2}{2S^{18}} - 2 \frac{(S^{17})^2}{S^{18}} \right] - \left[\frac{S^{46}\delta^{46}}{2S^{18}} + \frac{S^{13}S^{17}}{S^{18}} + 2 \frac{(S^{17})^2}{S^{18}} \right] \quad (69)$$

$$\delta^{18} [2S^{18} - 3(S^{17})^2] - [S^{46}\delta^{46} + 2S^{13}S^{17} + 4(S^{17})^2] = - \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} [2S^{17}(S^{45}\delta^{45} + S^{13} + 2S^{17} \cdot 1000)] \quad (70)$$

El valor de δ^{18} se puede encontrar resolviendo la ecuación cuadrática:

$$A^2 (\delta^{18})^2 - (2AB + C^2) \delta^{18} + (B^2 - C^2) = 0 \quad (71)$$

donde:

$$A = 2S^{18} - 3(S^{17})^2 \quad (72)$$

$$B = S^{46} \delta^{46} + 2 S^{13} S^{17} + 4 (S^{17})^2 \quad (73)$$

$$C = 2 S^{17} (S^{45} \delta^{45} + S^{13} + 2 S^{17} \cdot 1000) \quad (74)$$

Entonces:

$$\delta^{18} \cdot A - B = - \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} \cdot C \quad (75)$$

$$(\delta^{18} A - B)^2 = \left[- \sqrt{1 + \frac{\delta^{18}}{1000}} \cdot C \right]^2 \quad (76)$$

$$(\delta^{18})^2 A^2 - 2\delta A B + B^2 = \left(1 + \frac{\delta^{18}}{1000}\right) C^2 \quad (77)$$

$$(\delta^{18})^2 A^2 - \delta \left(2AB + \frac{C^2}{1000} \right) + (B^2 - C^2) = 0 \quad (78)$$

$$\delta^{18} = \frac{- \left(2AB + \frac{C^2}{1000} \right) \pm \sqrt{\left(2AB + \frac{C^2}{1000} \right)^2 - 4A^2(B^2 - C^2)}}{2A^2} \quad (79)$$

El cociente absoluto de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en PDB nunca se ha medido, Craig en 1953 reporta comparaciones con una muestra de CaCO_3 (Jurassic Limestone, Solenhofen, Bavaria) del cual Nier en 1950 determinó $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01124$ con un 95% de confianza con un intervalo de ± 0.00009 . Nier reconsideró las contribuciones por ^{17}O y Craig en 1957 corrigió este valor a 0.0112372. Para expresar las diferencias entre muestras en términos de cocientes absolutos, Craig simplemente consideró que la muestra de Nier era $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ exactamente igual a 0.0112300, por lo que la $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el PDB era 0.0112372. Por otro lado, debemos notar que el cociente de $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ en el CO_2 que Nier preparó a partir de su muestra de CaCO_3 es poco conocido. Y en 1953 Craig obtuvo el valor de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = -0.90\text{‰}$ para la muestra de Nier contra PDB.

El patrón PDB fué definido por Urey y colaboradores en 1951. Numerosos patrones secundarios han sido definidos y comparados cuidadosamente contra PDB ó a otros materiales bien conocidos, y todas las medidas de los cocientes isotópicos de carbono se siguen reportando referidos a PDB. En 1957 Craig reporta para PDB los siguientes valores $\delta^{13}\text{C} = 0$ y $\delta^{18}\text{O} = 0$; $[R^{13}] = 0.0112372$, $[R^{17}] = 0.0007599$, $[R^{18}]_{\text{PDB}} = 0.004158$, $[R^{45}] = 0.0119971$.

Como se había mencionado anteriormente Nier en 1950 calculó los valores absolutos de R^{13} , R^{17} y R^{18} , los cuales fueron referidos a PDB por Craig y corregidos con otros patrones internacionales por Willem Mook y P.M. Grootes en 1973 refiriendo sus resultados al estándar internacional PDB:

$[S^{13}]_{\text{PDB}} = 0.0112372$, $[S^{17}]_{\text{PDB}} = 0.000380$, $[S^{18}]_{\text{PDB}} = 0.0020790$, obteniendo así la ecuación para la δ^{13} y la δ^{18} simplificando quedaría:

$$S_{\text{PDB}}^{45} = S_{\text{PDB}}^{13} + 2S_{\text{PDB}}^{17} = 0.0112372 + 2(0.00038) = 0.0119972 \quad (80)$$

$$\delta_{PDB}^{13} = \frac{S^{45}}{S^{13}} \delta^{45} - \frac{S^{17}}{S^{13}} \delta^{46} = \frac{0.011997}{0.011237} \delta^{45} - \frac{0.00038}{0.0112372} \delta^{46} \quad (81)$$

$$\delta^{13}C_{PBD} = 1.06763371 \delta^{45} - 0.033816253 \delta^{18} \quad (82)$$

$$\delta^{18}O_{PDB} = \delta^{46} - \frac{R^{17}R^{45}}{R^{18}} \delta^{46} = 1.0010\delta^{46} - 0.0021 \delta^{13}C \quad (83)$$

Utilizando CO_2 de un tanque como patrón de trabajo (δ^{13} y $\delta^{18} \approx -20 \%$ con respecto a $PDB-CO_2$), se pueden utilizar estas ecuaciones asumiendo que el fraccionamiento isotópico depende exclusivamente de la masa, mostrando diferencias menores a 0.01% . Mientras la medida isotópica de CO_2 que utilicemos como patrón de trabajo sea más cercana a las muestras el error será menor.

I.3 Patrones de Referencia Internacionales.

Uno de los problemas que se presentaron con el avance del uso de los isótopos, fué la comparación de resultados obtenidos por los diferentes laboratorios; es por esto que se ha aceptado internacionalmente que los datos obtenidos sean referidos a estándares distribuidos por el NIST (National Institute of Standards & Technology). Actualmente los datos son reportados en δ ‰ con respecto a un patrón internacional, esto es, se hace una calibración del patrón de trabajo interno, con respecto a una referencia confiable y certificada, utilizando la fórmula de la sección anterior.

En las relaciones isotópicas de carbono-13 y oxígeno-18 se utiliza como patrón internacional de referencia el PDB (belemnite from Peedee Formation of South Carolina) que es un CaCO_3 carbonato marino de la formación Peedee en Carolina del Sur.

Como se mencionó anteriormente este patrón ya no existe, por lo cual el National Institute of Standards & Technology distribuye patrones internacionales con valores referidos a PDB, los cuales son utilizados para calibrar el CO_2 que es utilizado como patrón de trabajo y corregir su valor. Los patrones que son utilizados para ello se muestran en la Tabla XIX.

TABLA XIX.

Patrón Internacional Certificado	Descripción	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \pm \sigma$
NBS-16	CO_2 puro	$-41.48 \pm 0.03_{1983}$
NBS-17	CO_2 puro	$-4.41 \pm 0.02_{1983}$
SRM 8543 NBS-18	CaCO_3 carbonatita	$-5.04 \pm 0.06_{1983}$
SRM 8544 NBS-19	CaCO_3 mármol	$+1.95 \pm 0.02_{1992}$
NBS-20 Solenhofen limestone	CaCO_3 mármol	$-1.06 \pm 0.02_{1983}$
NBS-21	Grafito	$-28.10 \pm 0.03_{1992}$
SRM 8539 NBS-22	Aceite	$-29.73 \pm 0.09_{1992}$
SRM 8540 PEFI	Polietileno	$-31.77 \pm 0.08_{1992}$
SRM 8542 Sucrose ANU	Sucrosa	$-10.47 \pm 0.13_{1992}$

(Coplen Taylor B., Kendall Carol & Hopple Jessica, 1983) y (Reed William P. 1992).

La definición de un material de referencia (RM); es una sustancia para calibrar un análisis químico ó validar un proceso de medición. Un material de referencia interno (IRM); es un material hecho por un laboratorio para su uso interno. Un material de referencia externo (ERM); es un material hecho por alguien y otro lo utiliza. Un material de referencia certificado (CRM); es un material de referencia (RM) el cual está certificado por una organización reconocida como técnicamente competente. Un material de referencia estándar (SRM); es un material de referencia certificado (CRM) por el NIST.

Todas las buenas mediciones dependen de patrones. Los patrones internacionales utilizados para calibrar el espectrómetro de masas de isótopos estables deben ser capaces de producir valores exactos. Por lo cual deben ser suficientemente precisos. Para estimar la precisión, es necesario medir un número de réplicas durante un largo período. La precisión se cuantifica en término de variancia, la cual es el cuadrado de la desviación estándar. La calibración puede ser definida como la comparación de la medida de un patrón con un instrumento con la medida del mismo patrón con otro instrumento para identificar cualquier variación de la exactitud del mismo y corregirla.

Para realizar una calibración cuando se tienen problemas, es necesario medir por lo menos tres muestras de referencia tres veces cada una. Así mismo la frecuencia de recalibración depende de la estabilidad del sistema de medición y los requerimientos de exactitud de los datos. El intervalo de una calibración confiable puede considerarse como el intervalo de una medición confiable y viceversa.

Un patrón internacional SRM, debe cumplir ciertas especificaciones: rara vez requiere control, es puro, homogéneo en su total y en particiones antes de certificar el análisis. En el caso de que ocurran discrepancias en los análisis, a estos valores no se les dará certificado. Otra forma de certificar la composición de un patrón SRM deberá ser analizado por otros laboratorios para determinar su precisión y exactitud, esto facilita la intercalibración de los laboratorios y promueve la compatibilidad de las mediciones.

Es importante hacer notar que, cuando un proceso de medición demuestra estar bajo control estadístico, la exactitud del proceso implica la caracterización de la exactitud de todos los datos producidos por el proceso. Un sistema de medición estable produce resultados reproducibles. El control estadístico puede definirse como el conocimiento de un estado de predicción. Bajo esas condiciones, el promedio de un gran número de medidas, se aproxima al valor límite y las medidas individuales deben tener una distribución estable dentro de su desviación estándar. Bajo estas condiciones, los límites en los cuales un nuevo valor se espera dentro de la predicción con una probabilidad esperada, los

límites de confianza para una medida ó promedio de una serie de medidas pueden ser calculados, y el número de medidas que se requieren para obtener el valor promedio está dado por la confianza con que se puede estimar. (Taylor, 1993).

APENDICE II.

II.0 Material y Métodos.

II.1 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS ORGANICAS. (IFUNAM.C13.ORG).

A) OBJETIVO

El objetivo del presente método es transformar totalmente el carbono de la materia orgánica en bióxido de carbono CO_2 puro para medir su contenido de carbono-13. Lo anterior se realiza mediante la combustión de la muestra durante dos horas en presencia de óxido cúprico a 550°C ó a 900°C .

Es posible aplicar este método a toda la materia orgánica en estado sólido, líquido ó gaseoso.

B) EQUIPO

- La combustión de la materia orgánica se realiza en una mufla que opera con una temperatura máxima de 1100°C con un error no mayor de $\pm 5^\circ\text{C}$. (Mufla Termolyne Modelo No. F48025)

- La preparación y purificación de las muestras se realizan en líneas de vacío 1 y 2, Fig. 12 y 13. La línea de vacío para la preparación de muestras es una línea horizontal con capacidad para preparar 9 muestras y la línea de vacío para la purificación de muestras es una línea vertical de extracción múltiple con capacidad de purificar 5 muestras a la vez.

Cada una de las líneas de preparación y purificación de muestras está equipada con una bomba mecánica para obtener un prevacío de 2×10^{-2} Torr y un sistema de bombas acopladas, mecánica y difusora para tener un vacío medio de 10^{-3} Torr. (Bombas mecánicas marca Leybold, modelo D4b, y bombas difusoras construídas en el taller del IFUNAM)

- Se cuenta con medidores de vacío tipo piranni, termopares y un baratrón para medir el rendimiento de las muestras. (Piranni marca Edwads Modelo DV-23, Termopar marca Hasting Modelo DV-23, Termopar marca RCA y Baratrón marca Setra S/N 251363, modelo 280E con un intervalo de 0-25 psia, con fuente desarrollada en el Instituto de Física de la UNAM en millitorr.

- Para pesar las muestras se utiliza una balanza analítica (Marca Sartorius, modelo 2474, con un peso máximo de 200 gr y $d=0.1\text{mg}$).

- Centrífuga IEC Central-HN con rotor de 45° para 6 tubos de 50 ml.

- Se determinan las abundancias relativas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (expresadas mediante la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en ‰) con un espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, de triple colector y sistema de introducción automático de gases. (Finnigan Mat. 355 River Oaks Parkway, San José California 95134-1991).

C) MATERIAL Y REACTIVOS.

- Pinzas de punta de acero inoxidable para disección.
- Secadora de aire tipo industrial.
- Gatos mecánicos de laboratorio.
- Generador tesla para detección de fugas en sistemas de vidrio.
- Tamices. malla 40, malla 100 y malla 150. (Durango Vela S.A. J Vasconcelos 198, Tacubaya, México, D.F.).
- Tubo pyrex de 9 mm de diámetro externo y 25 cm de largo, sellado por un lado con soplete. (Schot Ruhglas, Duran, West Germany). Este tubo es quemado a 550°C en una mufla para que est libre de materia orgánica.
- Tubo de cuarzo de 9 mm de diámetro externo, 7 mm de diámetro interno y 20 cm de largo, sellado por un lado con soplete y tubo de cuarzo de 6 mm de diámetro externo, 4 mm de diámetro interno 2 cm de largo, sellado por un lado con soplete. (Quartz Scientific, Inc. 819 East Street, Fairport Harbor, Ohio 44077). Este tubo es quemado a 550°C en una mufla para que se encuentre libre de materia orgánica.
- Óxido Cúprico en tiras (J.T. Baker S.A. de C.V. Xalostoc, México, Cat. 1820). El óxido cúprico es pasado por una malla de No. 40 para retirar el polvo. Posteriormente es quemado en una mufla a 850°C durante tres horas al aire para oxidar toda la materia orgánica que contenga.
- Plata 99.9994% de pureza (Banca Cremi), la plata es laminada : cortada en secciones de 1 mm de ancho por 7 mm de largo. Las cuales son limpiadas con una solución de ácido nítrico al 30%, posteriormente son lavados con agua desmineralizada y son calentados en una mufla a 550°C durante una hora. La plata es usada como catalizador en un tubo de combustión. Si la combustión se realiza en pyrex basta con adicionar la lámina de plata, si la combustión se realiza en cuarzo, es necesario colocar la plata un capilar de cuarzo y posteriormente este en el tubo de combustión.
- Cobre metálico activado. (Alpha Resources Inc. PO BOX 199 Stevensville, Michigan 49127, U.S.A.).

- Tubo de combustión. Al tubo de pyrex ó de cuarzo se le adicionan $\approx$ 3 gr. de óxido cúprico, la plata y son calentados a 550°C en una mufla durante dos horas y son almacenados en un horno a 50°C. Previo al análisis se colocan 2 gr. de cobre metálico para el caso de la combustión en tubo de cuarzo.

- Tubo capilar el cual es cortado en punta con soplete para tener 2.5 cm de largo, posteriormente es quemado a 550°C en una mufla durante una hora y son almacenados en un horno a 50°C. (Tubo capilar Kimax 51, no. de cat. 34500 de 1.5 - 1.8 X 100 mm. Y no. de cat. 34502 de 0.8 - 1.10 X 100 mm., Kimble Products, U.S.A.)

- Tubo capilar de cuarzo de 2 mm de diámetro interno y 3.2 mm de diámetro externo, el cual es cortado en punta para tener aprox. 2.5 cm de largo, posteriormente es quemado a 550°C en una mufla durante una hora y son almacenados en un horno a 60°C. (Quartz Scientific, Inc. 819 East Street, Fairport Harbor, Ohio 44077).

- Acido túngstico, sal sódica. (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Cat. T2629). En una solución al 10% con agua destilada.

- Acido Sulfúrico. 2/3 N. (J.T. Baker S.A. de C.V. Xalostoc, México, Cat. 9681). Adicionar 1.88 ml de H_2SO_4 en agua y aforar a 100 ml en un matraz volumétrico.

$$H_2SO_4 \frac{2}{3} N = \frac{98.082 \frac{gr}{cm^3}}{1.83 \frac{gr}{cm^3}} \cdot \frac{1 \text{ mol de } H_2SO_4}{2 \text{ eq } H_2SO_4} \cdot \frac{\frac{2}{3} \text{ eq } H_2SO_4}{1 \text{ lt}} \cdot \frac{100 \text{ g}}{95 \text{ g}} \cdot \frac{1 \text{ lt}}{1 \text{ mol } H_2SO_4} \cdot \frac{100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 1.88 \text{ ml}$$

- Tubo de celulosa para diáísis, Sigma 250-9U para retener proteínas con un peso meolecular > 12 000, de 30 cm de largo por 5 mm de ancho, plana. Se humedece 5 min antes de usarse.

- Acetona USP, para limpiar la grasa de las conexiones.

- Pipetas graduadas de vidrio de 2, 5 y 10 ml.

- Tubos de centrífuga Oak-Ridge de nalgene de 50 ml. (Curtin Matheson Scientific, INC. San Francisco 470 Valley Drive Brisbane, CA 94005-1291, EUA. Cat. 321-307).

- Frascos contenedores de vidrio con válvulas para vacío de teflón y de vidrio (Kontes, 30940 San Clemente Street, Hayward, CA 94544, EUA, Cat. Hi-Vac, Glass Plug 826460-0004, Hi-Vac, PTFE 826510-0004 y Louwers Hapert Glastechniek en Laboratoriumbenodigheden B.V. Nijverheidweg 1-3, 5527 Ag. Hapert, Nederland, Cat.

High Vac Stopcock 8 mm). Estos frascos se utilizan para transportar el CO_2 de la línea de preparación de muestras al espectrómetro de masas.

- Termos de vidrio de diferentes tamaños (1, 1/2 y 1/4 lt) para nitrógeno líquido. (Cristalab S.A. Km. 21.5 Carr. Fed. a Cuernavaca, Paseo de San Juan N°32, San Andrés Totoltepec, Deleg. Tlalpan, 14460 México, D.F.)

- Termo de 50 litros de acero inoxidable.

- Un soplete (antorcha) de gas - oxígeno para sellar el tubo de pyrex o cuarzo.

- Tanque de oxígeno, para el soplete. (Infra, S.A. de C.V. Félix Guzmán No. 16 Col. El Parque. Naucalpan de Juárez, Edo de México.)

- Hielo seco. Hecho con un tanque de CO_2 con sifón. (Infra, S.A. de C.V. Félix Guzmán No. 16 Col. El Parque. Naucalpan de Juárez, Edo de México.)

- Mezcla Frigorífica - 80°C. Hecha con hielo seco frapé y alcohol etílico industrial ó acetona.

- Nitrógeno líquido. (Infra, S.A. de C.V. Félix Guzmán No. 16 Col. El Parque. Naucalpan de Juárez, Edo de México).

- 9 uniones cajón ultra torr de 3/8" a 3/8" Cat. SS-6-UT-6. (Uniones Cajón. Swagelok Companies. Válvulas y Conexiones de la Cd. de México. Blvd. Avila Camacho No. 1994 Desp.705-7° Piso Col. San Lucas Tepetlalco. Tlanepantla, Edo. de México. CP 54050).

- Se requiere un sistema para romper el tubo que contiene el gas CO_2 , este sistema se encuentra formado por las siguientes partes:
a) dos uniones reductoras cajón ultra torr de 3/8" a 1/2", Cat. SS-8-UT-8-6, b) un tubo flexible cajón de 1/2", Cat. 321-8-X-1, c) y dos adaptadores de acero inoxidable Cat. SS-6-UT-A-8. El material de este inciso es para un solo rompedor. (Uniones Cajón. Swagelok Companies. Válvulas y Conexiones de la Cd. de México. Blvd. Avila Camacho No. 1994 Desp.705-7° Piso Col. San Lucas Tepetlalco. Tlanepantla, Edo. de México. CP 54050).

- Una microjeringa Oxford de volumen variable de 2 a 10 μl y de 20-50 μl . con puntas de plástico para la jeringa. (Monoject. St. Louis, MO. 63103 E.U.A. Cat. 8885-300106 y 8885-300205).

- Tanque de CO_2 (Grado analítico), de 99.995% mínimo de pureza en un cilindro de 7 L, contenido en un tanque metálico a una presión máxima de 1551 KPa a 294°K (21°C) con un regulador de dos pasos con una presión de entrega de 0 - 718.2 Pa (0 a 15 psi) para

trabajar con cilindros con una presión máxima de 20.7 KPa. (Air Products & Chemical INC, PO Box 351, Tamaquia, Pensylvania 18252, EUA).

C) PROCEDIMIENTO

La técnica empleada es la más recientemente aceptada internacionalmente y está de acuerdo con las técnicas descritas por: Zvi Sofer (1980), Mook y Jongsma (1987) y Boutton y col. (1983).

C.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra no requiere ninguna preparación especial. Se pesan aproximadamente 20 miligramos de muestra, en un capilar y se introduce este en el tubo de combustión de pyrex preparado con ≈ 3 gr. de óxido cúprico y plata previamente calentado a 550°C .

Si la muestra se realiza en tubo de cuarzo, se pesan aproximadamente 20 miligramos de muestra en el tubo de 6 mm de diámetro y se coloca invertido en el tubo de combustión de cuarzo preparado con ≈ 3 gr. de óxido cúprico y plata contenida en un capilar de cuarzo previamente calentados a 550°C , posteriormente se agregan $\approx$ de 3 gr. de cobre metálico, es importante separar con el tubo de cuarzo el Cu° de la muestra, del CuO y de la Ag° .

Algunas de las precauciones que se deben tomar en el momento de preparar la muestras es no contaminar con materiales orgánicos como la grasa de los dedos, por lo que se debe colocar la muestra en el tubo capilar rápidamente y este se debe manipular con pinzas, así mismo es importante señalar que la porción de muestra a analizar sea homogénea.

Los tubos de combustión una vez preparados con la muestra se conectan a la línea de vacío para la preparación de la muestra Fig. 12 a través de una unión ultra torr de $3/8''$, se congela la muestra con nitrógeno líquido para evitar su evaporación en el caso de muestras líquidas y se evacúan con prevacío y vacío medio hasta alcanzar una presión de 1×10^{-3} torr, una vez que se ha alcanzado este vacío son sellados con el soplete. Cada vez que se preparan muestras para análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}$, se prepara un patrón internacional NBS-22 (8 μl), PEFI (8 mg) y/o sacarosa ANU (15 mg).

Línea de vacío para la preparación de muestras.

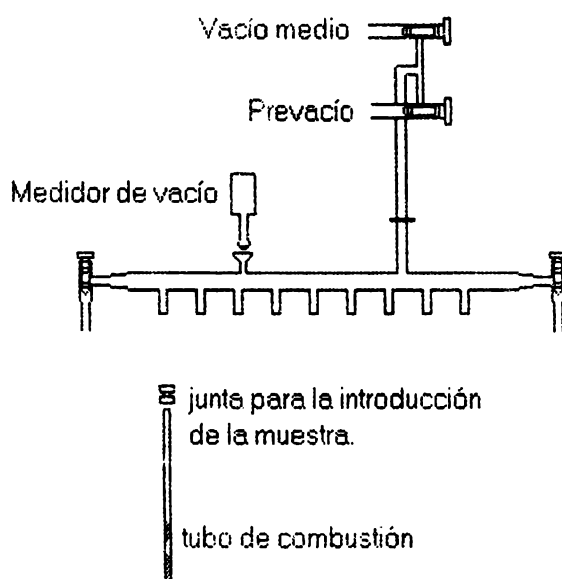


Figura 12

C.2 COMBUSTION

Los tubos de combustión en pyrex sellados son calentados a 550°C durante 2 horas y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

Los tubos de combustión en cuarzo sellados, son calentados durante 2 horas a 900°C en una mufla, posteriormente se dejan enfriar lentamente hasta 650°C y son mantenidos a esta temperatura durante 1 hora y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

Para lograr la combustión completa de la muestra se utiliza óxido cúprico, el cual libera oxígeno.

El cobre metálico sirve para poder convertir los óxidos de nitrógeno en N_2 a una temperatura de 650°C.

C.3 PURIFICACION DE CO_2

El CO_2 producido durante la combustión de la muestra es separado y purificado criogénicamente a través de trampas de nitrógeno líquido (-190°C) y mezcla de hielo seco y alcohol ó acetona (-80°C) en una línea de vacío para la preparación simultánea de cinco muestras, Fig. 13, de la siguiente manera.

- Se marcan los tubos de combustión con un cortador de vidrio y se colocan en el rompedor de tubos.
- Se conectan los rompedores con los tubos de combustión en la línea de vacío y se abren las válvulas 5a, 6a y 7a (5b, 6b, 7b, 5c, 6c, 7c etc. hasta 5e, 6e, 7e) para bombear el aire abriendo la válvula 1. Así mismo se conectan las válvulas contenedoras y se abren las válvulas 10 y 11.
- Una vez que se ha alcanzado un vacío de 1×10^{-1} torr con las válvulas 1, 10, 11, 5a, 6a y 7a abiertas, se cierra la válvula 1 y se abre la válvula 2. Una vez que el vacío llega a 10^{-3} torrs se cierran las válvulas 5a, 5b, 5c, 5d, 5e y 5f.
- Se procede a romper los tubos, flexionando el rompedor.
- Se coloca un termo con nitrógeno líquido (-180°C) en la trampa #8 para condensar el CO_2 y el agua. Los gases no condensables se bombean a través del sistema de vacío, abriendo primero la válvula 1 y después la válvula 2. Es importante anotar la cantidad de gases incondensables que marca el medidor de vacío.
- Se cierran las válvulas 7a, 7b, 7c, 7e y 7f y las válvulas 5a, 5b, 5c, 5d, 5e y 5f.

- Se retira el nitrógeno líquido de los dedos fríos y se cambia el termo por una mezcla de hielo seco-etanol (-80°C). En esta trampa, el agua producida en la reacción se queda congelada.

- Se coloca nuevamente el termo de nitrógeno líquido en la trampa 9, para coleccionar el CO_2 , una vez que se tiene un vacío de 10^{-3} Torr, se cierran las válvulas 6a, 6b, 6c, 6d, 6e y 6f y se cambia la trampa por mezcla de hielo seco - etanol, esta trampa es para asegurar que toda el agua se ha quedado en los dedos fríos.

- El CO_2 purificado se transfiere a la trampa que se encuentra entre las válvulas 10 y 11 con nitrógeno líquido para medir la presión del gas, el cual es descongelado y transferido al frasco contenedor a través de la válvula 11 utilizando nitrógeno líquido. De esta misma forma se colecta el CO_2 de los demás dedos fríos en los frascos contenedores a través de las válvulas 5b, 5c, 5d y 5f.

Para la purificación de CO_2 se recomienda utilizar la línea de vacío para la purificación de muestras orgánicas Fig. 14 la cual se diseñó especialmente para este tipo de muestras, ya que la limpieza de ellas es mejor.

C.5 ANALISIS ISOTOPICO

Los frascos con el CO_2 purificado se colocan en el espectrómetro de masas para determinar la $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras.

C.6 OBTENCION DE RESULTADOS

- La fórmula de cálculo es la descrita en páginas anteriores y que nuevamente se enuncia a continuación:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} - 1 \right) 10^3 \quad (85)$$

Donde:

$\delta^{13}\text{C}$ está expresada por los cocientes de los isótopos estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de la muestra contra el patrón internacional PDB.

El cálculo del resultado se encuentra en el programa de la computadora del espectrómetro de masas.

Línea de vacío 2 para la preparación simultánea de cinco muestras

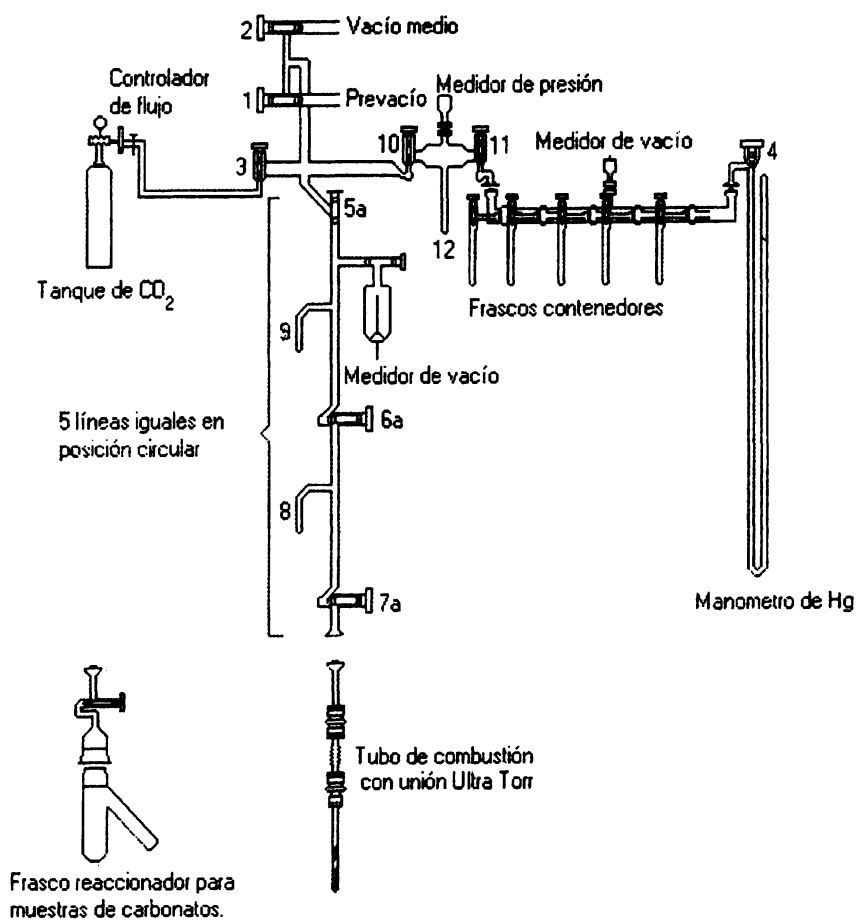


Figura 13

Línea de vacío para la purificación de CO_2 y H_2O
de muestras orgánicas.

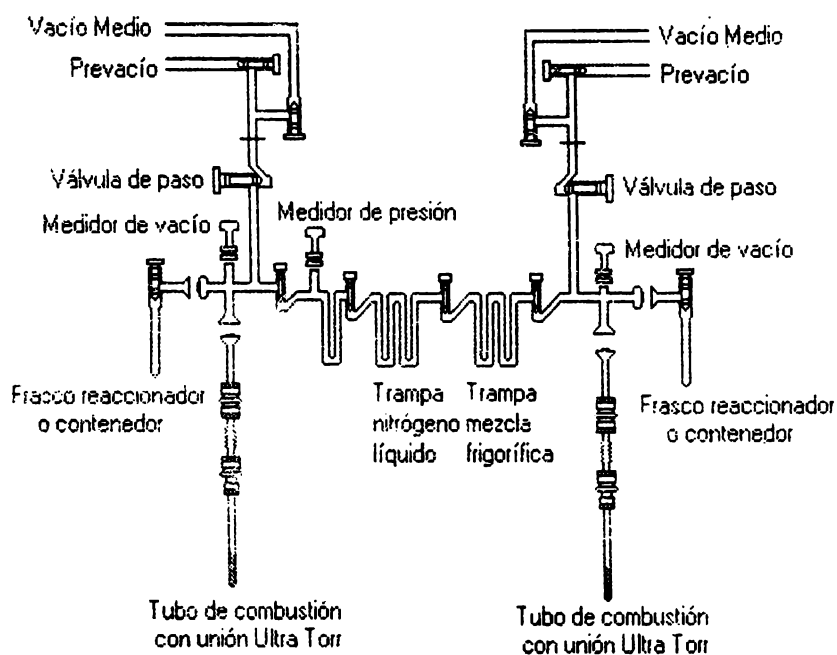


Figura 14

La precisión de esta técnica esta dada por la desviación estándar de los análisis del patrón internacional y del patrón interno realizados durante los últimos 12 meses. (0.1%)

II.2 Caracterización isotópica de las plantas productoras de néctar:

Para conocer en detalle las características de la floración específica de las plantas productoras de néctar se realiza el análisis isotópico de las plantas que las abejas utilizan para la recolección de néctar y polen.

Al laboratorio de isótopos estables nos hicieron llegar un conjunto de muestras de hojas pertenecientes a las principales plantas mielíferas del estado de Campeche que son objeto de estudio botánico para su caracterización isotópica.

El procedimiento experimental que se sigue para muestras sólidas previo al análisis isotópico se inicia secando el material a 75°C por 24 horas, seguido por molido fino y pasado por una malla del número 40. Se homogeniza la muestra y se toma una alícuota de 20 mg. la cual se coloca en un tubo de combustión siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para tubo de pyrex a 550°C. Técnica IFUNAM.C13.ORG.

II.3 Caracterización Isotópica de la Miel de Abeja:

En esta parte del estudio se trata de conocer la distribución estadística de los valores de una serie de muestras provenientes del Estado de Campeche que es el principal productor de miel de la República Mexicana y completarlo con muestras de miel colectadas en otras localidades productoras.

El criterio de colección de muestras que se trata de seguir es el de conseguir al menos una muestra que represente a 100,000 colonias y que provengan principalmente de la península de Yucatán y del Estado de Morelos que son considerados los principales productores de miel de abeja.

En la miel de abeja el procedimiento seguido es el análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$, es similar al descrito anteriormente con la única variante que la muestra no se pasa por el horno de desecación sino que se introduce una alícuota de 20 mg de miel de abeja en un capilar y posteriormente se coloca en el tubo de combustión, siguiendo el método descrito anteriormente para tubo de combustión en pyrex a 550°C para las primeras muestras, posteriormente se trabajó con tubo de combustión en cuarzo a 900°C ya que las determinaciones isotópicas en tubo de pyrex mostraron una gran dispersión para las muestras de miel.

II.4 Método de Precipitación Directa de la Proteína contenida en la Miel de Abeja.

Para la separación y purificación de la proteína de la miel de abeja se seguirá el método descrito por Jonathan W. White (1989) el cual sigue los siguientes pasos:

- a) Si la miel se encuentra en estado semisólido, se calienta la miel en un baño a 60°C, sin exceder los 77°C ó en un horno de microondas durante 30 segundos.
- b) Si la miel contiene materia sólida es tamizada por una malla del no. 100-150, debido a que cualquier material insoluble y más pesado que el agua puede contaminar la proteína precipitada, como lo son levaduras, polen de las flores el cual puede ser proveniente de plantas C₄ ó C₃ u otras partículas.
- c) Se adicionan en un tubo de centrífuga de 50 ml, 4 ml de agua, 20 gr. de miel y se mezclan bien.
- d) En un matraz erlenmeyer de 25 ml. se colocan 4 ml. de una solución de tungstato de sodio al 10% y 4 ml de una solución de H₂SO₄ 2/3 N, se mezcla e inmediatamente se adiciona al tubo de centrífuga que contiene la miel, se mezcla bien.
- e) Girar el tubo en un baño de 80°C durante 5 minutos hasta observar un precipitado de partículas finas, con un sobrenadante claro.
- f) Si no es visible el precipitado ó el sobrenadante permanece turbio, se agregan 2 ml del ácido sulfúrico 2/3 N y se repite el calentamiento. Esta operación se puede repetir varias veces hasta completar 20 ml de la solución de ácido sulfúrico 2/3 N.
- g) Se agrega agua hasta llenar el tubo, se mezcla y se coloca en una centrífuga durante 5 min. a 1500 X g; se decanta el sobrenadante y se lava el precipitado 5 veces con 50 ml de agua, dispersando este precipitado cada vez.
- h) Se transfiere el precipitado con un mínimo de agua utilizando una pipeta Pasteur a una cápsula de porcelana y la proteína es secada en un horno a 75°C durante 3 hrs.

Para determinar la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ de la proteína se utiliza el método de combustión y purificación del CO₂ IFUNAM.C13.ORG.

Posteriormente se aplicará la fórmula de % de adulteración y se determinará la bondad del método.

II.5 Método de Diálisis-Precipitación de la Proteína contenida en la Miel de Abeja.

Se seguirá el método descrito por Jonathan W. White en 1992, variando la cantidad de miel de abeja, para nuestras necesidades en cuanto a la cantidad de proteína que se requiere para el análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$.

En una membrana de celulosa para diálisis (Sigma 250-9U de 30 cm X 25 mm plana), la cual retiene proteínas con un peso molecular mayor a 12 000. previamente colocada en agua destilada. Se hace un nudo en un extremo de la membrana, en una jeringa se colocan 20 gr de miel de abeja mezclada con 3-5 ml de H_2O , se abre la membrana y se inserta la miel, si la miel esta muy espesa se calienta en un horno de microondas durante 30 segundos antes de adicionar el agua. Una vez que se tiene la miel dentro de la membrana se hace un nudo en el otro extremo con un hilo. Se deja la membrana en un recipiente con agua corriente durante 16 horas como mínimo.

Posteriormente se transfiere el contenido de la membrana a un tubo de centrifuga de 50 ml. y se centrifuga durante 5 minutos a 1500 x g. Se decanta el sobrenadante en un vaso de precipitados y se desecha el precipitado.

En un matraz erlenmeyer de 25 ml. se adicionan 10 ml de una solución al 10% de tungstano de sodio y 10 ml de una solución 2/3 N de H_2SO_4 se mezclan y de inmediato se colocan en el vaso de precipitados.

Esta mezcla se calienta en una parrilla aproximadamente a 80°C con agitación hasta tener un precipitado visible con un sobrenadante claro. Si el precipitado no se hace visible se agregan hasta 10 ml más de H_2SO_4 2/3N.

Se transfiere esta mezcla a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifuga durante 5 min a 1500 x g. Se deshecha el sobrenadante y se dispersa el precipitado, se le adiciona agua destilada, se mezcla bien y se vuelve a centrifugar durante 5 min a 1500 x g. se deshecha el sobrenadante y con una pipeta pateur se coloca el precipitado en un crisol para secar la proteína en un horno a 75°C durante 3 hrs. Esta muestra se homogeniza y se toma una alícuota de 20 mg. para realizar la combustión con el método IFUNAM.C13.ORG. para tubo de combustión en cuarzo a 900°C.

Este método tiene la ventaja de no tener que tamizar la muestra, lo cual es un paso tedioso; y de librarla de levaduras las cuales cambian la composición isotópica de la muestra.

Se recomienda utilizar tubos de centrifuga de 100 ml, para facilitar los lavados, ya que el volumen de las mezclas es mayor de 50 ml.

II.6 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ Y $\delta^{18}\text{O}_{\text{POB}}$ EN CARBONATOS. IFUNAM.C13.CA

A) Objetivo.

El objetivo del presente método es la de convertir el carbono y oxígeno de los carbonatos en CO_2 mediante su reacción con ácido ortofosfórico al 100%, para determinar su composición isotópica tanto de Carbono-13 como de Oxígeno-18 ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$). (Craig, 1953).

El presente método se puede utilizar en muestras tales como conchas, caracoles, mármol, etc.

B) Material y Reactivos.

- Un baño con temperatura controlada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, el espectrómetro de masas y el sistema de vacío de preparación y purificación de muestras.

- Frascos reaccionadores de vidrio con tubo lateral para colocar el ácido.

- válvula de paso.

- Pipeta y Propipeta para medir el volumen del ácido.

- Mezcla hielo seco-etanol ó hielo seco-acetona.

- Termos de vidrio de diferentes volúmenes; 1/4, 1/2 y 1 lt.

- Frascos contenedores de vidrio con válvula de paso.

- Acido ortofosfórico (H_3PO_4) al 85%. (J.T. Baker S.A. de C.V. Xalostoc, México, cat. 260).

-Pentóxido de fósforo (P_2O_5). (E. Merck, D-6100 Darmstadt, FR Germany Cat. 570).

- Trióxido de Cromo (CrO_3). (J.T. Baker S.A. de C.V. Xalostoc, México, cat. 1630).

- Acido ortofosfórico al 100%. En un vaso de precipitados, a un litro de ácido ortofosfórico H_3PO_4 al 85% se le agrega pentóxido de fósforo P_2O_5 (± 665.6 gr.) muy lentamente hasta que no exista reacción entre el agua del ácido y el P_2O_5 . Con una espátula se le agregan unos cristales de trióxido de cromo. La solución es calentada a 200°C durante 7 horas continuas, posteriormente se le agrega 1 ml. de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (30 volúmenes), y nuevamente se calienta durante 4.5 hr. a 220°C . Se enfría y se determina su densidad la cuál deberá ser de $1.90 - 1.92 \text{ gr/cm}^3$. Si la densidad es menor, se agrega más pentóxido de fósforo P_2O_5 ,

y si la densidad es mayor se agrega un poco de H₂O destilada y se calienta durante cuatro horas más.

- Balanza analítica.

C) Procedimiento.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Cuando la muestra es pura, se pesan aproximadamente 40 mg de la muestra y se colocan en el frasco reaccionador teniendo cuidado de que no quede polvo en las paredes, con una pipeta se colocan en el dedo lateral del frasco reaccionador aproximadamente 10 ml de ácido ortofosfórico H₃PO₄ al 100%.

- Se cierran los frascos reaccionadores con sus válvulas de paso y se colocan en la línea de purificación de la Fig 13.

- Se les hace prevacío a los frascos reaccionadores abriendo las válvulas 5, 6 y 7 hasta 10⁻¹ torr a través de la válvula 1 y después se cierra esta y se abre la válvula 2 y se espera hasta lograr un vacío de 10⁻³ torrs.

- Una vez alcanzado los 10⁻³ torrs se cierran las válvulas 7 y las válvulas de paso de los frascos reaccionadores y se retiran estos de la línea teniendo precaución de que las válvulas 7 estén cerradas.

- Se coloca el frasco reaccionador en el baño a 25°C durante 30 min, hasta que el ácido ha adquirido la temperatura del baño.

- Se vierte el ácido a la muestra y se inicia la siguiente reacción:



El factor de fraccionamiento, α , es el cociente de dos isótopos dividido por el cociente correspondiente de otra fase, como lo es el caso del ion carbonato y el agua.

$$\alpha = \frac{\frac{3[\text{C}^{18}\text{O}_3^-] + 2[\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}_2^-] + [\text{C}^{16}\text{O}_2^{18}\text{O}^-]}{3[\text{C}^{16}\text{O}_3^-] + 2[\text{C}^{16}\text{O}_2^{18}\text{O}^-] + [\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}_2^-]}}{\frac{[\text{H}_2^{18}\text{O}]}{[\text{H}_2^{16}\text{O}]}} \quad (87)$$

Las constantes de equilibrio de la reacción de intercambio entre varios iones de carbonato esta dada por una simetría de números, por lo que la expresión para α , se reduce a la expresión de la constante de equilibrio de la reacción:



El fraccionamiento isotópico asociado a esta reacción depende de la temperatura y para 25°C es de 1.0137. (Mc. Crea 1950).

- Se vuelve a colocar el frasco reaccionador en el baño a 25°C, y se permite que siga reaccionando durante 12 horas.

PURIFICACION DE LA MUESTRA

- A las 12 horas se retira el frasco del baño y se procede a purificar el CO₂.

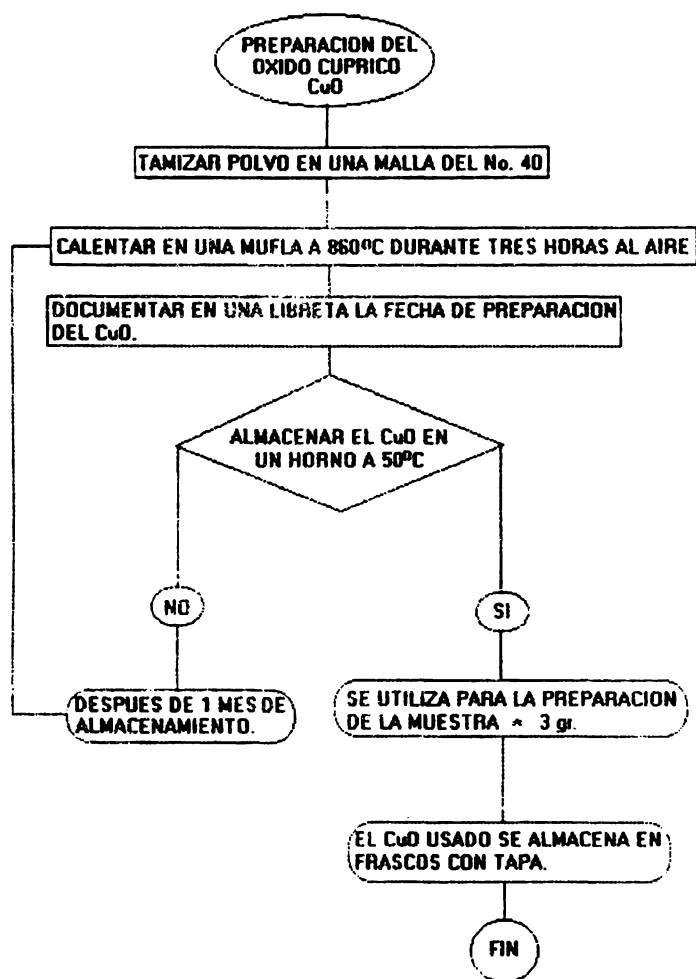
- El CO₂ producido es separado y purificado criogénicamente a través de trampas de nitrógeno líquido (-190°C) y mezcla se hielo seco y alcohol (-80°C), de la misma manera y en la misma línea de preparación que la de la técnica IFUNAM.C13.ORG.

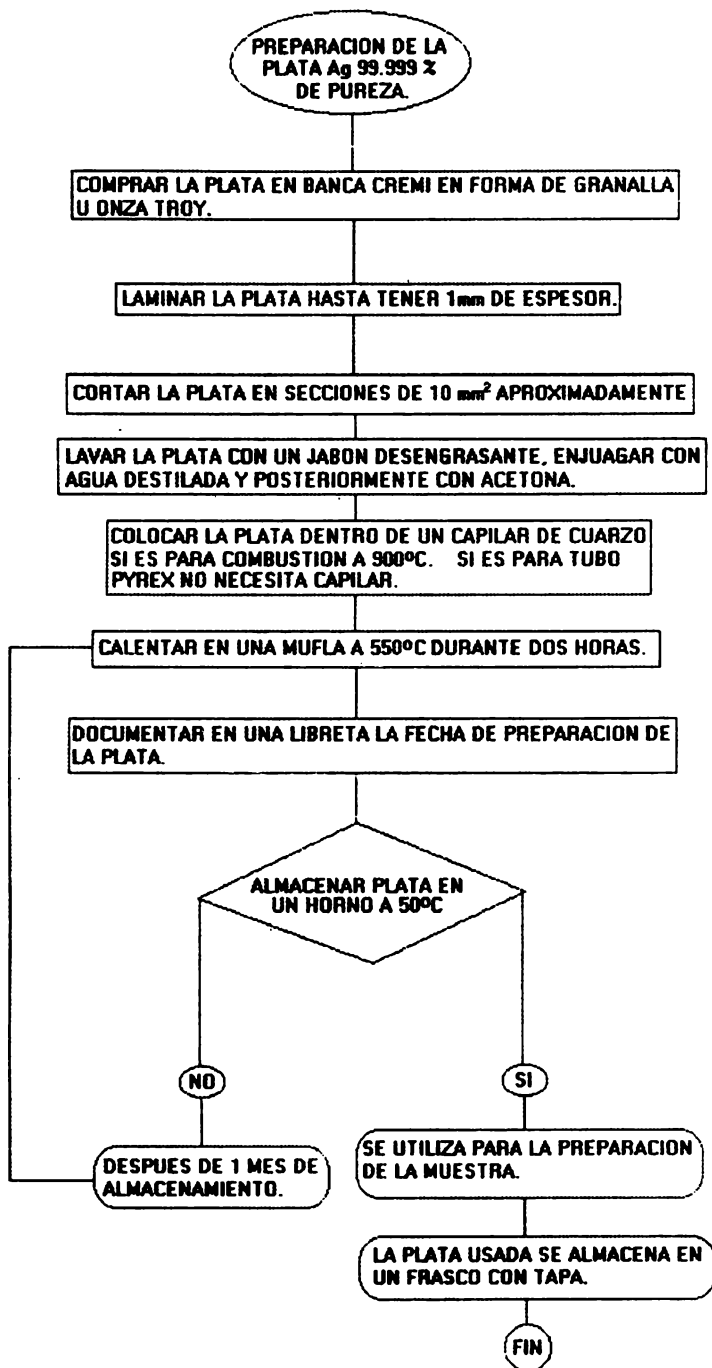
Se conecta el frasco reaccionador en la línea de purificación de muestra (Fig. 13) a través de las válvulas 7, 6 y 5 abiertas, una vez que se tiene un vacío de 10⁻² torr se extrae el CO₂ y agua a través de la válvula de paso con nitrógeno líquido (-190°C) y se congela en el dedo frío 8. Se cierra la válvula de paso hacia el frasco reaccionador y las válvulas 7, el aire líquido es cambiado por mezcla frigorífica (hielo seco-alcohol) (-80°C), lo cual permite congelar el agua y descongelar el CO₂ de la reacción, posteriormente el CO₂ se congela con nitrógeno líquido en los frascos contenedores a través de las válvulas 5, 10 y 11 para efectuar la medida de la $\delta^{13}C$ y la $\delta^{18}O$ en el espectrómetro de masas.

II.7 Diagramas de Flujo de los Métodos utilizadas para este trabajo.

A continuación se presentan los diagramas de flujo de las siguientes técnicas:

- a) Método para determinar la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ en muestras orgánicas.
(IFUNAM.C13.ORG.)
- b) Método de precipitación directa.
- c) Método de diálisis - precipitación.
- d) Método para determinar la $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ y la $\delta^{18}\text{O}_{\text{PDB}}$ en carbonatos.
(IFUNAM.C13.CA.)





PREPARACION TUBOS DE COMBUSTION

CORTAR EL TUBO (1.5 m) EN 3 SECCIONES Y MARCAR EL CENTRO YA SEA TUBO DE PYREX O DE CUARZO. SI EL TUBO ES CAPILAR SE CORTA EN SECCIONES DE 3 cm. APROXIMADAMENTE

SELLAR CON SOPLETE CADA SECCION EN LA PARTE CENTRAL

CALENTAR EN UNA MUFLA A 550°C DURANTE DOS HORAS Y DEJAR ENFRIAR LENTAMENTE A TEMPERATURA AMBIENTE SIN ABRIR LA MUFLA.

COLOCAR APROXIMADAMENTE 3 gr. DE CuO

COLOCAR LA PLATA EN EL TUBO DE PYREX. SI ES TUBO DE CUARZO COLOCAR LA PLATA DENTRO DE UN CAPILAR DE CUARZO.

CALENTAR EN UNA MUFLA A 550°C DURANTE DOS HORAS Y DEJAR ENFRIAR LENTAMENTE A TEMPERATURA AMBIENTE SIN ABRIR LA MUFLA.

DOCUMENTAR EN UNA LIBRETA LA FECHA DE PREPARACION DE LOS TUBOS.

ALMACENAR TUBOS EN UN HORNO A 50°C

NO

DEPUES DE 1 MES DE ALMACENAMIENTO.

SI

SE UTILIZAN PARA LA PREPARACION DE LA MUESTRA.

LOS TUBOS USADOS SE OBSEQUIAN A LA FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

FIN

**PREPARACION DE MUESTRAS
TECNICA IFUNAM.C13. ORG.**

TOMAR UN TUBO DE COMBUSTION DEL HORNO QUE SE ENCUENTRA A 50°C

PESAR 25 mg. DE MUESTRA SOLIDA O 20 µl DE MUESTRA LIQUIDA EN UN CAPILAR, COLOCAR LA MUESTRA EN UN TUBO DE COMBUSTION Y ETIQUETAR CON SU CLAVE CORRESPONDIENTE.

SI EL TUBO DE COMBUSTION ES DE CUARZO, DESPUES DE COLOCAR LA MUESTRA, COLOCAR UN TUBO PEQUEÑO Y ADICIONAR 3 gr. DE Cu^0

CONECTAR EL TUBO DE COMBUSTION A LA LINEA DE VACIO Fig. 12 MEDIANTE UNIONES SWAGELOK.

SI LA MUESTRA ES LIQUIDA, CONGELAR EL TUBO DE COMBUSTION CON NITROGENO LIQUIDO.

HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO, CUANDO EL MEDIDOR DE VACIO LLEGA A 10^{-3} mbar. PROCEDER A SELLAR EL TUBO DE COMBUSTION CON UN SOPLETE

COLOCAR LOS TUBOS DE COMBUSTION EN LA MUFLA, SIGUIENDO UN ORDEN COMO SE MUESTRA EN LA Fig. 15.

TUBO DE COMBUSTION CUARZO

CALENTAR A 900°C DURANTE 2 HORAS. BAJAR LA TEMPERATURA LENTAMENTE A 650°C Y MANTENER TEMPERATURA 1 HORA MAS.

TUBO DE COMBUSTION PYREX

CALENTAR A 550°C DURANTE 2 HORAS.

APAGAR LA MUFLA Y DEJAR ENFRIAR LAS MUESTRAS LENTAMENTE

ABRIR LA MUFLA Y VERIFICAR QUE LOS TUBOS DE COMBUSTION SE ENCUENTREN EN ORDEN Y COMPLETOS.

**TUBO DE
COMBUSTION**

NO

TUBO DE COMBUSTION ROTO

REPETIR TODO EL PROCEDIMIENTO

SI

PROCEDER A LA PURIFICACION DEL CO_2 DE LA MUESTRA.

FIN

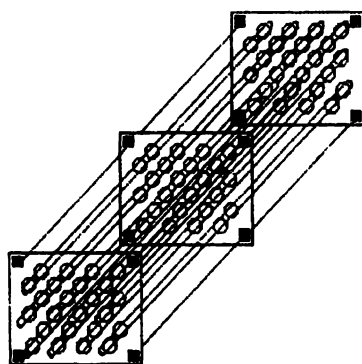
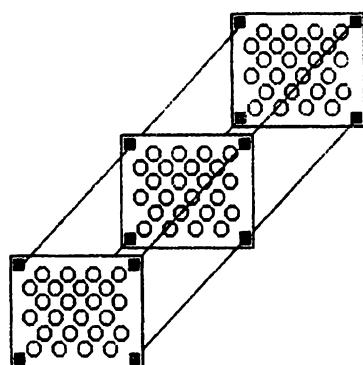


FIGURA 15

PURIFICACION DE CO₂
TECNICA IFUNAM.C13.ORG.

EL TUBO DE COMBUSTION ES MARCADO CON UN CORTADOR DE VIDRIO

CONECTAR EL TUBO DE COMBUSTION EN UN ROMPEDOR SWAGELOK CON UNION ULTRA TORR EN LA LINEA DE VACIO FIG. 13. SE PROCEDE DE LA MISMA FORMA HASTA COMPLETAR CINCO MUESTRAS.

ABRIR VALVULAS 7A, 6A, 5A, 10, 11 Y 1 PARA HACER PREVACIO. CERRAR VALVULA 1 Y ABRIR VALVULA 2 HASTA LLEGAR A UN VACIO DE 10^{-3} mbar.

CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y PROCEDER A ABRIR VALVULAS DE PASO DE LOS FRASCOS REACCIONADORES. POSTERIORMENTE COLOCAR EN LAS TRAMPAS 8 Y 9 NITROGENO LIQUIDO DURANTE 10'

DOCUMENTAR CLAVES DE LAS MUESTRAS Y VACIO DE CADA UNA DE ELLAS. EN LA FORMA IFUNAM F05.

VOLVER HA HACER VACIO A LAS MUESTRAS SI ASI LO REQUIEREN, ABRRIENDO LAS VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E. HACIENDO PREVACIO Y VACIO MEDIO. CERRAR VALVULAS 7A, 7B, 7C, 7D, 7E. RETIRAR DE LA LINEA LOS TUBOS CON EL ROMPEDOR. CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y QUITAR EN NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 Y DESCONGELAR.

CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 8 POR MEZCLA FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 9, DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05 Y HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO A LAS MUESTRAS QUE LO REQUIERAN HASTA 10^{-3} mbar.

CERRAR VALVULAS 6A, 6B, 6C, 6D, 6E Y RETIRAR LA MEZCLA FRIGORIFICA DE LA TRAMPA 8, CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 POR MEZCLA FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

CERRAR VALVULA 11, COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 12, VERIFICAR QUE LAS VALVULAS 1 Y 2 SE ENCUENTREN CERRADAS Y ABRIR LA VALVULA 5A. Y DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05.

CERRAR VALVULA 10, RETIRAR EL NITROGENO LIQUIDO Y DESCONGELAR EL CO₂. DOCUMENTAR LA PRESION EN LA FORMA IFUNAM F05.

**PRESION MAYOR DE
300 militorr**

NO

DESHECHAR LA MUESTRA ABRRIENDO LAS VALVULAS 10, 11, 1 Y POSTERIORMENTE LA 2.

CALCULAR LA CANTIDAD DE MATERIA QUE SE REQUIERE PARA TENER LA PRESION REQUERIDA Y REPETIR TODO EL PROCEDIMIENTO.

SI

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA VALVULA CONTENEDORA 1, ABRIR LA VALVULA 11. DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05.

ABRIR VALVULA 10, SI SE REQUIERE HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO HASTA CERRAR VALVULA DE PASO DEL FRASCO CONTENEDOR. REPETIR ESTOS PASOS PARA CADA UNA DE LA 4 MUESTRAS RESTANTES.

FIN

UNA VEZ QUE SE TIENEN LA 5 MUESTRAS EN LOS FRASCOS CONTENEDORES CON SUS CLAVES, SE CIERRA LA VALVULA 11 Y SON COLOCADAS EN LA UNIDAD BLV DEL ESPECTRO METRO DE MASAS PARA SU ANALISIS.

**METODO DE DIALISIS - PRECIPITACION
DE LA PROTEINA CONTENIDA EN MIEL
DE ABEJA.**

MIEL SEMISOLIDA. CALENTAR EN BAÑO A 60°C SIN EXCEDER 77°C
ó 30 SEGUNDOS EN HORNO DE MICROONDAS.

PESAR 20 gr. DE MIEL DE ABEJA EN UNA JERINGA Y AGREGAR 4 ml.
DE AGUA.

COLOCAR LA MEMBRANA DE CELULOSA PARA DIALISIS EN AGUA.
HACER UN NUDO EN UN EXTREMO, ABRIR LA MEMBRANA Y COLOCAR
LA MUESTRA DE MIEL DE ABEJA, AGREGAR MAS AGUA Y CERRAR CON
OTRO NUDO.

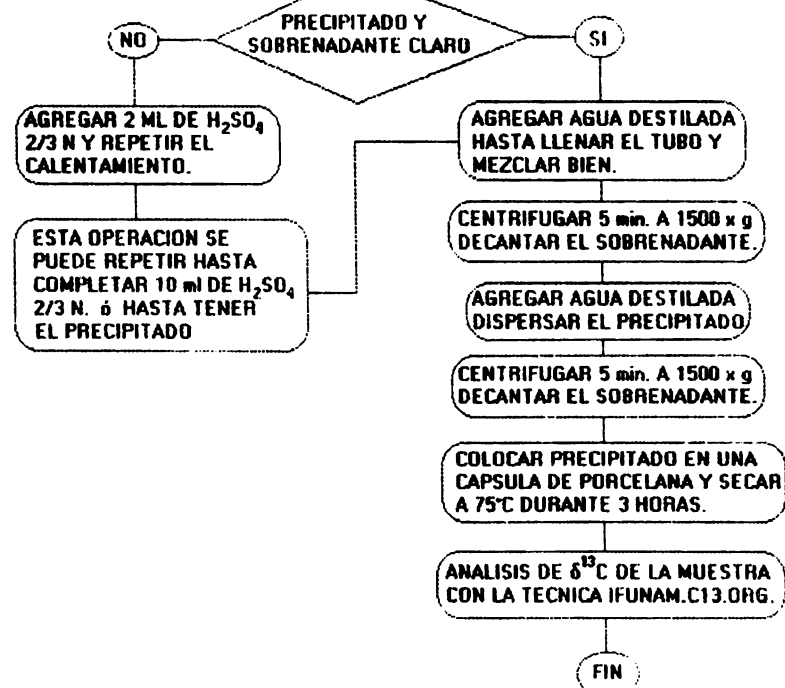
DEJAR LA MEMBRANA EN UN RECIPIENTE CON AGUA CORRIENTE
DURANTE 16 HORAS COMO MINIMO.

TRANSFERIR CONTENIDO DE LA MEMBRANA A UN TUBO DE CENTRIFUGA
CENTRIFUGAR DURANTE 5 min. A 1500 x g.

DECANTAR EL SOBRENADANTE EN UN VASO DE PRECIPITADOS Y
DESECHAR EL PRECIPITADO.

EN UN MATRAZ DE 25 ml. COLOCAR: 10 ml. DE TUNGSTANATO DE SODIO
AL 10% Y 10 ml. DE H_2SO_4 2/3 N. MEZCLAR BIEN Y ADICIONAR AL
VASO DE PRECIPITADOS.

COLOCAR EL VASO DE PRECIPITADOS EN UNA PARRILLA A 80°C CON AGITACION



PREPARACION DE MUESTRAS
TECNICA IFUNAM.C13.CA.

PESAR 40 A 70 mg DE CARBONATO EN EL FRASCO REACCIONADOR.
COLOCAR 10 mL DE AC. FOSFORICO 100% EN EL DEDO LATERAL

VERIFICAR QUE LA VALVULA DE PASO SE ENCUENTRE CERRADA.

CONECTAR EL FRASCO REACCIONADOR A LA LINEA DE VACIO Fig.13
DE LA MISMA FORMA HASTA COMPLETAR 5 MUESTRAS.

AC. FOSFORICO 100%
CAE EN CARBONATO.

SI

NO

REPETIR EL PROCEDIMIENTO

ABRIR VALVULAS DE PASO, 7A, 6A, 5A, 10, 11, 4 Y 1 PARA HACER PREVACIO.
CERRAR VALVULA 1 Y ABRIR VALVULA 2. HASTA LLEGAR A UN VACIO DE
 10^{-3} mbar. CERRAR VALVULAS DE PASO.

DESCONECTAR LOS FRASCOS REACCIONADORES DE LA LINEA DE VACIO
Fig. 13 Y TRASLADARLOS AL BAÑO A 25° C. ESPERAR 1 HORA. VOLTEAR
EL FRASCO REACCIONADOR PARA QUE EL AC. FOSFORICO 100% SE MEZCLE
CON EL CARBONATO.

DEJAR LOS FRASCOS REACCIONADORES DURANTE TODA LA NOCHE
A 25° C.

DE LA MISMA FORMA SE PROCEDE A PREPARAR OTRAS MUESTRAS. PARA
CADA LOTE DE MUESTRAS (DIA), SE INTRODUCEN 2 PATRONES INTERNOS.
AL TERMINAR, SE DEJA LA LINEA AL VACIO.

AL SIGUIENTE DIA SE PROCEDE A PURIFICAR EL CO₂

FIN

**PURIFICACION DE CO₂
TECNICA IFUNAM.C13.CA.**

CONECTAR EL FRASCO REACCIONADOR EN LA LINEA DE VACIO No. 2 DE LA FIG.13 Y DOCUMENTAR EN LA FORMA IFUNAM F05, LA CLAVE, CANTIDAD Y TEMPERATURA DE LA MUESTRA. SE PROCEDE DE LA MISMA FORMA HASTA COMPLETAR CINCO MUESTRAS

ABRIR VALVULAS 7A, 6A, 5A, 10, 11 Y 1 PARA HACER PREVACIO. CERRAR VALVULA 1 Y ABRIR VALVULA 2 HASTA LLEGAR A UN VACIO DE 10^{-3} mbar.

CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y PROCEDER A ABRIR VALVULAS DE PASO DE LOS FRASCOS REACCIONADORES, POSTERIORMENTE COLOCAR EN LAS TRAMPAS 8 Y 9 NITROGENO LIQUIDO DURANTE 10'

DOCUMENTAR CLAVES DE LAS MUESTRAS Y VACIO DE CADA UNA DE ELLAS. EN LA FORMA IFUNAM F05.

VOLVER HA HACER VACIO A LAS MUESTRAS SI ASI LO REQUIEREN, ABRRIENDO LAS VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E. HACIENDO PREVACIO Y VACIO MEDIO. CERRAR VALVULAS 7A, 7B, 7C, 7D, 7E. RETIRAR DE LA LINEA LOS TUBOS CON EL ROMPEDOR. CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y QUITAR EN NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 Y DESCONGELAR.

CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 8 POR MEZCLA FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 9, DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05 Y HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO A LAS MUESTRAS QUE LO REQUIERAN HASTA 10^{-3} mbar.

CERRAR VALVULAS 6A, 6B, 6C, 6D, 6E Y RETIRAR LA MEZCLA FRIGORIFICA DE LA TRAMPA 8, CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 POR MEZCLA FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

CERRAR VALVULA 11, COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 12, VERIFICAR QUE LAS VALVULAS 1 Y 2 SE ENCUENTREN CERRADAS Y ABRIR LA VALVULA 5A. Y DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05.

CERRAR VALVULA 10, RETIRAR EL NITROGENO LIQUIDO Y DESCONGELAR EL CO₂ DOCUMENTAR LA PRESION EN LA FORMA IFUNAM F05.

PRESION MAYOR DE
300 militorr

NO

DESHECHAR LA MUESTRA ABRRIENDO LAS VALVULAS 10, 11, 1 Y POSTERIORMENTE LA 2.

CALCULAR LA CANTIDAD DE MATERIA QUE SE REQUIERE PARA TENER LA PRESION REQUERIDA Y REPETIR TODO EL PROCEDIMIENTO.

SI

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA VALVULA CONTENEDORA 1, ABRIR LA VALVULA 11. DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05.

ABRIR VALVULA 10, SI SE REQUIERE HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO HASTA CERRAR VALVULA DE PASO DEL FRASCO CONTENEDOR. REPETIR ESTOS PASOS PARA CADA UNA DE LA 4 MUESTRAS RESTANTES.

FIN

UNA VEZ QUE SE TIENEN LAS 5 MUESTRAS EN LOS FRASCOS CONTENEDORES CON SUS CLAVES, SE CIERRA LA VALVULA 11 Y SON COLOCADAS EN LA UNIDAD BLV DEL ESPECTRO METRO DE MASAS PARA SU ANALISIS.