

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio Electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Joaquín Preza De la Vega

MÉXICO, D.F.

AÑO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS

Vocal Prof. ANA ADELA SÁNCHEZ MENDOZA

Secretario Prof. MARÍA DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA.

1er. Suplente Prof. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS

2do. Suplente Prof. RUTH ESTHER VILLANUEVA ESTRADA

Sitio en donde se desarrolló el tema: Laboratorio 114, Electroquímica Analítica de DEPg, Edificio B, Facultad de Química. Ciudad Universitaria. México, Distrito Federal.

Asesor del tema

Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas

Supervisor técnico

Q. Selma Sonia Sosa Sevilla

Sustentante

Joaquín Preza De la Vega

Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo de la Cátedra Raúl Cetina Rosado, otorgada por el Colegio de Profesores de la facultad de Química en julio de 2004.

Agradecemos el apoyo otorgado.

Agradecimientos

Dedico con cariño este trabajo a mi madre Leonila por su amor y comprensión y a mi padre Romualdo por su ejemplo y apoyo.

A mi abuela que es ejemplo de constante superación, de sabiduría y prudencia.

El apoyo y conocimiento brindado por el Dr. Octavio Reyes Salas.

La constante ayuda, alegría, ánimos e invaluable ayuda de la Dra. María Antonia Dosal Gómez.

La supervisión, apoyo y disposición constante e infalible de la maestra Selma S. Sosa Sevilla.

La ayuda brindada por la maestra Norma E. Gascón Orta en momentos de duda.

La camaradería de Gilberto Arreguín y Carlos A. Cárdenas que hizo la estancia en el laboratorio una extensión de mi hogar.

A mi tío Alberto a mi tía Lucía, Natalia, Mariana y Jesús por todo
su cariño.

A los maestros Mauro Cruz, Antonio Reyes y Jaime Noriega por su
compañía, amistad y buen humor.

A Sara por la confianza y cariño.

Índice general	Página
Índice general.	I
Índice de figuras.	V
Índice de tablas.	IX
1 Introducción	1
1.1. Introducción	2
2 Antecedentes	3
2.1. Generalidades.	4
2.2. Miel de abeja	5
2.2.1. Apicultura	5
2.2.2. Historia de la apicultura.	6
2.2.3. Clasificación de la miel	9
2.2.4. Producción de miel en México	10
2.2.5 Exportación de miel	11
2.3. Composición general de la miel	13
2.4. Importancia de los hidrato de carbono	15
2.4.1. Definición de hidrato de carbono	15
2.5. Química de los hidratos de carbono	16
2.6. Identificación de hidratos de carbono	18

Índice general	Página
2.6.1. Reacción de Fehling	18
2.6.2. Reacción de Tollens	19
3 Justificación	20
3.1 Justificación	21
3.2. Objetivos	22
3.2.1. Objetivo general:	22
3.2.2. Objetivos particulares:	22
4 Parte experimental	23
4.1 Material	24
4.1.1. Reactivos	24
4.1.2. Muestras de miel	25
4.1.3. Equipo	26
4.1.4. Material de uso común en el laboratorio	26
4.2 Metodología	27
4.2.1.- Cuantificación de hidratos de carbono reductores totales	29
4.2.2. Estudio electroquímico de hidratos de carbono.	31
4.2.3.-Cuantificación directa de fructosa por electroquímica	31
(voltamperometría).	
4.2.4.-Cuantificación de azúcares en miel	31
4.2.5.-Cuantificación de HMF en miel	32
4.2.6.-Estudios adicionales en miel	32
4.2.6.1. Humedad	32
4.2.6.2. Cenizas	33
4.2.6.3. pH	33

Índice general	Página
5 Resultados y discusión.	35
5.1. Cuantificación de hidratos de carbono reductores totales.	35
5.1.1. Normalización de CuSO_4 con EDTA (Y^{4-})	35
5.1.2. Estudio estequiométrico de la reacción entre hidratos de carbono y el reactivo de Fehling.	36
5.1.3. Curvas de muestras de miel.	43
5.2. Estudio electroquímico de hidratos de carbono.	44
5.3.- Cuantificación de hidratos de carbono reductores.	44
5.3.1. Resultados de linealidad de voltamperogramas	44
5.3.1.1. Fructosa.	47
5.3.1.2. Glucosa.	48
5.3.2. Determinación inversa de hidratos de carbono en presencia de un agente oxidante .	49
5.4.-Cuantificación de azúcares en miel.	52
5.4.1. Determinación de carbohidratos directos en CaCl_2	52
5.5.-Cuantificación de HMF en miel de abeja.	58
5.6.-Estudios adicionales en miel de abeja.	61
5.6.1. Humedad.	61
5.6.2. Por ciento de cenizas.	62
5.6.3. pH.	62
5.7. Tabla de resultados finales globales.	64

Índice general	Página
6 Conclusiones.	66
6.1. Conclusiones.	67
6.2. Perspectivas	69
7 Bibliografía	70
7.1 Bibliografía	71
8 Anexos	74
A. Electroquímica Analítica	75
B. Ficha fisicoquímica de HMF	77
C. Fichas fisicoquímicas de carbohidratos	79
D. Pruebas a la gota	80
E. Disoluciones.	82
F Cotizaciones	83

Índice de	figuras	6
Figura 1.	Pintura rupestre encontrada en la Cueva de la Araña en España.	8
Figura 2.	Representación de Ah Muzencab, el dios abeja.	16
Figura 3.	Representación de la D-glucosa por medio de la proyección de Fisher y la D-glucopiranososa por la proyección de Haworth.	17
Figura 4.	Carácter α , β de glucoaldosa en disolución	18
Figura 5.	Mutarrotación y formación del enlace acetal en la D-Glucosa.	19
Figura 6.	Reacción de Fehling.	19
Figura 7.	Reacción de Tollens.	20
Figura 8.	Reacción de formación de espejo de plata.	35
Figura 9.	Valoración potenciométrica de disolución "A" del reactivo de Fehling (alícuota de 5mL) con EDTA [0.0989 M] a temperatura ambiente con electrodo de Cu^0 y Ag/AgCl/KCl como referencia.	37
Figura 10.	Valoración potenciométrica con volumen (mL) de fructosa [4.5×10^{-2} M] gastado para 25 mL de reactivo de Fehling (3.5 mmol de Cu^{II+} presentes) a 93 °C con electrodo de Cu^0 y ECS como referencia.	37
Figura 11	Valoración potenciométrica con la cantidad (mmol) de fructosa [4.5×10^{-2} M] gastada con 25 mL de reactivo de Fehling (3.5 mmol de Cu^{II+} presentes) a ebullición con electrodo de Cu^0 y ECS como referencia.	
Figura 12.	Relación de gasto de fructosa contra cobre presente de la valoración potenciométrica de fructosa [4.5×10^{-2} M] gastada con 25mL de reactivo de Fehling a ebullición con electrodo de Cu^0 y ECS como referencia.	38
Figura 13.	Valoración potenciométrica con volumen (mL) de fructosa [0.09 M] gastado para 10 mL de reactivo de Fehling (1.032mmol de Cu^{II+} presentes) a 85 °C con electrodo de Cu^0 y Ag/AgCl/KCl como referencia.	39
Figura 14.	Valoración potenciométrica con cantidad agregada (mmol) de fructosa [0.09 M] gastado para 10 mL de reactivo de Fehling (1.032mmol de Cu^{II+} presentes) a 85 °C con electrodo de Cu^0 y Ag/AgCl/KCl como referencia.	39

Índice de figuras	Página	
Figura 15	Primera derivada de la valoración potenciométrica de fructosa [0.09 M] con reactivo de Fehling (1.032mmol de Cu^{II} presentes) a 85 °C con electrodo de Cu^0 y Ag/AgCl/KCl como referencia.	40
Figura16	Relación de gasto de fructosa contra cobre presente de la valoración potenciométrica de fructosa [0.09 M] gastada con 10 de reactivo de Fehling a ebullición con electrodo de Cu^0 y Ag/AgCl/KCl como referencia.	40
Figura 17	Potenciogramas de dos mieles: muestra 6 ($0.015 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y muestra 8 ($0.011 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con la cantidad gastada de miel con 10 mL de reactivo de Fehling (3.5mmol de Cu^{II} presentes) a 85 °C con electrodo de Cu^0 y Ag/AgCl/KCl como referencia.	43
Figura 18.	Voltamperogramas diferencial de impulsos de adiciones de fructosa [0.1 M] en zona de oxidación en 20 mL de sal de la Rochelle [0.1 M] a temperatura ambiente (velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ con EDG_{Au} impulso 25 mV y ECS como referencia).	45
Figura 19.	Curva de calibración de oxidación de fructosa [0.1 M] en 20 mL de sal de la Rochelle (tartrato de sodio y potasio) [0.1 M] por polarografía diferencial de impulsos en 310 mV con una velocidad de $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$: EDG_{Au} /ECS).	45
Figura 20.	Polarogramas diferencial de impulsos (DPP) de adiciones de fructosa [0.1 M] en zona de reducción en 20 mL de LiClO_4 [0.1 M] a temperatura ambiente (velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -25 mV y ECS como referencia).	46
Figura 21.	Curva de calibración de reducción de fructosa [0.1 M] en zona de reduccción en 20 mL de LiClO_4 [0.1 M] a temperatura ambiente (DPP en -1.75 mV a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ EGM/ECS).	46
Figura 22.	Voltamperogramas diferencial de impulsos de fructosa [0.1 M] en zona de oxidación en 75 mL de LiClO_4 [0.1 M] a temperatura ambiente (EDG_{Au} /ECS en 825 mV, velocidad de barrido $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$: impulso 50 mV).	47

Índice de	figuras	Página
Figura 23	Curva de calibración de la voltamperometría de impulsos diferenciales de fructosa en zona de oxidación en 75mL de LiClO ₄) (velocidad de barrido a 4 mV·s ⁻¹ : EDG _{Au} /ECS, impulso 50 mV) en 825 mV.	47
Figura 24	Polarogramas diferencial de impulsos (DPP) de glucosa [0.1 M] en 20 mL de LiClO ₄ [0.1 M] a 60 °C (EGM/ECS DPP, velocidad de barrido 4 mV·s ⁻¹ , impulso -25 mV).	48
Figura 25.	Curva de calibración de glucosa [0.1 M] en 20 mL de tartrato de sodio y potasio [0.1M]. con impulso de 50 mV (DPP) en -300 mV.	48
Figura 26.	Voltamperogramas de la reducción de Fe ^{III+} a Fe ^{II+} por adiciones de K ₃ Fe(CN) ₆ [0.1 M] en 25 mL de H ₂ SO ₄ [0.5 M] (EDG _{Au} /ECS velocidad de barrido a 4 mV·s ⁻¹).	49
Figura 27.	Curvas voltamperométricas para la valoración inversa de fructosa a la disolución con Fe ^{III+} . Disminución de la señal de reducción de Fe ^{III+} a Fe ^{II+} por adiciones de fructosa [0.1 M] en 25 mL de H ₂ SO ₄ [0.5 M] (EDG _{Au} /ECS velocidad de barrido a 4 mV·s ⁻¹).	50
Figura 28.	Curva de calibración de Fe ^{III} a temperatura ambiente en 25 mL de H ₂ SO ₄ [0.5 M] (EDG _{Au} /ECS velocidad de barrido a 4 mV·s ⁻¹).	50
Figura 29.	Curva de calibración de reducción de Fe ^{III+} a Fe ^{II+} con adiciones de fructosa [0.001 M] a temperatura ambiente en 25mL de H ₂ SO ₄ [0.5 M] (EDG _{Au} /ECS velocidad de barrido a 4 mV·s ⁻¹).	51
Figura 30.	Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de adiciones de fructosa [0.1 M] en 8 mL de CaCl ₂ [1 M] a temperatura ambiente, velocidad de barrido 2 mV·s ⁻¹ , impulso -50 mV y Ag/AgCl/KCl como referencia.	53
Figura 31.	Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de adiciones de glucosa [0.1 M] en 8 mL de CaCl ₂ [1 M] y 0.25 mL de fructosa [0.1M] presente a temperatura ambiente, velocidad de barrido 2 mV·s ⁻¹ , impulso -50 mV y Ag/AgCl/KCl como referencia.	54

Índice de figuras	Página
Figura 32	55
<p>Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de miel (muestra 6, 0.0497 mg·μL⁻¹) en 8 mL de CaCl₂ [1 M] a temperatura ambiente, velocidad de barrido 2 mV·s⁻¹, impulso -50 mV y Ag/AgCl/KCl como referencia</p>	
Figura 33.	56
<p>Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de fructosa [0.1 M] en miel (muestra 6, 0.0497 mg·μL⁻¹) por el método de adiciones patrón en 8 mL de CaCl₂ [1 M] a temperatura ambiente, velocidad de barrido 2 mV·s⁻¹, impulso -50 mV y Ag/AgCl/KCl como referencia.</p>	
Figura 34.	57
<p>Curva de calibración de los polarogramas de impulsos diferenciales de miel (muestra 6, 0.0497 g·mL⁻¹) con fructosa [0.1 M] por adiciones patrón.</p>	
Figura 35.	59
<p>Polarogramas diferencial de impulsos para la determinación de HMF en miel (muestra 5, 0.501 g·mL⁻¹) por adiciones patrón de HMF [0.01 M] en 8 mL de disolución amortiguadora de boratos a pH = 9, velocidad de barrido 2 mV·s⁻¹ impulso -50 mV y Ag/AgCl/KCl como referencia.</p>	
Figura 36	60
<p>Curva de calibración de los polarogramas de impulsos diferenciales de miel (muestra 5, 0.501 g·mL⁻¹) con HMF [0.01 M] por adiciones patrón.</p>	
Figura 37	77
<p>Estructura del HMF.</p>	

Índice de Tablas.	Página
Tabla 1. Estimación del Consumo Nacional Aparente (CNA) de miel de abeja para el periodo 1990-2005.	11
Tabla 2. Composición general de la miel.	13
Tabla 3. Hidratos de carbono mayoritarios en miel.	13
Tabla 4. Hidratos de carbono minoritarios en miel	14
Tabla 5. Listado de sustancias empleadas.	24
Tabla 6. Listado de muestras de miel.	25
Tabla 7. Resultados de la potenciometría de fructosa con reactivo de Fehling con fructosa para estequiometría de la reacción.	39
Tabla 8. Resultados de potenciometría del reactivo de Fehling (1.03 mmol de Cu^{II+}) con hidratos de carbono de alta pureza para estequiometría de la reacción.	41
Tabla 9. Análisis lineal para la curva de adiciones patrón en la determinación de fructosa en miel (muestra 6, $0.0497 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) CaCl_2 en muestra 6 de miel.	57
Tabla 10. Análisis de fructosa en muestra 6 de miel.	57
Tabla 11. Resultados de análisis de fructosa en muestras miel estudiadas.	58
Tabla 12. Análisis de HMF en muestra 5 de miel de abeja.	60
Tabla 13. Contenido de HMF en las muestras de miel de abeja estudiadas.	60
Tabla 14. Resultados de Brix y % de Humedad.	61
Tabla 15. Resultados de conductividad y % de Cenizas.	62
Tabla 16. Resultados de pH.	62
Tabla 17. Resultados de pruebas fisicoquímicas adicionales	63
Tabla 18. Resultados del estudio electroquímico de hidratos de carbono	64
Tabla 19. Especificaciones permitidas por NMX-F-036-1997 ALIMENTOS-MIEL-ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.	65

1

Introducción

1.1. Introducción

La miel de abeja es una sustancia dulce natural producida por las abejas mieleras y está compuesta principalmente de fructosa y glucosa. Por sus características sensoriales y físicas tiene aplicaciones versátiles en la industria de los alimentos que van desde su consumo directo hasta su procesamiento como ingrediente de varios productos alimentarios. La miel puede conservar sus cualidades por varios años; sin embargo, factores ambientales y de almacenamiento ocasionan la formación de 5-hidroxi metil-furfural (HMF), que aunque no hay un índice de toxicidad reportado, sí está identificado como producto de degradación de azúcares por calentamiento.

El precio de la miel de abeja es mucho mayor que el de otros productos edulcorantes como el azúcar de caña y el jarabe de maíz por ello su adulteración es una práctica frecuente. Por esta razón, varios países han puesto especificaciones y normas estrictas para su comercialización. En la actualidad las normas de calidad para la miel incluyen composición química y propiedades físicas específicas, que se realizan de manera rutinaria en pruebas de plataforma para su comercialización. No obstante, la mayoría de las técnicas disponibles son tardadas y requieren de un buen tratamiento de la muestra y habilidades analíticas.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos de estudios analíticos en miel para la cuantificación de los azúcares reductores presentes, determinados por el método de Fehling-Sohxlet y por técnicas electroquímicas como la polarografía clásica, de impulsos diferenciales y voltamperometría con electrodos sólidos giratorios.

2

Antecedentes

2.1. Generalidades.

Para la dieta de los seres humanos, los hidratos de carbono son la base de la alimentación, pues proveen la principal fuente energética en la ingesta diaria y la fibra que favorece el buen funcionamiento gástrico e intestinal.

Desde que se tiene memoria para mujeres y hombres de casi todas las culturas, el sabor dulce es apreciado. En muchas culturas, el finalizar una comida esta marcado con la degustación de algún alimento dulce. Su función social está asociada a lazos de amistad, situaciones agradables y recuerdos placenteros.

Existen frases figurativas familiares alusivas a la miel tales como: “Dejar con la miel en los labios” para indicar que se priva de lo que se empezaba a gustar y disfrutar. “Hacerse de miel” para aludir a portarse más blanda y suavemente de lo que conviene. “Miel sobre hojuelas”; se usa para expresar que una cosa viene o recae muy bien sobre otra, o le añade nuevo realce. “Quedarse a media miel” es empezar a gustar un manjar o satisfacer un deseo, y verse repentinamente interrumpido antes de quedarse satisfecho, también es no poder oír o entender sino a medias una conversación, canto o discurso interesante. “Ser de mieles” es ser muy gustoso, suave, dulce y deleitable. “Vender miel al colmenero” se dice del que vende sus géneros al que está sobrado de ellos, o pretende dar noticias a quién está mejor enterado que él.

Claramente las connotaciones mencionadas anteriormente con la miel están relacionadas con el placer que produce consumirla y degustarla.

La miel, en particular, es una mezcla que va desde un color dorado translúcido a un café opaco, puede ser líquida o sólida y tiene como componente principal carbohidratos que provienen del néctar de las flores y es tratado con enzimas presentes en el cuerpo de las abejas.

2.2. Miel de abeja.

En la norma oficial mexicana (NOM-145-SCFI-2001) la miel la definen como: “La sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones o de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales, de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición”¹.

La miel la define la Real Academia Española de la Lengua como “Una sustancia viscosa amarillenta y muy dulce, que producen las abejas transformándolo en su estómago el jugo de las flores, y devolviéndolo por la boca para llenar con él los paneles y que sirva de alimento a las crías”².

CODEX ALIMENTARIUS presenta una definición similar.

2.2.1. Apicultura.³

La apicultura o el cultivo de abejas es una actividad agropecuaria orientada a criar abejas y prestarles los cuidados necesarios con el objeto de obtener los productos que son capaces de elaborar y recolectar con el fin de satisfacer las necesidades que el hombre tiene de éstos. El principal producto que obtiene el hombre en esta actividad es la miel. Un beneficio indirecto de la actividad de pecoreo (que es la conducta de las abejas obreras que recolectan polen y néctar de la flora apícola de un determinado lugar geográfico) que realizan las abejas corresponde a la polinización que realizan estos insectos. El cultivo similar de otras abejas productoras de miel (melipónidos) se denomina meliponicultura.

¹ Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001, Información comercial-Etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones. Diario Oficial, p3, 23 de abril 2001.

² Real Academia Española. *Diccionario de la Lengua Española*. 20ª ed. Espasa-Calpe. España. Vol. II p.907 (1984)

³ <http://es.wikipedia.org/wiki/Apicultura>

2.2.2. Historia de la apicultura.

En las pinturas rupestres del mesolítico presentes en la Cueva de la Araña, en la localidad de Bicorp en Valencia, España hay escenas de la recolección de la miel; si bien es difícil determinar su origen, se calcula que estas pinturas podrían tener entre 7000 y 8000 años de antigüedad. En el Mesolítico, 10.000 a 5.000 años a.C., el hombre comienza la recolección de miel de colmenas silvestres y en el Neolítico se piensa que fue cuando aprendió a controlar las abejas y enjambres.



Figura 1. Pintura rupestre encontrada en la Cueva de la Araña en España.

Existen datos históricos que señalan la existencia de prácticas apícolas antes de la época de los egipcios, los cuales trasladaban sus colmenas en embarcaciones a lo largo del río Nilo. Hay papiros que datan del año 2400 a.C. donde podemos observar esta práctica.

Los griegos, que fundan Éfeso en el año 1100-1000 a.C. en el Asia menor, en la antigua Anatolia hoy Turquía, veneraron la apicultura dado que la Diosa Artemisa era representada en las monedas con el cuño de una abeja en los años 480 a.C. En Tracia también fue muy

común el cuño de monedas con una abeja. Los romanos, también practicaron la apicultura y en general heredaron las prácticas helénicas e hicieron de ellas un objeto de culto. Los poetas geórgicos dedicaron obras a la descripción de los instintos, costumbres, inteligencia de las abejas y a la explotación racional de estos animales que nunca dejaron de sorprenderlos. En general, siempre en los relatos de las sociedades más avanzadas de todas las épocas, se han encontrado vestigios del conocimiento de las abejas y de la explotación racional de la miel y la cera.

En América se desarrolló la meliponicultura, pues el género *Apis* era inexistente antes del descubrimiento de América. Los géneros *Melipona* (abeja sin aguijón) y *Trigona* fueron descubiertos por los mesoamericanos teniendo especial desarrollo el género *Melipona*, principalmente por los mayas. Los historiadores describen la actividad apícola y el intenso cuidado de las abejas que tenían los mayas durante la colonia; asimismo resulta evidente que la meliponicultura en esa época estaba más extendida que la apicultura en cualquier país de Europa. Los mayas utilizaron la miel como el recurso principal en la fabricación del "balché", bebida que incluía además de la miel, corteza del balché (*Lonchocarpus longistylus* Pittier) y agua, que se utilizaba en festividades religiosas. El documento más antiguo sobre aspectos relacionados con la apicultura en la Península es el código Troano (de la era hispánica) en el cual hace mención a las festividades religiosas. Festejos similares fueron descritos por el obispo Diego de Landa, quien comenta que durante los meses de Tzec (Noviembre) y Mol (diciembre), los apicultores mayas celebraron fiestas dedicadas principalmente al dios Ah-Muzencab cuya imagen se muestra en la figura 2 (es el "dios descendente" y se halla representado en Cobá y Tulum (Quintana Roo), y en Sayil y Chichén Itzá (Yucatán), se le asocia con el dios de las abejas). Según algunas leyendas, Ah Muzencab, "el que cuida la miel" es, además, quien carga el cielo para asegurar un buen flujo de néctar, tan importante para lograr una buena cosecha de miel.



Figura 2. Representación de Ah Muzencab, el dios abeja.

En una visualización histórica podemos notar que el consumo de edulcorantes ha ido yendo en sentido terrenal, es decir, se comenzó con el consumo de extractos de frutas y miel (lo más aéreo) después con el consumo de jugo de tallo (azúcar de caña) después con la raíz (betabel y remolacha) y por último con extractos derivados del petróleo o de síntesis como sacarina o aspartame, por situar estos últimos de alguna manera.

La miel ha acompañado a la humanidad por su función edulcorante que es dada por los carbohidratos que contiene, de ahí la importancia de conocer las características de estos compuestos orgánicos.

2.2.3. Clasificación de la miel.

Según su origen botánico las mieles se dividen en:

- Miel monoflorales: En cuya composición predomina el néctar de una especie vegetal determinada (de entre las varias que la componen), de la cual toma el nombre y donde el polen de dicha especie debe ser predominante.
- Miel multiflorales: En su composición entra el néctar de varias especies vegetales sin que ninguna de ellas pueda considerarse predominante.
- Miel de mielada: No proceden del néctar de flores, sino de secreciones de otras partes vivas de la planta como las hojas o los frutos.

La Norma Mexicana NMX-F-036-1997 ALIMENTOS-MIEL-ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA establece que las mieles se pueden clasificar, de acuerdo a su presentación, como:

- Miel en Panal: Es la miel que no ha sido extraída de su almacén natural de cera y puede consumirse como tal.
- Miel Líquida: Es la miel que ha sido extraída de los panales y que se encuentra en estado líquido, sin presentar cristales visibles.
- Miel Cristalizada: Es la miel que se encuentra en estado sólido o semisólido granulado como resultado del fenómeno natural de cristalización de los azúcares que la constituyen.

La Norma Mexicana NMX-F-036-1997 ALIMENTOS-MIEL-ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA, también establece que la miel debe designarse con el nombre de la región geográfica, si ha sido producida exclusivamente en el área a que se refiere la denominación.

2.2.4. Producción de miel en México.

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

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

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

Durante el año 2000 el precio promedio de miel fue de 16,901 pesos la tonelada en miel sin procesar. En México se consumen en promedio 270 g de miel por persona al año, mientras que otros países tienen consumos superiores a un kilogramo por persona, lo que permite pensar en una futura expansión del mercado interno. Esta tendencia se incrementa como muestra la siguiente tabla donde ya no se importa miel y el consumo nacional de manera general aumenta y tiene en el 2001 un año record en consumo nacional.

Tabla.1 Estimación del Consumo Nacional Aparente (CNA⁴) de miel de abeja para el periodo 1990-2005⁵

Año	Composición en volumen (toneladas)				Composición porcentual (%)	
	Producción	Importaciones	Exportaciones	CNA	Producción*	Importaciones
1990	66,493.0	8.3	45,088.6	21,412.7	100.0	0.0
1991	69,495.0	14.8	50,088.5	19,421.3	99.9	0.1
1992	63,886.0	18.1	36,868.0	27,036.1	99.9	0.1
1993	61,373.0	15.1	34,949.6	26,438.5	99.9	0.1
1994	56,432.0	29.3	30,166.7	26,294.6	99.9	0.1
1995	47,255.0	7.1	25,649.5	21,612.6	100.0	0.0
1996	49,178.0	4.3	27,448.5	21,733.8	100.0	0.0
1997	53,681.0	6.8	22,681.2	31,006.6	100.0	0.0
1998	55,297.0	31.5	26,321.6	29,006.9	99.9	0.1
1999	55,323.0	36.1	19,838.0	35,521.1	99.9	0.1
2000	58,935.0	35.0	26,263.0	32,707.0	99.9	0.1
2001	59,069.0	144.8	19,209.0	40,004.8	99.6	0.4
2002	58,890.0	215.2	28,882.9	30,222.3	99.3	0.7
2003	57,045.0	173.3	22,161.3	35,057.0	99.5	0.5
2004	56,917.0	8.6	19,804.5	37,121.1	100.0	0.0
2005	50,631.4	2.4	18,846.4	31,787.4	100.0	0.0

Las autoridades gubernamentales han puesto a disposición del público general la siguiente información en folletos, manuales y revistas: Flora nectarífera y polinífera (editados por la Comisión Técnico Consultiva de Coeficientes de Agostadero, COTECOCA) de Chiapas y Michoacán; Manuales de Apicultura (Buenas Prácticas Apícolas y Básicos de Patología, cría de reinas, polinización, etc.), Manuales de Buenas Prácticas de Producción y Manufactura de productos ganaderos y NOTIABEJA, revista que cuenta con sus publicaciones en línea desde 1998 hasta el 2001.

2.2.5. Exportación de miel.

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

⁴ El Consumo Nacional Aparente es una forma de medir la cantidad de producto del que dispone un país para su consumo.

En esta estimación se considera la producción nacional y las importaciones miel, así como las exportaciones de miel

⁵ <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAmiel.htm>; última actualización: 15 de septiembre de 2006.

anuales durante el periodo de 1991 a 1995, con un valor de 1,007 dólares por tonelada.

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

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

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

Cabe mencionar que la miel mexicana tiene actualmente una ligera plusvalía en Europa con respecto a la miel argentina y más aún con respecto a la china. Desafortunadamente las exportaciones han disminuido los últimos tres años como puede verse en la tabla 1.

2.3. Composición general de la miel.⁶

La siguiente tabla de composición es una estimación general de las proporciones de algunos nutrimentos en la miel.

Tabla 2 Composición general de la miel

Componentes	En 100g de miel	Concentración
Energía	302 Kcal.	—
Hidratos de carbono	78 g	—
Proteínas totales	2.2 g	—
Agua	17 g	—
Grasas totales	0	—
Calcio	20 mg	200 ppm
Hierro	0.8 mg	8 ppm
Magnesio	3 mg	30 ppm
Sodio	5 mg	50 ppm
Potasio	51 mg	510 ppm
Ácido ascórbico	4 µg	40 ppb
Tiamina	0.01 µg	0.1 ppb
Riboflavina	0.07 µg	0.7 ppb
Niacina	0.2 µg	2.0 ppb

En cuanto a composición de carbohidratos, ésta es muy variable pues depende del origen botánico, cosecha, clima, etcétera. Cada cosecha tiene un perfil diferente. Aún así se ha reportado el siguiente análisis de carbohidratos presentes en la miel.

Tabla 3 Hidratos de carbono mayoritarios en miel.

Azúcar	Contenido (%)
Fructosa	27.3-44.3
Glucosa	22.0-40.8
Sacarosa	0.3-7.6
Otros azúcares	3.65

⁶ Instituto Nacional de la Nutrición (Chávez y colaboradores, 1992).

De ese 3.65% de hidratos de carbono diferentes a la glucosa, fructosa y sacarosa se han encontrado los siguientes hidratos de carbono (se expresan en porcentaje a partir del total de 3.65% de composición total de la miel).

Tabla 4 Hidratos de carbono minoritarios en miel⁷

	Azúcar	Contenido (%)
Oligosacáridos superiores	Isomaltotetraosa	0.33
	Maltosa	29.4
	Isomaltopentaosa	0.16
	Kojiibiosa	8.2
Disacáridos	Turanosa	4.7
	Isomaltosa	4.4
	Maltulosa	3.1
	Nigerosa	1.7
	Trehalosa	1.1
	Gentiobiosa	0.4
	Laminaribiosa	0.09
Trisacáridos	Erlosa	4.5
	Teanderosa	2.7
	Panosa	2.5
	Maltotriosa	1.9
	1-Cestosa	0.9
	Isomaltotriosa	0.6
	Meleztiosa	0.3
	Isopanosa	0.24
	Gentiosa	0.05
	3 - α -D-Isomaltosilglucosa	Trazas

En muy pequeñas cantidades, la miel también contiene algunas enzimas y hormonas. No puede darse una composición única de la miel ya como se ha mencionado, las particularidades de cada cosecha hace cada lote de producción diferente.

⁷ Belitz, H. Grosh, W. *Food Chemistry*. 2ªed. Springer. Alemania p 824 (1999)

2.4. Importancia de los hidratos de carbono

En el estudio de la materia viva, los compuestos orgánicos principales son las biomoléculas (hidratos de carbono, lípidos y proteínas). Los hidratos de carbono o carbohidratos son los más abundantes del planeta, en los alimentos y particularmente en la miel. Su principal función es ser una fuente energética. Los hidratos de carbono son sintetizados por los organismos autótrofos (los que sintetizan su propio alimento) a partir de energía luminosa que proviene del sol, del CO₂ atmosférico y H₂O por medio de la ruta metabólica conocida como fotosíntesis. Para los organismos heterótrofos (los que no sintetizan su propio alimento), es la principal fuente energética. Este aporte es de 4Kcal•g⁻¹. En la alimentación humana los hidratos de carbono se clasifican de acuerdo a su función: Los que tienen aporte calórico o energético (fructosa, lactosa) y los que no tienen aporte energético también llamados fibra y puede ser soluble (inulina, pectina) o insoluble (celulosa, lignina). En algunos países la dieta diaria tiene una base de 80% de carbohidratos.

2.4.1 Definición de hidrato de carbono

El nombre de hidratos de carbono proviene del análisis molecular en el que se encontró que por un átomo de carbono hay una molécula de agua; teniendo por fórmula general: C_n(H₂O)_n. La definición más reciente dice: "Los hidratos de carbono están formados tanto en sus derivados simples como poliméricos de polihidroxialdehidos, cetonas, alcoholes y ácidos unidos por un enlace del tipo acetal"⁸. En la naturaleza, los hidratos de carbono se encuentran de muy diversas formas como monosacáridos, oligosacáridos (2-20 unidades) o polisacáridos (más de 20 unidades).

⁸ Walstra, P. *Physical chemistry of foods* Dekker, EE.UU. pp. 807 (2003)

2.5. Química de los hidratos de carbono.

Existen dos familias de carbohidratos; la L y la D (D es dextrógiro; y L es levógiro). Estas series solamente difieren en un átomo de carbono que es en la orientación del grupo hidroxilo del penúltimo carbono de mayor numeración con respecto al grupo aldehído o cetona. Por ejemplo, para la glucosa (aldohexosa) de serie “L” tendrá el hidroxilo del lado izquierdo en el carbono número 5. El caso de la fructosa (cetopentosa) de la serie “D” estará el hidroxilo del lado derecho en el carbono número 5. Las representaciones más empleadas para los hidratos de carbono son las proyecciones de Fisher y Haworth. La primera es una representación de cadena lineal y se considera que es la estructura del estado cristalino. La segunda presenta la molécula como un heterociclo, ya sea como furanósido o piranósido y se considera que es la forma en que se encuentra en disolución como especie química reactiva.

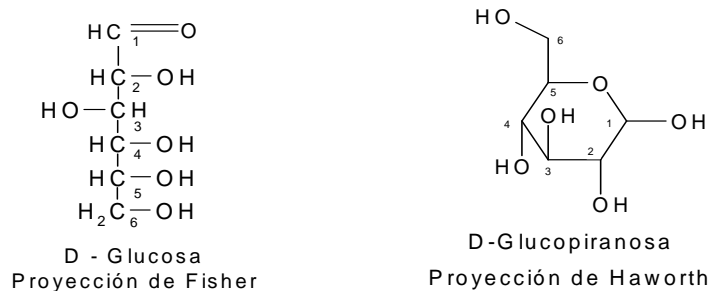


Figura 3. Representación de la D-glucosa por medio de la proyección de Fisher y la D-glucopiranososa por la proyección de Haworth.

A su vez, cuando los hidratos de carbono están en disolución pueden presentar diversas estructuras. Esto propicia un reacomodo intramolecular que resulta en la ciclización de la cadena abierta. Este mecanismo es muy dinámico y reversible, dependiente de las condiciones de la disolución y la temperatura; no importando si el carbohidrato disuelto es una aldosa o pentosa o si tiene carácter D o L.

Los hidratos de carbono presentan como particularidad la posición α o β que son dos formas quirales que dependen tanto de las condiciones energéticas como del ciclo que tiene el hidrato de carbono en disolución. Un hidrato de carbono es “ α ” cuando tiene el hidroxilo en

posición ecuatorial al plano del pirano o furano y la forma “ β ” presenta el hidroxilo en posición axial con respecto al plano de la molécula de pirano o de furano, según sea el caso.

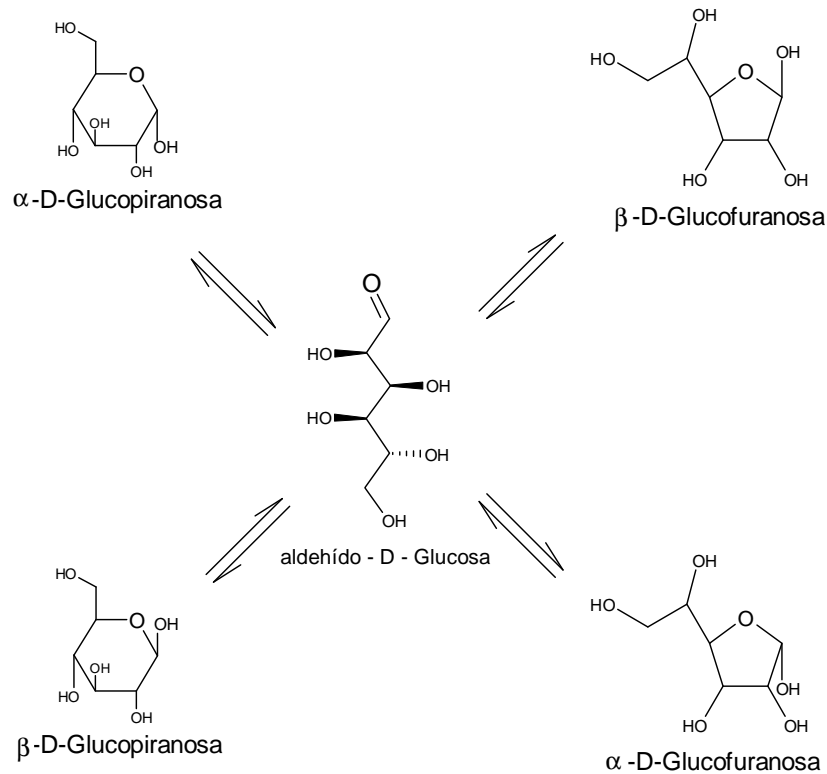


Figura 4.- Carácter α , β de glucoaldosa en disolución.

Tanto la posición α como la β , afectan la manera en que los carbohidratos interactúan entre sí incluida la torsión de la forma pirano, presentando un acomodo en disposición de “silla”, de “bote” o de “sobre”, formando una gran variedad de uniones de tipo acetal, tanto que puede afectar varias características como la absorción intestinal de cada hidrato de carbono, su disponibilidad para ser metabolizado, su disolución total en un disolvente dado; etcétera. Teóricamente, en disolución todos los carbohidratos tienen la característica de poder presentar el grupo hidroxilo en posición α o β . La posición α o β es independiente de la serie a la que pertenece el hidrato de carbono en estudio; es decir si se trata de un monosacárido “L” o “D”.

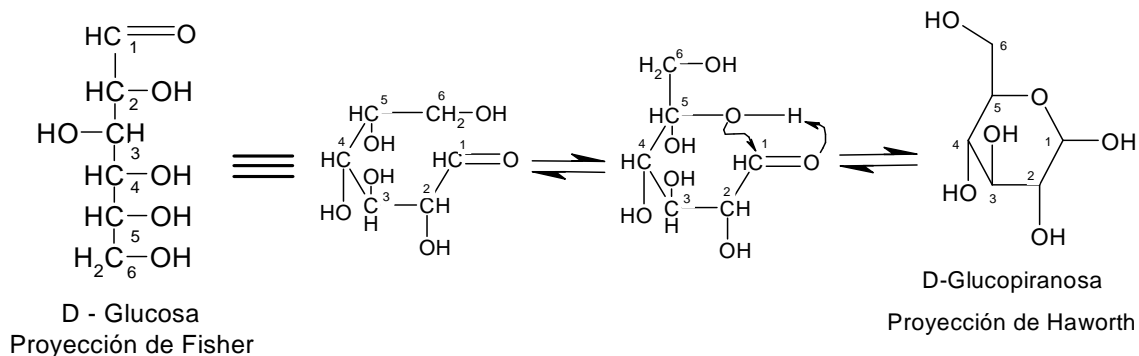


Figura 5. Mutarrotación y formación del enlace acetal en la D-Glucosa.

Cuando los hidratos de carbono están disueltos pueden presentar diversas estructuras en la misma disolución. Este mecanismo es llamado mutarrotación y se realiza constantemente siendo un equilibrio reversible que depende de las condiciones de la disolución y la temperatura. Este equilibrio consiste en que la molécula de hidrato de carbono a partir de su forma abierta forme un ciclo de tipo piranósido o furanósido y regrese a la forma abierta. No importa si el carbohidrato disuelto es una aldosa o pentosa o si pertenece a la familia D o a la familia L.

2.6. Identificación de hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono se pueden identificar mediante reacciones de tipo REDOX, pues es sabido que los hidratos de carbono son agentes reductores.

2.6.1. Reacción de Fehling⁹

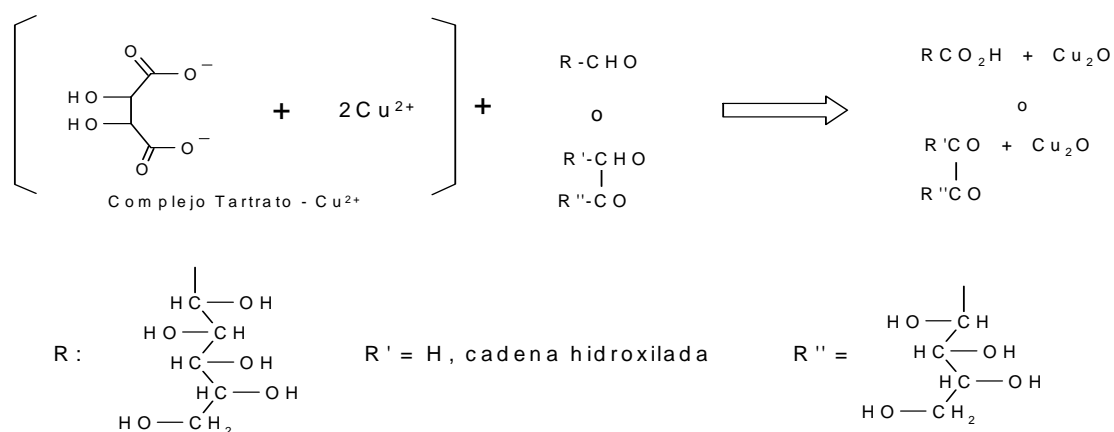


Figura 6. Reacción de Fehling.

⁹ Shriner, R., Fuson, R., Curtin, D. *Identificación sistemática de compuestos orgánicos* Limusa -Wiley S.A. México p.132 (1972)

La reacción de Fehling ayuda a identificar tanto aldosas como cetosas pero de carácter reductor. Es decir la disponibilidad que tiene el enlace hemiacetal para reaccionar. Un ejemplo son la fructosa y glucosa azúcares reductores y la sacarosa es no reductor.

2.6.2. Reacción de Tollens¹⁰

La reacción de Tollens permite identificar aldosas y aldehídos mediante la reducción de la Plata en medio alcalino

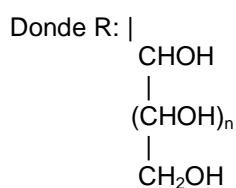
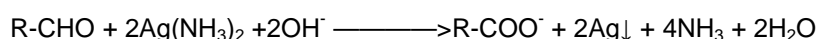


Figura 7. Reacción de Tollens.

Existe otra reacción indicada¹¹ donde se emplea óxido de plata que reacciona con glucosa o fructosa para obtener un espejo de plata elemental.

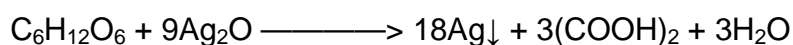


Figura 8. Reacción de formación de espejo de plata.

La propuesta nos indica que el hidrato de carbono empleado se oxida hasta ácido fumárico con la consecuente ruptura del esqueleto de carbono y la liberación de agua.

¹⁰ Wade, L. *Organic Chemistry* 6^oed, Pearson Prentice Hall. EE.UU. p1114-1118 (2006).

¹¹ C. A. Browne, C. Zerban F. *Physical and chemical methods of sugar analysis : a practical and descriptive treatise for use in research, technical, and control laboratories:* J. Wiley, EE.UU.) pp 744-749 (1941).

3

Justificación

3.1 Justificación

Los productos apícolas son mezclas complejas. Esta característica ha hecho que la calidad de estos productos, en particular de la miel, se determine principalmente por pruebas sensoriales y algunas pruebas físicas sencillas. Sin embargo, la evolución de nuestra sociedad nos lleva a buscar cada vez más y mejores formas para determinar la calidad de un producto. En la actualidad, las normas de control de la miel tienden a cambiar y a complementarse con métodos que resulten más efectivos, en el sentido que sean más rápidos, seguros, reproducibles y económicos.

Actualmente, los métodos analíticos instrumentales para la determinación de muchos compuestos se basan casi exclusivamente en la cromatografía de líquidos o de gases acoplada con detectores diversos, por lo que resulta indispensable la búsqueda de métodos más sencillos, accesibles y económicos. Además, para determinar el contenido de azúcares, de HMF (relacionado con la calidad y la capacidad de almacenamiento) y otros compuestos, se usan métodos que resultan en ocasiones obsoletos. En este sentido y puesto que los componentes principales e importantes de la miel y del propóleo presentan propiedades redox, es de esperar que la Electroquímica Analítica pueda resolver de manera satisfactoria estas necesidades de desarrollo de nuevos métodos, científicos y sencillos a la vez, para poder determinar con seguridad estos productos que México produce y exporta en grandes cantidades.

En particular, la determinación de azúcares reductores, como glucosa y fructosa (principales componentes de la miel de abeja), se realiza sobre todo por el clásico método de Fehling.

En México, la mayoría de los apicultores no efectúa ningún tipo de control analítico de la miel, en parte por problemas de costo.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general:

Desarrollar una metodología analítica lo más sencilla posible para determinar la calidad de la miel a través de sus principales indicadores: Humedad, contenido de azúcares reductores, 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (HMF), pH y cenizas.

3.2.2. Objetivos particulares:

- Estudio potenciométrico de la reacción de Fehling.
- Estudio electroquímico de la glucosa y determinación de condiciones óptimas para su posible cuantificación en muestras de miel.
- Estudio electroquímico de la fructosa y determinación de condiciones óptimas para su posible cuantificación en muestras de miel.
- Determinación electroquímica de HMF en muestras de miel.

4

Parte Experimental

4.1. Material.

4.1.1. Reactivos.

Tabla 5. Listado de sustancias empleadas.

Sustancia	Grado de pureza	Marca
Acetato de Amonio	RA	Técnica Química
Ácido Acético	RA	Merck
Ácido Clorhídrico	RA	J.T.Baker
Ácido Nítrico	RA	Merck
Ácido Sulfúrico	RA	Merck
Amoniaco	RA	Merck
Cloruro de Calcio	RA	J.T.Baker
Disolución amortiguadora de pH=10	RA	Merck
Ferricianuro de Potasio	RA	Aldrich
Fructosa anhidra	RA	Aldrich
Glucosa monohidratada	RA	Aldrich
Hidróxido de potasio	RA	Merck
Hidróxido de Sodio	RA	Mallinckrodt
5 Hidroximetilfurfural	RA	Aldrich
Maltosa anhidra	RA	Aldrich
Nitrato de Plata	RA	Merck
Nitrato de Potasio	RA	J. T. Baker
Nitrógeno	QP	Praxair
Perclorato de Litio	RA	Aldrich
Sacarosa anhidra	RA	Aldrich
Sulfato de Cobre pentahidratado	RA	J.T.Baker
Sulfato de Sodio	RA	J.T. Baker
Tartrato de Sodio y Potasio	RA	J.T.Baker
Triton X-100™	RA	Aldrich
Azul de Metileno	RA	G. T. Gury

4.1.2. Muestras de miel.

Para la realización de la tesis se estudiaron muestras de miel de diversos orígenes tanto artesanales como comerciales.

Tabla 6. Listado de muestras de miel.

Muestra	Origen
1	Miel comercial marca "Palajos" de azahar (Veracruz).
2	Miel comercial marca "Oro Maya" (Chiapas).
3	Miel comercial "Aires de Campo" monofloral de Bejuco (Yucatán).
4	Miel artesanal (Zinciro, Michoacán) 2002.
5	Miel artesanal multifloral "mantequilla" (Erongarícuaro, Michoacán, 2001).
6	Miel artesanal (Huecorio, Michoacán; 2003).
7	Miel artesanal "filamentosa" (Zinciro, Michoacán; 2003).
8	Miel artesanal multifloral "mantequilla" (Erongarícuaro, Michoacán; 2004).

4.1.3. Equipo.

- agitador Tacussel type compact #6996
- balanza analítica Mettler AE240
- microconductímetro Metrohm 664
- electrodo auxiliar de Platino
- electrodo de referencia de Calomel
- electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl Tacussel
- electrodos de trabajo:
 - Cobre
 - disco giratorio (Au, Pt) Radiometer (EDG)
 - goteante de Mercurio Tacussel (EGM)
- graficador Yokohama 3036 XY Recorder
- manta de calentamiento Glas-Col Apparatus Co.
- milivoltímetro Tacussel type 6SN
- potencióstato Radiometer MDE 150 y stand Pol 150
- potencióstato Tacussel PRG5
- refractómetro RHB-90
- reóstato Staci Inc. Tipo SPF1010
- termómetro de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ Brannan

4.1.4 Material de uso común en el laboratorio.

Material volumétrico, material graduado, micropipetas, soporte universal, pinzas para bureta, tubos de ensaye, vidrio de reloj, navette; etcétera.

4.2. Metodología.

Con base en la electroquímica analítica, se hicieron las determinaciones potenciométricas y voltamperométricas de hidratos de carbono en muestras de miel de abeja, así como determinaciones fisicoquímicas.

Para la identificación de hidratos de carbono se tuvo de referencia fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa de grado de pureza R.A. con las que se prepararon disoluciones patrón de diferentes concentraciones. También se realizó una disolución patrón de HMF. Para este estudio se utilizaron agua desionizada y agua destilada para la preparación de disoluciones patrón, así como para electrolito soporte y pruebas a la gota, por ser el mejor disolvente común a todas las sustancias empleadas.

Para la potenciometría se empleó un milivoltímetro con electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl o de Calomel (ECS) y un electrodo de trabajo de Cu^0 para el seguimiento de la reacción de Fehling. Con ayuda de tablas (tablas de Fehling) que relacionan el volumen fijado de licor de Fehling (10 o 25 mL) y el volumen gastado de disolución de hidrato de carbono para encontrar la cantidad de hidrato de carbono que ha valorado el licor de Fehling se obtiene la cantidad de azúcares reductores presentes en muestra por el vire del indicador para la reacción que es el azul de metileno. El licor de Fehling se prepara al momento de realizar la determinación a partir de volúmenes iguales de las dos disoluciones; la "A" que es sulfato de cobre (en concentración cercana a 0.28 M) y la disolución "B" con hidróxido de sodio y tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (cada uno en concentración cercana a 1.2 M).

Con las disoluciones de hidrato de carbono se valoró en cada caso el licor de Fehling; el resultado obtenido es un gráfico de Potencial (mV) registrados en el milivoltímetro contra el volumen gastado de disolución problema con el fin de obtener información concerniente al punto de equivalencia de la reacción en estudio.

Para la voltamperometría se maneja un volumen conocido de electrolito soporte que es el medio para asegurar la continuidad eléctrica del circuito electroquímico y permitir la realización de las reacciones electroquímicas (redox) a un potencial impuesto con una respuesta en intensidad de corriente que se relaciona por las leyes de Faraday con la cantidad de materia. A este volumen de electrolito soporte se le burbujea Nitrógeno (previamente saturado de disolvente para no alterar la concentración en la celda electroquímica) en la matriz de la disolución, para desplazar el oxígeno disuelto y se previene que éste regrese al medio al mantener una atmósfera inerte de Nitrógeno. Los resultados de la voltamperometría se plasman en un gráfico confrontando el potencial impuesto, medido en milivoltios o voltios, contra la intensidad de corriente, expresada generalmente en microamperios; el gráfico resultante se llama “voltamperograma” de manera genérica y “polarograma” cuando se emplea el electrodo de gota de Mercurio (EGM).

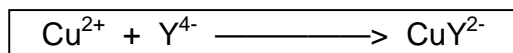
4.2.1.- Cuantificación de hidratos de carbono reductores totales.

Mediante la reacción de Fehling¹² (que aún es método oficial de análisis) se pueden cuantificar los hidratos de carbono reductores libres totales¹³. Los hidratos de carbono reductores son aquellos que tienen la capacidad de reducir iones metálicos como plata y cobre, al mismo tiempo que el azúcar se oxida para formar un ácido carboxílico gracias a la disponibilidad del enlace hemiacetal para reaccionar.

Se elaboró una revisión bibliográfica para los hidratos de carbono mayoritarios en miel y se les valoró con el reactivo de Fehling (también llamado licor de Fehling). El reactivo de Fehling consta de dos disoluciones la "A" (sulfato de cobre) y la "B" (tartrato de sodio y potasio y NaOH). Ambas disoluciones se mezclan en volúmenes iguales para tener una disolución de 10 mL o 25 mL de licor o reactivo de Fehling. Esta cantidad fija está establecida para obtener por medio de las tablas de Fehling la cantidad de hidrato de carbono reductor que se emplea para valorar todo el reactivo de Fehling a ebullición.

Como una forma de confirmar con seguridad la estequiometría de la valoración de Fehling y poderla aplicar con fines cuantitativos e independientemente de fórmulas matemáticas o tablas, se normalizó el CuSO₄ de la disolución "A" con patrón de EDTA (ácido etilendiamino tetraacético disódico dihidratado, simplificando en su notación como Y⁴⁻) usando un electrodo de Cu⁰ y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl.

La reacción simplificada del sistema de estudio¹⁴ es la siguiente:



Se sabe que la estequiometría de la reacción es de uno a uno, es decir que un ión (catión) cúprico Cu²⁺ reacciona con un ión (anión) Y⁴⁻. La equivalencia de la reacción está en el cambio de pendiente de la curva y el punto de equivalencia está exactamente a la mitad del cambio de pendiente, es decir cuando reaccionó todo el Cu²⁺ con el EDTA.

¹² AOAC *Official methods of analysis* EE.UU: 16^oed. Cap. 44, pp20-22 (1995).

¹³ Fennema, O. *Química de Alimentos*. Acribia, España p100 (1993).

¹⁴ Ringbom A. "*Formación de complejos en Química Analítica*." Alhambra, Madrid, p334 (1979).

Así, se obtiene la cantidad real añadida de Cobre en la disolución "A". Al relacionar la cantidad real de Cobre presente (es decir, la cantidad en mol de cobre correspondiente al volumen agregado de licor de Fehling) y la cantidad de hidrato de carbono adicionado de una disolución patrón se puede encontrar la estequiometría de la reacción. Los hidratos de carbono estudiados fueron: Fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa (invertida, esto es que la sacarosa es sometida a un tratamiento ácido para romper el enlace sacarínico entre glucosa y fructosa) con alto grado de pureza. El punto de equivalencia de la valoración proporciona información de la estequiometría de la reacción y se determina calculando la cantidad añadida de hidrato de carbono desde la bureta para una cantidad fija de Cu^{II+} . La equivalencia se calcula con el cociente en mol de cantidad de hidrato de carbono añadido entre cantidad de cobre presente para obtener el factor estequiométrico para cada hidrato de carbono.

Con esta información se evaluaron muestras de miel, diluidas 100 veces sin invertir, con 10 mL y 25 mL de licor de Fehling y un milivoltímetro. Así se obtuvieron los carbohidratos reductores en las muestras de miel.

4.2.2. Estudio electroquímico de hidratos de carbono.

Debido a que se tiene solamente reportado un trabajo sobre la reducción de azúcares en polarografía¹⁵, se realizó la búsqueda de señales en diferentes medios. Se usaron como electrolito soporte disoluciones de sales, ácidos y bases a concentraciones de alrededor de [0.01 M] hasta [1 M] como: KNO₃ [1.0, 0.5, 0.1 M], HNO₃ [0.5, M], HNO₃/KNO₃ [1.0, M], LiClO₄ [1.0, 0.1 M], HCl [0.5 M], H₂SO₄ [0.5 M], NH₃(ac)/NH₄NO₃ [1.0, M], NaClO₄ (saturado), Na₂SO₄ (saturado) medio de tartrato alcalino (disolución "B" de Fehling), licor de Fehling, disoluciones amortiguadoras de pH (4, 7, 9, y 10) y electrodos (EGM, EDG_{Au} y EDG_{Pt}) para la oxidación y/o reducción de los hidratos de carbono a temperatura ambiente. Se buscó también una reacción indirecta para cuantificación mediante la reducción de un catión metálico de transición tal como Cu, Ag y Fe en un medio ácido oxidante.

4.2.3.-Cuantificación directa de fructosa por electroquímica (voltamperometría).

Se realizaron curvas patrón de fructosa (el hidrato de carbono mayoritario en la miel) en CaCl₂. Asimismo se probaron mezclas equimolares de fructosa y glucosa para comprobar la influencia de glucosa en la determinación de fructosa.

4.2.4.-Cuantificación de azúcares en miel.

Ya identificado el dominio de electroactividad y posición de la señal solo se realizó la cuantificación de fructosa en miel por el método de adiciones patrón, que consiste en añadir muestra hasta la aparición de la señal deseada y posteriormente añadir una disolución patrón de concentración conocida. Con un análisis estadístico basado en el carácter lineal de una curva de calibración se conoce la cantidad de azúcar presente en la muestra.

¹⁵ Overend, W., Peacocke, A. y Smith, J. *Reactions at position 1 of carbohydrates. Part I. The polarographic reduction of carbohydrates.* J. Chem. Soc. p.347-349. (1961).

4.2.5.-Cuantificación de HMF en miel¹⁶¹⁷.

Para la determinación de HMF en muestras de miel se utilizó la polarografía diferencial de impulsos con el método de adiciones patrón. Se colocaron 8 mL de electrolito soporte (disolución amortiguadora de pH (buffer) de boratos comercial en agua a pH = 9). El dominio de electroactividad en este medio va de +300 mV a -1450 mV; la señal de HMF en este medio se presenta aproximadamente en -1175 mV, por lo que se estudió la zona de potenciales comprendida entre -1000 mV a -1300 mV. Primero se hacen adiciones de miel diluida de concentración conocida (del orden de 500 mg•mL⁻¹) hasta que se define la señal correspondiente al HMF. Posteriormente se adicionaron alícuotas de disolución patrón [0.01M] de HMF; comprobándose así que la señal identificada corresponde al HMF e incrementos proporcionales de la señal con la concentración; con un análisis de regresión lineal de adiciones patrón se obtiene la cantidad de HMF en la miel estudiada.

4.2.6. Estudios adicionales en miel.

Este trabajo se completa con determinaciones fisicoquímicas tales como:

4.2.6.1. Humedad

La determinación de humedad se hace con el refractómetro en °Brix y se realiza sin ningún tratamiento con la miel. La lectura del refractómetro directamente da la lectura en °Brix y esta lectura se corrige por la temperatura a la que fue hecha la lectura, en este caso el factor de corrección fue de 0.38 °Brix que se adicionan al valor de lectura dado por el refractómetro. A 100 se le sustrae °Brix corregidos para obtener el por ciento de humedad.

¹⁶ Reyes O. *Direct Electrochemical Determination of Hydroxymethylfurfural (HMF) and its application to honey samples* Analytical letters, 39:161-171, (2006).

¹⁷ Juárez, D. Tesis: *Determinación electroquímica de HMF (5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído) en miel de abeja*. Universidad Nacional Autónoma de México. México (2003)

4.2.6.2. Cenizas¹⁸

Para la determinación de porcentaje de cenizas se necesita diluir la miel en una concentración aproximada de $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se realiza la lectura del valor de conductividad en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. El valor obtenido se corrige mediante la sustracción de conductividad del agua desionizada empleada para hacer las diluciones y la constante de celda. El valor corregido se introduce en la fórmula para la determinación del porcentaje de cenizas como conductividad específica, que a continuación es presentada.

$$\% \text{Cenizas} = [\text{Conductividad específica } (\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}) - 0.14] \div 1.74$$

4.2.6.3. pH

El valor del pH se determina con la dilución de miel empleada para cenizas y se lee directamente el valor en el potenciómetro, previa calibración con dos disoluciones amortiguadoras de $\text{pH} = 4$ y $\text{pH} = 7$ para el ajuste de la pendiente.

¹⁸ Vorwohl, G. *Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft*. In: Ann. de Abeille 7, 301-309 (1964).

5

Resultados y discusión

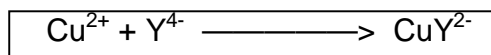
5.1. Cuantificación de hidratos de carbono reductores totales.

En una reacción química es fundamental conocer la estequiometría. Con las valoraciones potenciométricas de la reacción de Fehling se encontró la relación entre algunos hidratos de carbono reductores con el Cu^{2+} . Para poder determinar la relación entre ambos reactivos, se valoró previamente la disolución de Cu^{2+} con EDTA (reactivo "A" de Fehling).

5.1.1. Normalización de CuSO_4 con EDTA (Y^{4-}).

De acuerdo con las indicaciones de la literatura¹², la concentración de Cu^{2+} debe ser [0.2775 M] siendo esta la concentración teórica de la disolución. Por medio de una valoración potenciométrica el CuSO_4 se valora con EDTA (Y^{4-}) con la que se conoció la concentración real del Cu^{2+} usando como electrodo de trabajo Cu^0 y de referencia $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$.

La reacción del sistema de estudio puede escribirse de manera simplificada¹⁴ como:



Valoración potenciométrica de CuSO_4 con EDTA

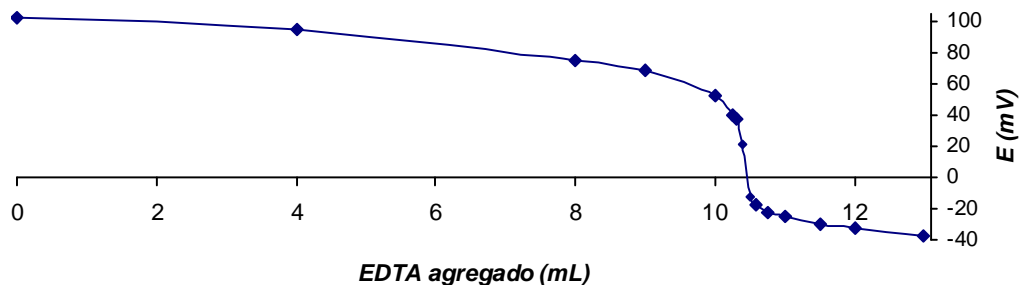


Figura 9 Valoración potenciométrica de disolución "A" del reactivo de Fehling (alícuota de 5mL) con EDTA [0.0989 M] a temperatura ambiente con electrodo de Cu^0 y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

Se sabe que la estequiometría de la reacción es de uno a uno, es decir que un ión cúprico Cu^{2+} reacciona con un ión Y^{4-} . La equivalencia de la reacción está a la mitad en el cambio de pendiente de la curva potenciométrica y se puede observar con claridad el punto de equivalencia, es decir cuando reaccionó todo el Cu^{2+} presente con el EDTA agregado. El

¹² AOAC Official Methods of Analysis 16ed. EE.UU. cap44, pp 20-22 (1995).

¹⁴ Ringbom A. "Formación de complejos en Química Analítica." Alhambra, Madrid , p334 (1979).

volumen gastado de EDTA [0.0989 M] fue de 10.4 mL para valorar los 5 mL de CuSO_4 . Esto permite conocer exactamente a la cantidad de cobre en la disolución problema¹.

La concentración de la disolución "A" fue de [0.2064 M].

Al comparar la concentración teórica [0.2775 M] con la real [0.2064 M] del CuSO_4 se deduce que la disolución preparada presenta una pureza del 74.38%. La preparación de la disolución de Cu^{2+} se realizó con el reactivo tal cual, sin secado previo en la estufa, por lo que puede explicarse, por un lado, la pureza y por otro la necesidad de asegurarse del secado previo de la sal.

5.1.2. Estudio estequiométrico de la reacción de hidratos de carbono con el reactivo de Fehling.

El reactivo de Fehling consta de dos disoluciones, la "A" que es CuSO_4 [0.28 M] y la "B" $\text{KOOOC}(\text{CHOH})_2\text{COONa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [1.2 M] y NaOH [1.2 M]. Ambas disoluciones se mezclan en volúmenes iguales para tener una disolución de 10 o 25 mL de licor o reactivo de Fehling; estos volúmenes permiten por medio de las tablas de Fehling, obtener la cantidad de hidrato de carbono reductor que se gasta para valorar todo el reactivo de Fehling a ebullición. Se estudiaron diferentes hidratos de carbono, los mayoritarios en la miel con grado QP en disolución. Los titulantes fueron: Fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa invertida (inversión es la hidrólisis ácida para romper el enlace sacarínico). Todas las valoraciones se hicieron a ebullición.

La metodología que se siguió para encontrar la estequiometría de la reacción de Fehling (se prepararon disoluciones frescas donde la disolución "A" tuvo una concentración [0.28 M] para este caso) se explica a continuación con el análisis de fructosa. Al relacionar la cantidad titulada de Cobre presente (es decir, la cantidad en mol de Cu^{2+} en el volumen agregado de disolución "A") en 25 mL de reactivo de Fehling (donde se tienen 3.5×10^{-3} mol de Cu^{2+}) y

¹ Durante el desarrollo de la tesis se prepararon varias disoluciones para el licor de Fehling; por lo que la concentración correspondiente de Cu^{2+} estará indicada para cada caso.

adiciones de fructosa de una disolución de concentración conocida (fresca de una concentración de $[0.045 \text{ M}]$). El gráfico resultante se muestra a continuación en la figura 10.

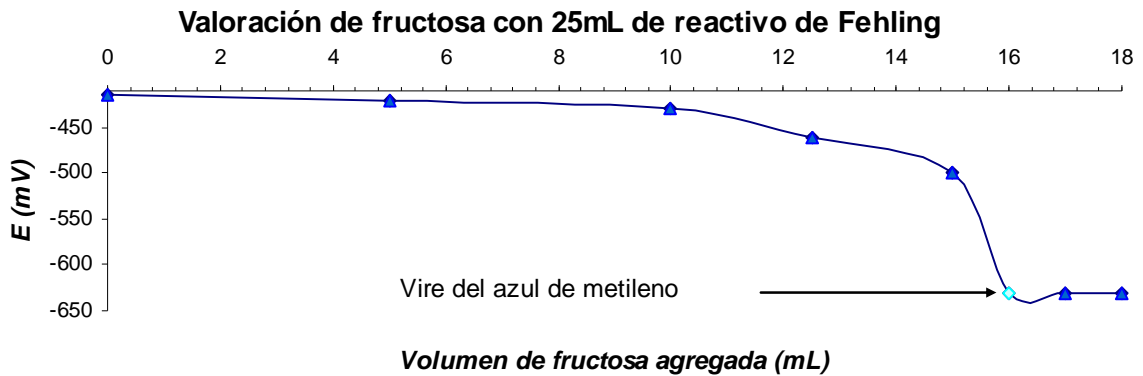


Figura 10 Valoración potenciométrica con volumen (mL) de fructosa $[4.5 \times 10^{-2} \text{ M}]$ gastado para 25 mL de reactivo de Fehling (3.5 mmol de Cu^{II} presentes) a $93 \text{ }^\circ\text{C}$ con electrodo de Cu^0 y ECS como referencia.

El viraje del indicador azul de metileno es en 16 mL gastados de fructosa. En las tablas de equivalencia de Fehling correspondientes a levulosa se lee en el volumen gastado cuando vira el indicador y se obtiene la cantidad de fructosa presente en la muestra. La lectura se lee que a 16 mL de gasto de fructosa corresponden a 127.4 mg de levulosa que significan 0.705 mmol de fructosa gastada. Para facilitar el cálculo posterior, se elaboró otro gráfico con la cantidad gastada para saber la cantidad gastada de fructosa en mmol.

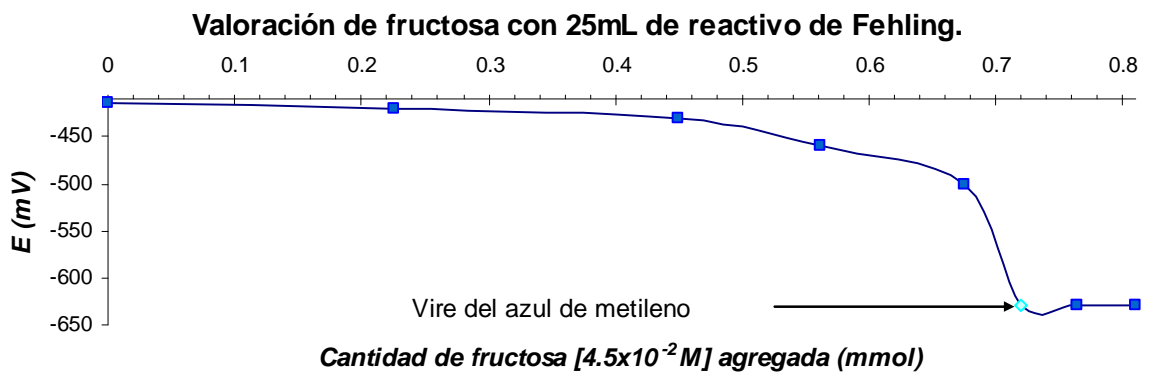


Figura 11. Valoración potenciométrica con la cantidad (mmol) de fructosa $[4.5 \times 10^{-2} \text{ M}]$ gastada con 25 mL de reactivo de Fehling (3.5 mmol de Cu^{II} presentes) a ebullición con electrodo de Cu^0 y ECS como referencia.

El gráfico ahora muestra que se tiene cerca de 0.7 mmol agregada de fructosa para valorar las 3.5 mmol presentes de Cu^{II} . Al dividir la fructosa gastada entre el cobre presente,

se obtiene la relación estequiométrica para la reacción estudiada, como se presenta a continuación:

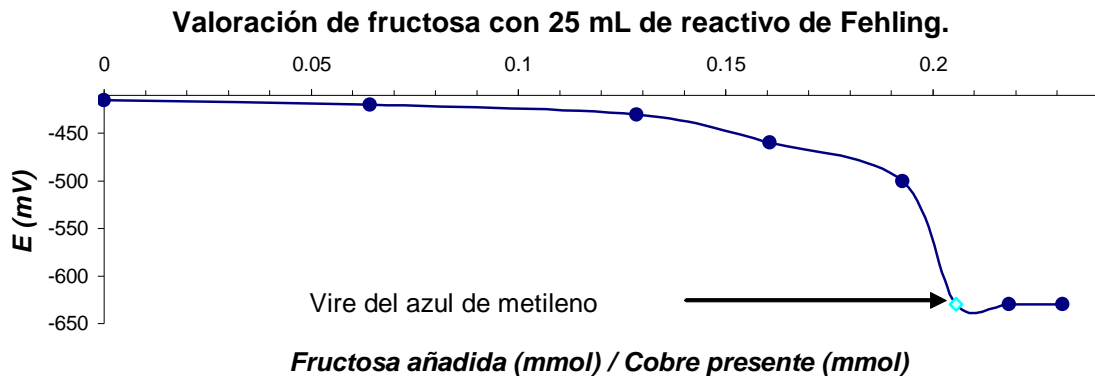


Figura 12. Relación de gasto de fructosa contra cobre presente de la valoración potenciométrica de fructosa [4.5×10^{-2} M] gastada con 25 mL de reactivo de Fehling a ebullición con electrodo de Cu^0 y ECS como referencia.

La relación es de 0.2. Este cociente equivale a $\frac{1}{5}$ es decir, que 1 mol de fructosa reacciona con 5 mol de $\text{Cu}^{\text{II}+}$ presentes en el licor de Fehling. Para la semisuma ponderada se tienen 5 electrones de fructosa y 1 electrón de cobre, por lo que el punto de equivalencia esta a $\frac{5}{6}$ del salto cuantitativo.

Tabla 7. Resultados de la potenciometría de fructosa con 25 mL de reactivo de Fehling. Determinación de la estequiometría de la reacción $\text{Cu}^{\text{II}+}$ –fructosa.

Fructosa valorada con reactivo de Fehling				
Metal de transición				
Concentración $\text{Cu}^{\text{II}+}$	[0.28M]			
Cantidad $\text{Cu}^{\text{II}+}$ (12.5mL)	3.5mmol			
Hidrato de carbono				
Concentración de Fructosa	[0.045M]			
Cantidad de Fructosa	Punto de valoración	Cantidad de fructosa agregada	Fruct/ $\text{Cu}^{\text{II}+}$	Estequiometría
	Vire _{Ind}	0.719 mmol	0.205	Fru: 1 Cu: 5
	Punto de Equivalencia	0.675 mmol	0.193	Fru: 1 Cu: 5
	Valor de tabla	0.705 mmol	0.201	Fru: 1 Cu: 5

Para comprobar la validez de las tablas estandarizadas de Fehling que se emplean para determinar azúcares reductores, también se tomó el volumen de 10 mL de licor de Fehling y el doble de concentración de fructosa.

La cantidad de Cu^{II} presente en la disolución empleada para este análisis del licor de Fehling fue de 1.032×10^{-3} mol, correspondientes a 5 mL de CuSO_4 cuya concentración era [0.2064 M] y se hicieron las adiciones de fructosa con una disolución [9.52×10^{-2} M]. El gráfico resultante del monitoreo potenciométrico de la reacción se presenta en la figura 13.

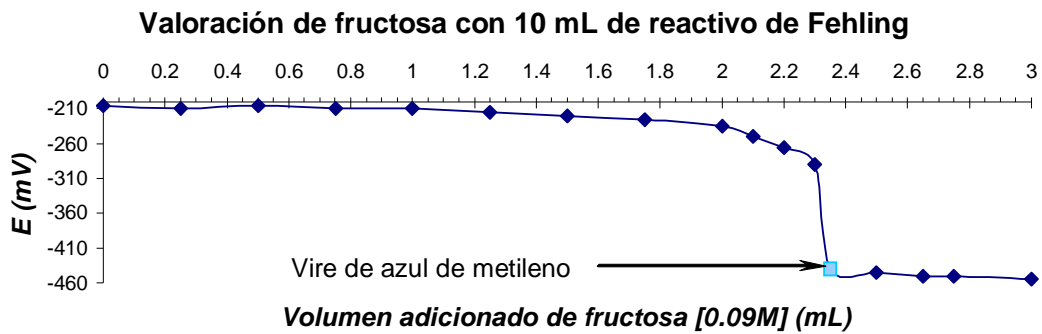


Figura 13. Valoración potenciométrica con volumen (mL) de fructosa [0.09 M] gastado para 10 mL de reactivo de Fehling (1.032 mmol de Cu^{II} presentes) a 85°C con electrodo de Cu^0 y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

En el gráfico se aprecia que el vire del indicador es con 2.35 mL de disolución de fructosa añadida. Este vire es el punto donde se observó el cambio de coloración del indicador azul de metileno y que coincide con el punto de equivalencia de la reacción que se observa en el potenciograma.

La cantidad correspondiente de fructosa requerida para valorar todo el reactivo de Fehling presente a partir del vire del indicador se conoce al hacer un gráfico con la cantidad agregada de fructosa en mmol en el eje de las abscisas.

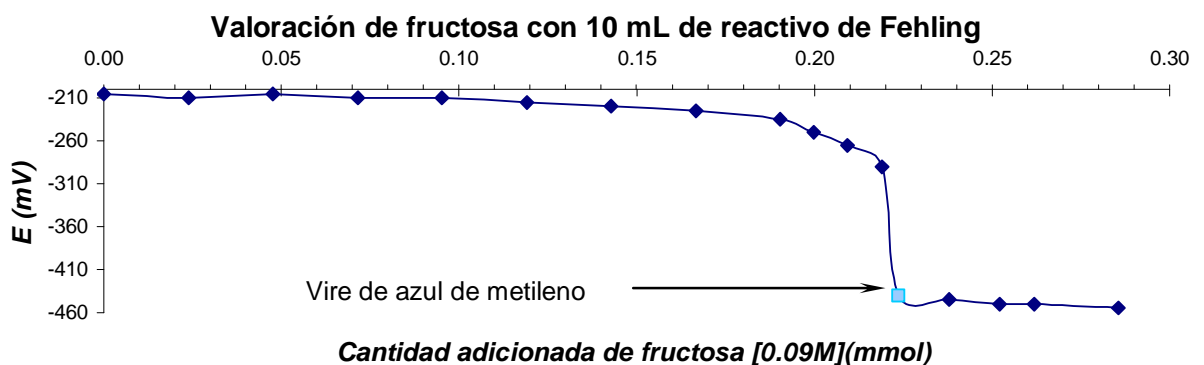


Figura 14. Valoración potenciométrica con cantidad agregada (mmol) de fructosa [0.09 M] gastado para 10 mL de reactivo de Fehling (1.032 mmol de Cu^{II} presentes) a 85°C con electrodo de Cu^0 y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

Con esta información se hace un tratamiento matemático conocido como primera derivada para conocer el punto de equivalencia. Este análisis se detalla en la figura 15.

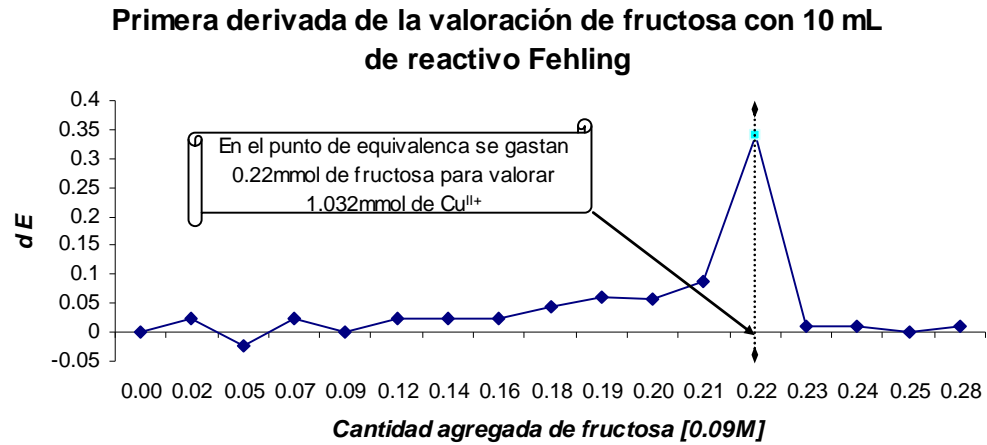


Figura 15. Primera derivada de la valoración potenciométrica de fructosa [0.09 M] con reactivo de Fehling (1.032mmol de Cu^{II} presentes) a 85 °C con electrodo de Cu^0 y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

El pico resultante corresponde al punto de equivalencia de la reacción. En la gráfica se puede leer que el pico corresponde a 0.22 mmol de fructosa agregada para hacer reaccionar todo el reactivo de Fehling.

Con la información de la cantidad de fructosa gastada obtenida en el punto de equivalencia y la cantidad de Cu^{II} presente se dividen para obtener la relación estequiométrica entre ambos reactivos.

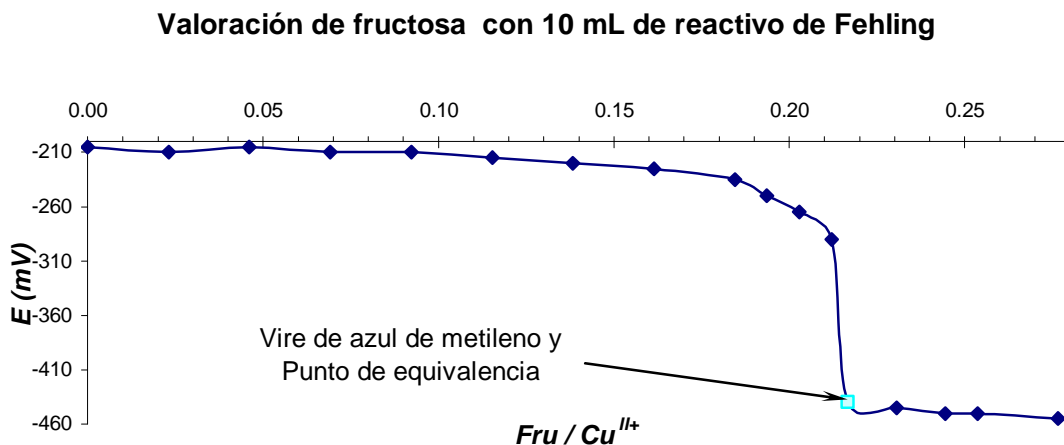


Figura 16 Relación de gasto de fructosa contra cobre presente de la valoración potenciométrica de fructosa [0.09 M] gastada con 10 de reactivo de Fehling a ebullición con electrodo de Cu^0 y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

Esta relación de 0.2 (o fraccionaria $\frac{1}{5}$) indica que la relación estequiométrica es de 1 mol de fructosa por 5 mol de cobre. De esta manera se confirma que el volumen de Fehling no influye en la determinación pues se mantienen las proporciones constantes.

De este análisis se desprende que:

- El vire del indicador es apropiado pues está próximo al punto de equivalencia o con un ligero exceso.
- No importa el volumen de licor de Fehling, la estequiometría cumple la ley de proporciones constantes.
- Las tablas son válidas en el intervalo de volumen que manejan y corresponden efectivamente a la relación aproximada de fructosa : $\text{Cu}^{\text{II}+}$ de 1:5.
- Es posible conocer la concentración de fructosa mediante la normalización del $\text{Cu}^{\text{II}+}$.

La misma metodología se aplicó a glucosa, maltosa y sacarosa invertida.

Se encontraron resultados similares para los demás carbohidratos analizados, como puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 8. Resultados de potenciometría del reactivo de Fehling (1.03 mmol de $\text{Cu}^{\text{II}+}$) con hidratos de carbono de alta pureza para estequiometría de la reacción.

Estequiometría de la reacción de Fehling por potenciometría				
Hidrato de carbono	Cantidad² ($\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$) (mmol)	$\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n / \text{Cu}^{\text{II}+}$	$\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$	$\text{Cu}^{\text{II}+}$
Glucosa	0.2091	0.211	1	5
Fructosa	0.2229	0.203	1	5
Maltosa	0.1926	0.187	1	5
Sacarosa invertida	0.4106	0.399	2	5

La glucosa y la fructosa reaccionan en la misma proporción con las mismas condiciones de reacción. La maltosa aunque es un dímero de glucosa, sólo reacciona como una molécula debido a que sólo es reductora en una molécula de glucosa. En cambio la

² Promedio de todas las valoraciones, se realizaron tres valoraciones por hidrato de carbono.

sacarosa, al ser un dímero de fructosa y glucosa proporciona, al hidrolizarse, dos monosacáridos, por lo que el cociente indica que reacciona al doble. Es importante hacer mención de que se debe hacer el ataque ácido a la sacarosa para invertirla; es decir, separar el dímero en monómeros hidrolizando el enlace sacarínico porque la sacarosa en sí es un disacárido no reductor.

El azul de metileno que se emplea como indicador es una herramienta sumamente útil pues el vire del indicador generalmente se presenta al final del cambio de pendiente y coincide con la estequiometría dando un muy pequeño exceso en el resultado de la lectura lo que es válido en procedimientos de química analítica.

Para esta determinación es importante el uso del milivoltímetro porque la ayuda del indicador azul de metileno se puede ver obstaculizada debido al carácter reversible de su vire por presencia de oxígeno.

5.1.3. Curvas de muestras de miel.

En las muestras de miel se puede observar que se presenta una mezcla que puede valorar el reactivo de Fehling.

A continuación se muestran dos ejemplos de las curvas de valoración potenciométricas obtenidas.

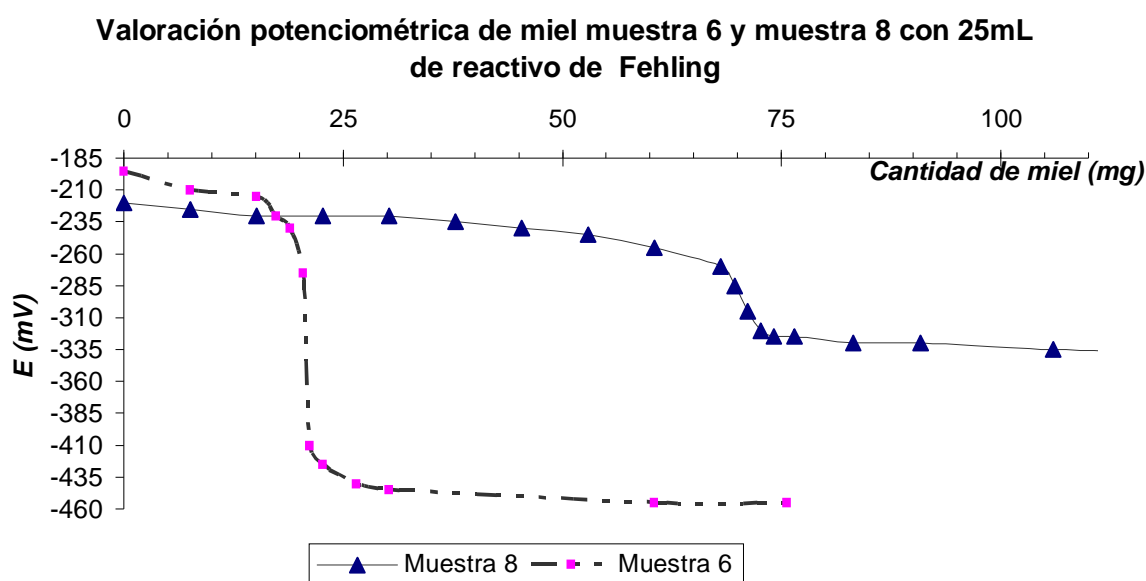


Figura 17. Valoración potenciométrica de dos mieles muestra 6 ($0.015 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y muestra 8 ($0.011 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) cantidad agregada de miel con 10 mL de reactivo de Fehling (3.5 mmol de Cu^{II} presentes) a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ con electrodo de Cu^0 y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

Por sí misma, la reacción de Fehling (seguida potenciométricamente o con indicador) únicamente reporta los hidratos de carbono reductores presentes, sin informar la composición de hidratos de carbono en la muestra.

5.2. Estudio electroquímico de hidratos de carbono.

Para la parte voltamperométrica se consideraron diversos aspectos para identificar y valorar al menos fructosa y glucosa. El estudio voltamperométrico se realizó de la siguiente manera:

- Determinación de carbohidratos específicos en la zona de oxidación.
- Seguimiento de la reacción de Fehling en la celda electroquímica para fructosa y glucosa.

- Determinación indirecta de los carbohidratos en presencia de un agente oxidante, por la disminución de la concentración de éste.
- Determinación directa por reacciones electroquímicas de reducción.

Para el estudio de Intensidad de corriente (I) contra potencial eléctrico impuesto (E), se probaron diferentes electrolitos soporte y diferentes electrodos de trabajo.

Los mejores resultados se obtuvieron tanto con el electrodo de disco giratorio de Oro (EDG_{Au}) como con el electrodo de gota de Mercurio (EGM). En EGM se tuvo el problema, por la naturaleza del Mercurio, que la zona de oxidación es menor que con el EDG_{Au} (en el caso de electrodos de disco giratorio se probó tanto el electrodo de Platino como el de Oro) para encontrar las condiciones óptimas de detección de al menos Fructosa y Glucosa.

De todos los electrolitos empleados, solamente en $LiClO_4$ [1 M], Tartrato en medio alcalino (disolución Fehling "B"), H_2SO_4 [0.5 M] (con adiciones de, $CuSO_4$, $K_3Fe_3(CN)_6$ y $AgNO_3$) y $CaCl_2$, [1 M] se obtuvieron señales reproducibles de fructosa.

Para la glucosa el inconveniente de calentar la disolución y mantenerla constante en al menos 60 °C; hace que los experimentos se tengan que hacer rápido pues la pérdida de volumen afecta la cuantificación final de la concentración.

5.3. Cuantificación de hidratos de carbono reductores.

Los principales obstáculos encontrados fueron que en el caso de la polarografía con el medio de tartratos, la zona de oxidación se ve muy reducida por la aparición de la barrera anódica cerca de los 50 mV en la escala empleada, debido a la formación de complejos entre los tartratos y el Hg^{2+} .

5.3.1. Resultados de linealidad de voltamperogramas.

A continuación se muestran los voltamperogramas obtenidos en diversos electrolitos y electrodos de trabajo para fructosa y glucosa con su correspondiente curva de calibración.

5.3.1.1. Fructosa

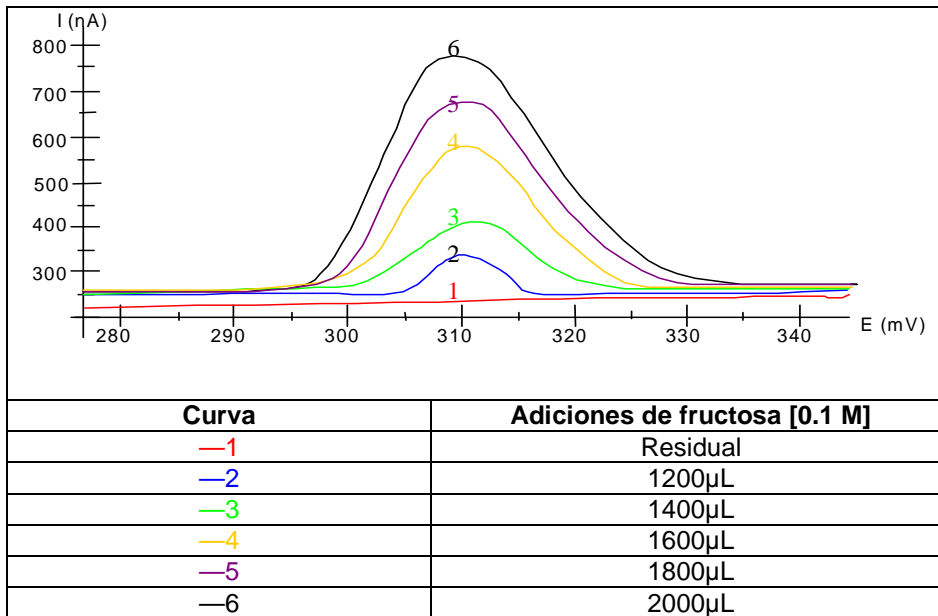


Figura 18. Voltamperogramas diferencial de impulsos de adiciones de fructosa [0.1 M] en zona de oxidación en 20 mL de sal de la Rochelle (tartrato de sodio y potasio) [0.1 M] a temperatura ambiente (velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ con EDG_{Au} impulso 25 mV y ECS como referencia).

La figura 18 muestra un ejemplo de los polarogramas experimentales y la figura 19 relaciona la intensidad de corriente de cada pico con la concentración, en este caso concentración de fructosa, en la celda de medición. En el polarograma se mide la magnitud del pico en valor absoluto y se le sustrae la línea base residual a cada pico. Con el valor absoluto de cada uno de los picos (se mide desde la base hasta lo más alto), se realiza un gráfico donde se relacionan la magnitud de la corriente para la concentración correspondiente de cada adición. El tartrato presentó la barrera cerca de los 0.0 V, así que las señales aparecen hasta que se añadió una gran cantidad de fructosa.

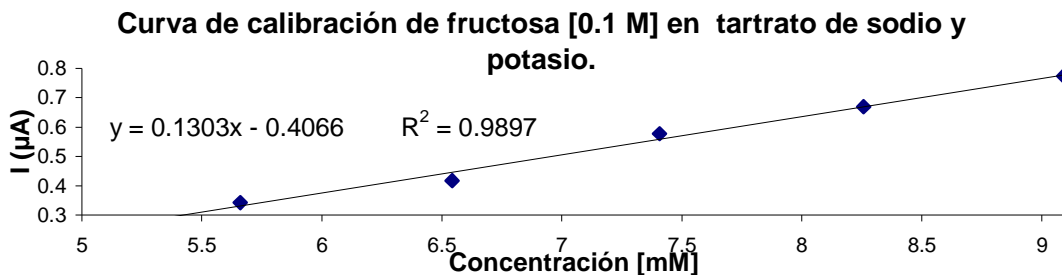


Figura 19. Curva de calibración de oxidación de fructosa [0.1 M] en 20 mL de sal de la Rochelle (tartrato de sodio y potasio) [0.1 M] por polarografía diferencial de impulsos en 310 mV con una velocidad de $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$: EDG_{Au}/ECS).

La figura 20 es la representación de una serie de polarogramas para fructosa obtenidos en el medio de LiClO_4 [0.1 M] y en correspondencia su curva de calibración.

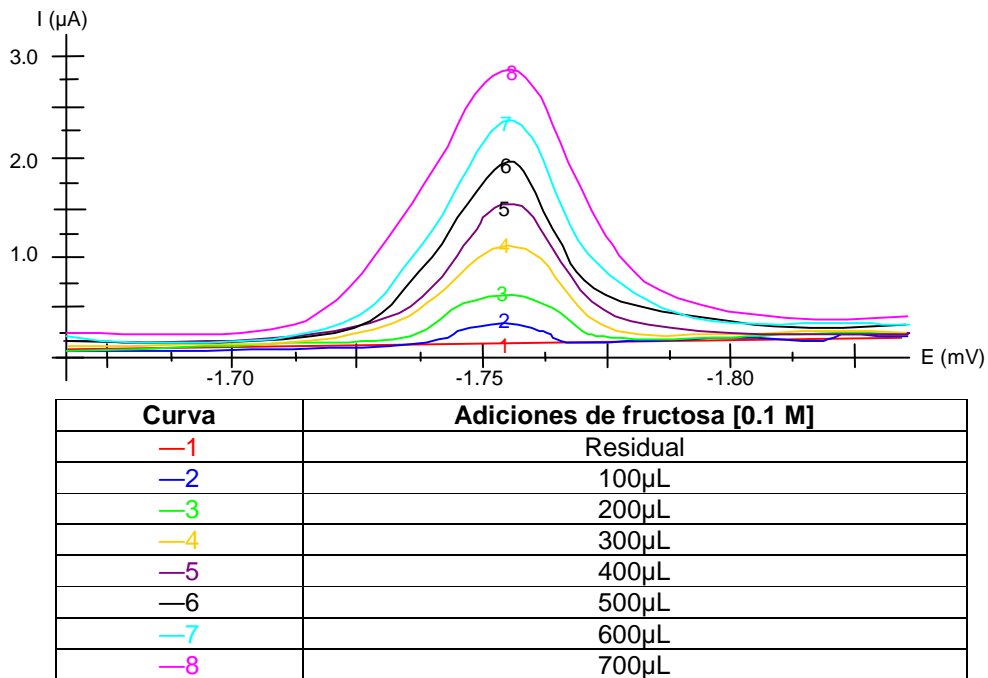


Figura 20 Polarogramas diferencial de impulsos (DPP) de adiciones de fructosa [0.1 M] en zona de reducción en 20 mL de LiClO_4 [0.1 M] a temperatura ambiente (velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -25 mV y ECS como referencia).

Las señales obtenidas fueron muy claras y nítidas en zona de reducción, por lo que el coeficiente de regresión es más aceptable.

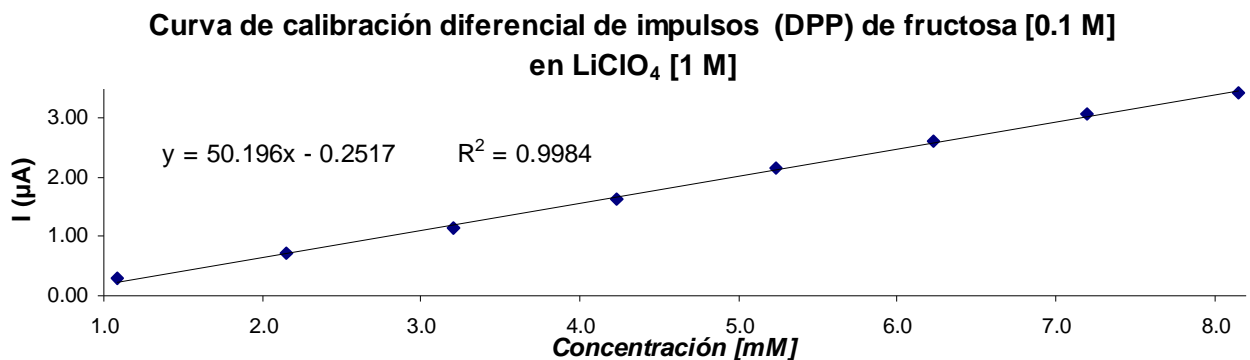


Figura 21 Curva de calibración de fructosa [0.1 M] en zona de reducción en 20 mL de LiClO_4 [0.1 M] a temperatura ambiente (DPP en -1.75 mV a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ EGM/ECS).

Con el mismo electrolito se logró ver la oxidación pero con electrodo de disco giratorio de superficie de oro.

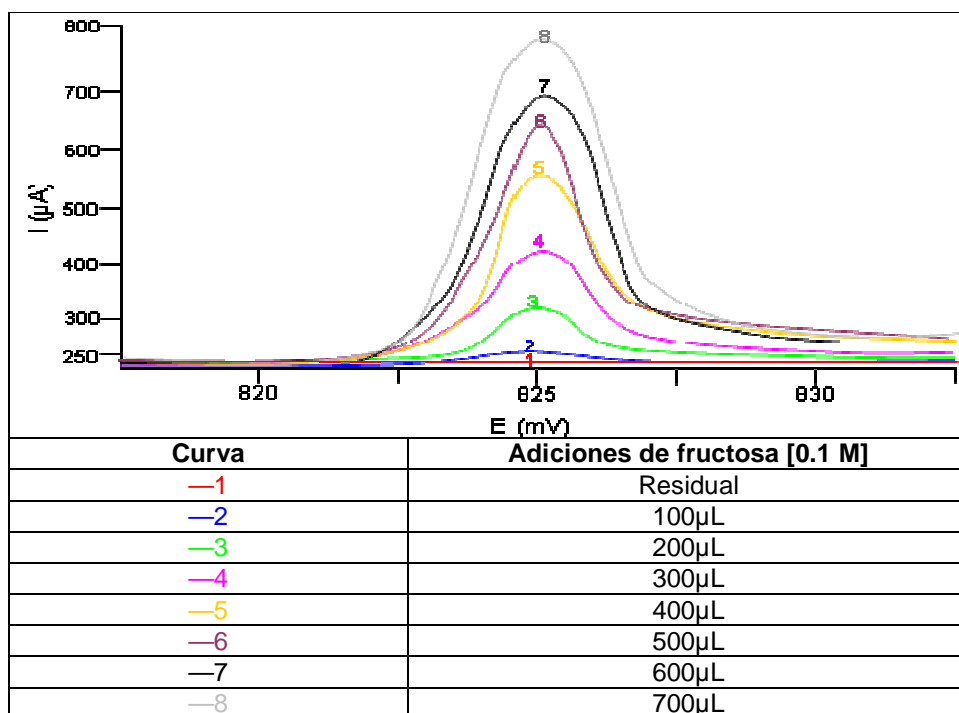


Figura 22 Voltamperogramas diferencial de impulsos de fructosa [0.1M] en zona de oxidación en 75 mL de LiClO_4 [0.1 M] a temperatura ambiente ($\text{EDG}_{\text{Au}}/\text{ECS}$, velocidad de barrido $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; impulso 50 mV).

Curva de calibración de impulsos diferenciales (DPV) de fructosa [0.1 M] en LiClO_4 [0.1 M].

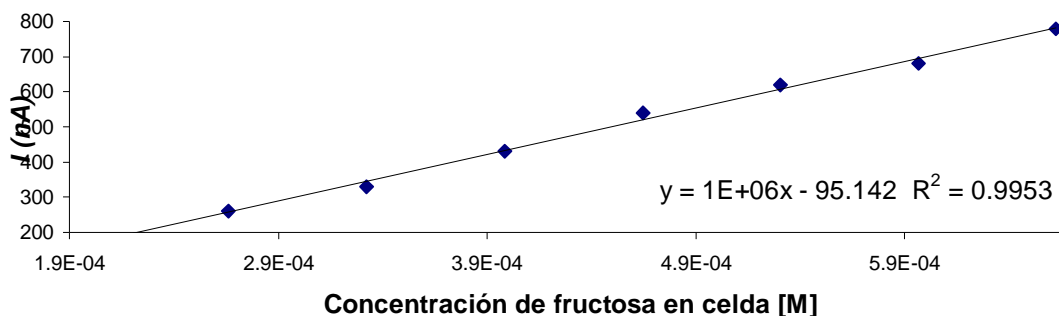


Figura 23 Curva de calibración de la voltamperometría de impulsos diferenciales de fructosa en zona de oxidación en 75mL de LiClO_4 (velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $\text{EDG}_{\text{Au}}/\text{ECS}$, impulso 50 mV) en 825 mV).

Se observa que el perclorato de litio (LiClO_4) es un medio óptimo para ver la reducción y oxidación de la fructosa, por lo que se puede medir la concentración. La mejor respuesta se obtiene en reducción puesto que el procedimiento para determinar la oxidación con electrodo sólido es difícil ya que en cada determinación hay que pulir la superficie debido a la adsorción de la fructosa sobre la superficie de oro, por lo que la reproducibilidad se ve afectada al modificar constantemente las condiciones de experimentación.

5.3.1.2. Glucosa

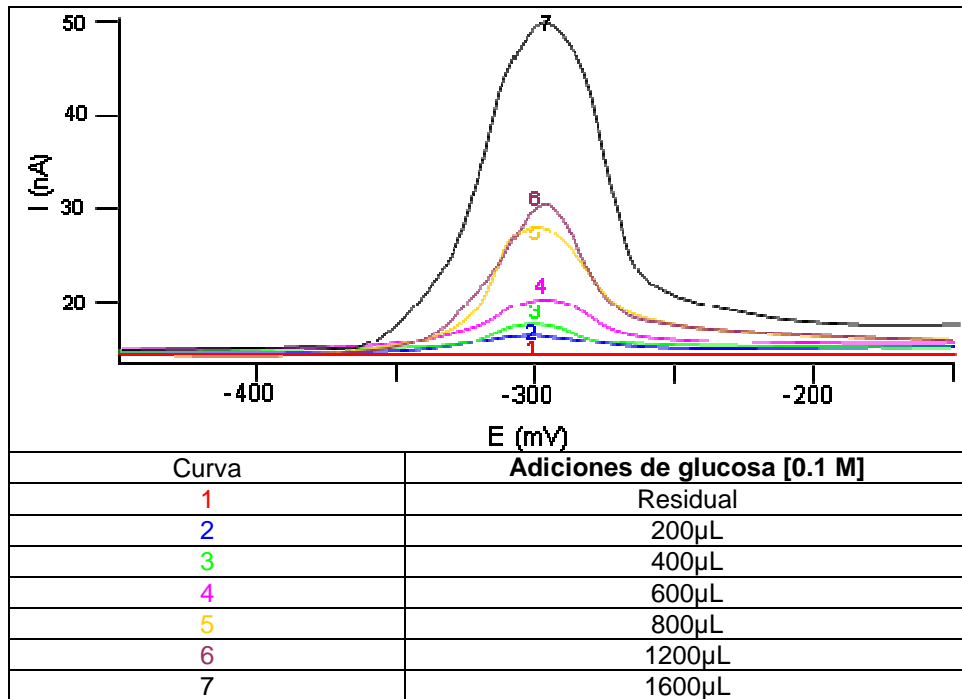


Figura 24 Polarogramas diferencial de impulsos (DPP) de glucosa [0.1 M] en 2.0 mL de LiClO_4 [0.1 M] a 60 °C (EGM/ECS DPP, velocidad de barrido 4 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -25 mV).

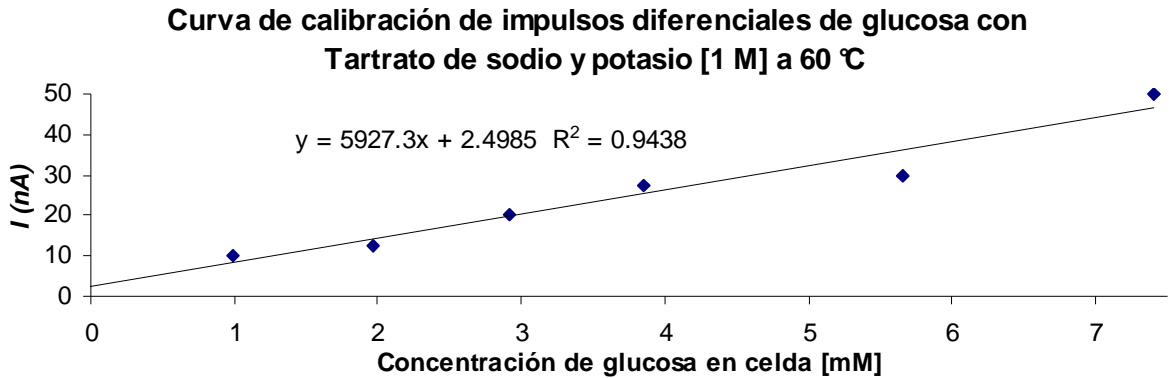


Figura 25. Curva de calibración de glucosa [0.1 M] en 20 mL de tartrato de sodio y potasio [0.1M]. con impulso de 50 mV (DPP) en -300 mV.

Las señales se obtienen con más dificultad pues deben trazarse más rápido porque debido a la temperatura la evaporación del disolvente puede provocar cambios en la concentración. Estas dificultades se ven reflejadas en el coeficiente de correlación mostrado en la figura 25, que no es tan bueno como el de la figura 23 de fructosa; sin embargo, es aceptable.

5.3.2. Determinación inversa de hidratos de carbono en presencia de un agente oxidante.

Los azúcares reductores reaccionan con agentes oxidantes como los iones de los metales de transición tales como Cu, Ag y Fe.

Al adicionar en su forma oxidada algún ión de metal de transición, podemos observar la señal de reducción del ión metálico, por lo que puede esperarse que al adicionar un hidrato de carbono reductor, esta señal disminuya proporcionalmente a la cantidad adicionada hasta que se llegue a un límite impuesto por el sistema de hidrato de carbono — ión metálico.

En la figura 26, se presenta las adiciones de Fe^{3+} y la aparición de la señal de reducción de $\text{Fe}^{\text{III}+}$ a $\text{Fe}^{\text{II}+}$.

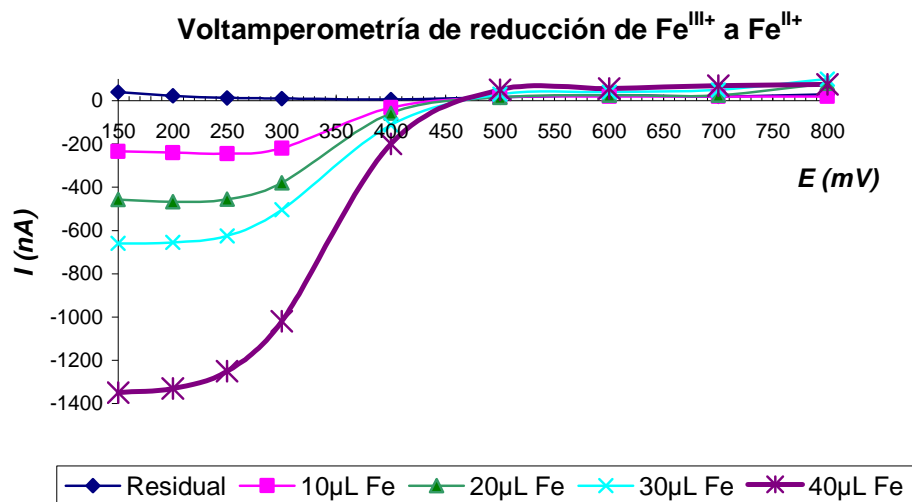


Figura 26. Voltamperogramas de la reducción de $\text{Fe}^{\text{III}+}$ a $\text{Fe}^{\text{II}+}$ por adiciones de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ [0.1 M] en 25 mL de H_2SO_4 [0.5 M] (EDG_{Au} /ECS velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

Al adicionar $\text{Fe}^{\text{III}+}$ se incrementa la señal de reducción, pero la adición de 40 μL pierde la proporcionalidad; por lo que la señal registrada no da certidumbre de la relación de intensidad de corriente con la cantidad adicionada de $\text{Fe}^{\text{III}+}$.

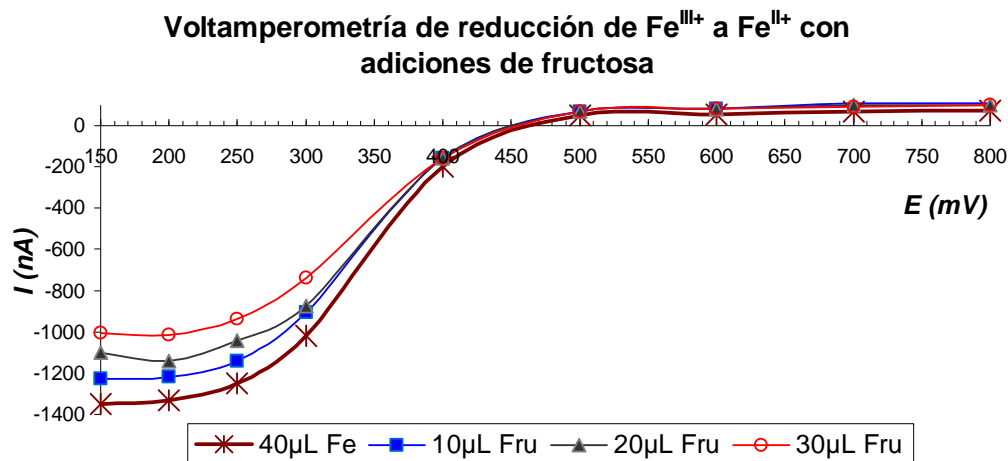


Figura 27. Curvas voltamperométricas para la valoración inversa de fructosa. Disminución de la señal de reducción de Fe^{III} a Fe^{II} por adiciones de fructosa [0.001 M] en 25 mL de H_2SO_4 [0.5 M] (EDG_{Au} /ECS velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

El efecto de la adición de fructosa se ve en la disminución de la señal de reducción del Fe^{III} . La fructosa reaccionó con el Fe^{III} disponible haciendo que la cantidad de éste disminuyera y por ende su señal de reducción.

En las siguientes figuras se presenta el análisis matemático¹⁹ de concentración vs. intensidad de corriente para ver la linealidad de la adición sucesiva de Fe^{III} (a partir de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$).

Curva de calibración de Fe^{III} (400 mV) a temperatura ambiente.

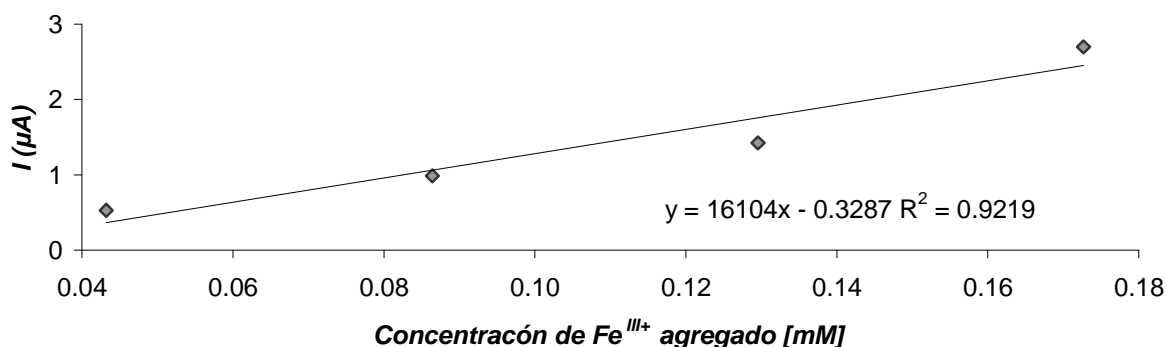


Figura 28. Curva de calibración de reducción de Fe^{III} por adiciones de fructosa [0.1M] a temperatura ambiente en 25 mL de H_2SO_4 [0.5 M] (EDG_{Au} /ECS en 400mV velocidad de barrido a $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

¹⁹ Miller J. C., Miller H.N. *Estadística para química analítica*. 4ª ed. Prentice Hall, España, 2000 p.296

La curva de calibración corresponde a los datos obtenidos de la figura 25 en 400mV (las mediciones se hicieron en éste potencial por ser las que presentaban mejor comportamiento lineal para la curva de calibración). Posteriormente se analiza la linealidad de las adiciones de fructosa de los voltamperogramas de la figura 27y los resultados se presentan en la figura 29.

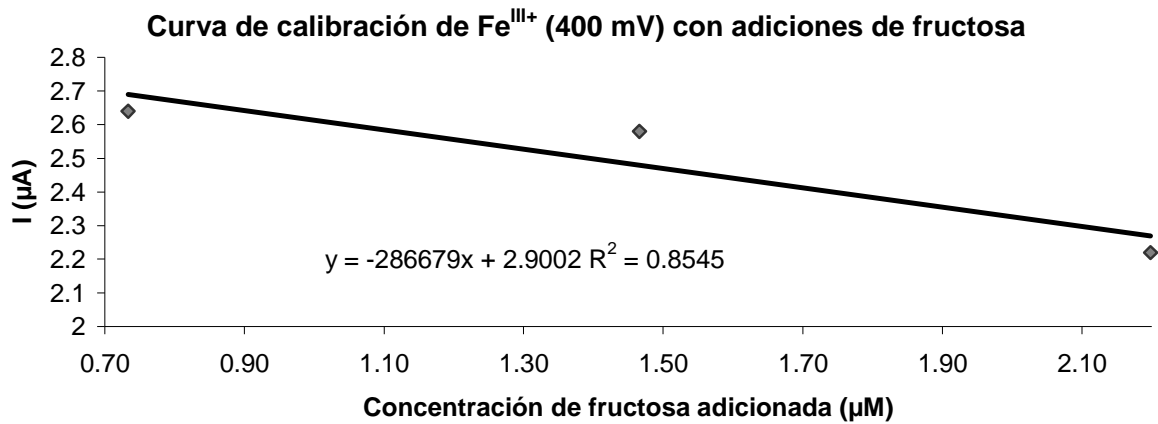


Figura 29. Curva de calibración de reducción de Fe^{III+} a Fe^{II+} con adiciones de fructosa [0.001 M] a temperatura ambiente en 25mL de H₂SO₄ [0.5 M] (EDG_{AV}/ECS velocidad de barrido a 4 mV·s⁻¹).

Puede observarse cómo es evidente que las adiciones de fructosa provocan la disminución en la concentración de Fe^{III+}, a pesar de la baja concentración de fructosa. En la figura 27 se ve el voltamperograma correspondiente para el análisis de curva de calibración.

El valor de r^2 en la figura 29 denota que aunque la baja concentración de fructosa da respuesta con el Fe^{III+} no se tiene una buena tendencia lineal.

Esta metodología se descartó debido a que:

- El electrodo sólido había que estarlo puliendo en cada adición de carbohidrato. Como anteriormente se señaló no es conveniente alterar las condiciones de reacción por adición de problema.
- No es una determinación directa y el agente oxidante puede reaccionar con otras sustancias además de los hidratos de carbono.

Análogamente se hizo el mismo análisis con Ag^{1+} en H_2SO_4 [0.5 M] presentándose un fenómeno similar de no proporcionalidad y con Cu^{2+} tanto en medio alcalino con $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ [1 M] como con un escalamiento de la reacción de Fehling sin éxito en la proporcionalidad.

5.4. Cuantificación de azúcares en miel.

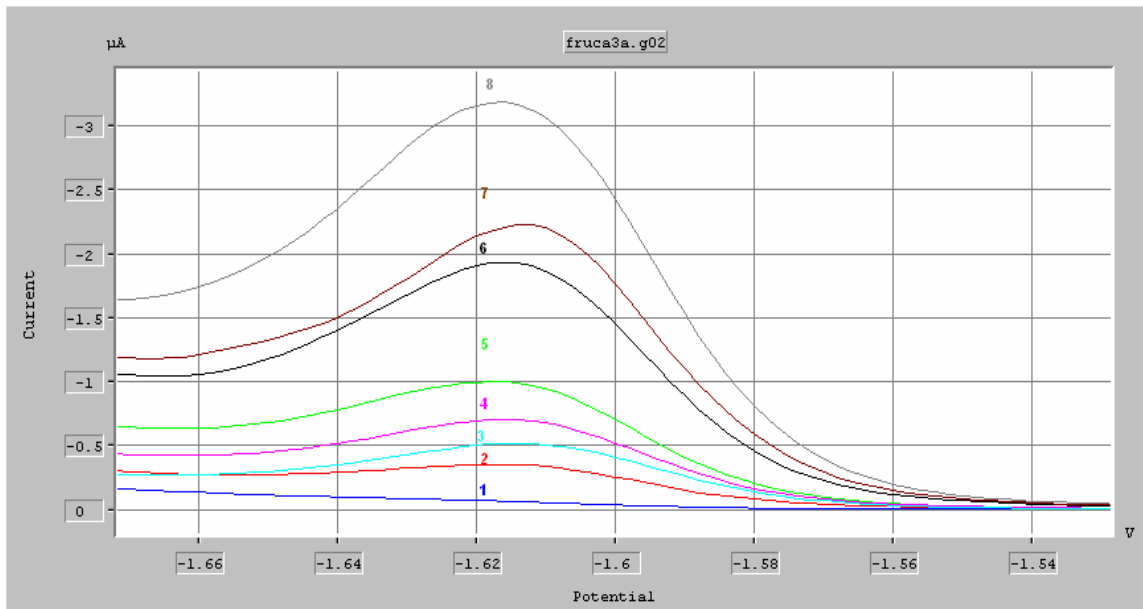
5.4.1. Determinación de carbohidratos directos en CaCl_2

Para la determinación de hidratos de carbono primeramente se buscó el dominio de electroactividad y después la zona de potencial donde se encuentra la señal correspondiente al hidrato de carbono en estudio.

Se estudió primero la fructosa a temperatura ambiente; para la glucosa no se observó señal alguna en los diferentes medios a temperatura ambiente. Posteriormente se probó con una mezcla equimolar para confirmar que la glucosa no influyera en la señal de fructosa.

El estudio se hizo con la técnica de polarografía diferencial de impulsos (DPP) puesto que la metodología clásica (DC) es insuficiente pues se empalman señales no permitiendo cuantificar la reducción de la fructosa.

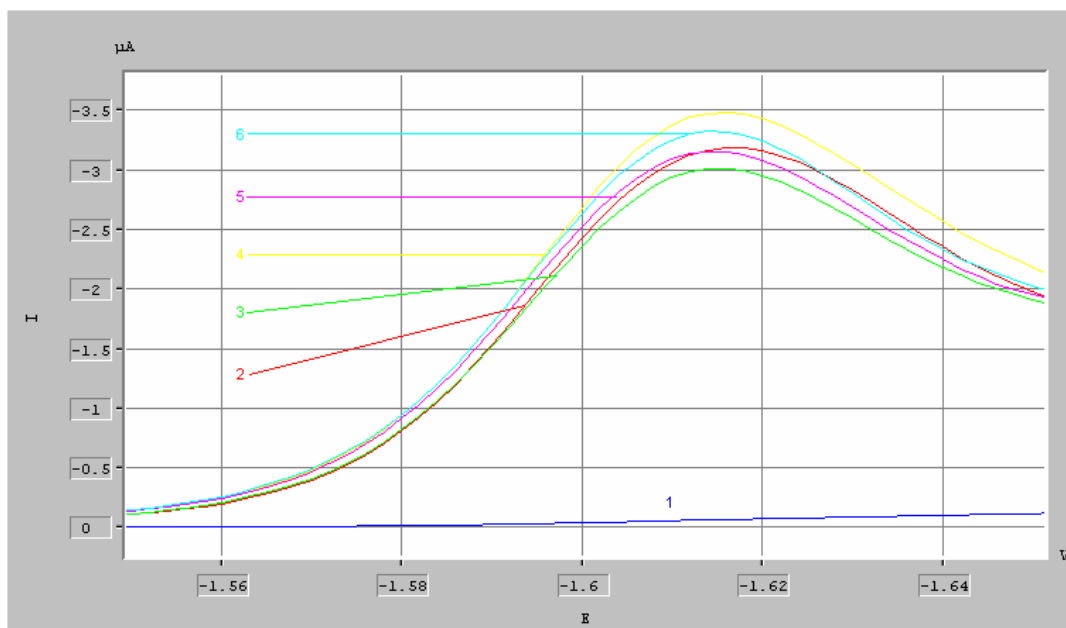
Se colocaron 8 mL de electrolito soporte (disolución de CaCl_2 [1 M]). El dominio de electroactividad en este medio va de +250 a -2100 mV; la señal de fructosa en este medio se presenta aproximadamente en -1.600 mV, por lo que se estudió la zona de potenciales de -1500 a -1700 mV.



Curva	Adiciones de fructosa [0.1 M]
1 —	0mL
2 —	0.02 mL
3 —	0.06 mL
4 —	0.08 mL
5 —	0.10 mL
6 —	0.15 mL
7 —	0.20 mL
8 —	0.25 mL

Figura 30. Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de adiciones fructosa [0.1 M] en 8 mL de CaCl_2 [1 M] a temperatura ambiente, velocidad de barrido $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -5 0mV y Ag/AgCl/KCl como referencia.

En el polarograma se observa cómo se incrementa la intensidad de corriente con las adiciones sucesivas de la concentración de fructosa en el medio.



Curva	Adiciones de glucosa [0.1 M]
1	0 mL
2	0.25 mL fructosa [0.1 M]
3	0.05 mL
4	0.10 mL
5	0.20 mL
6	0.25 mL

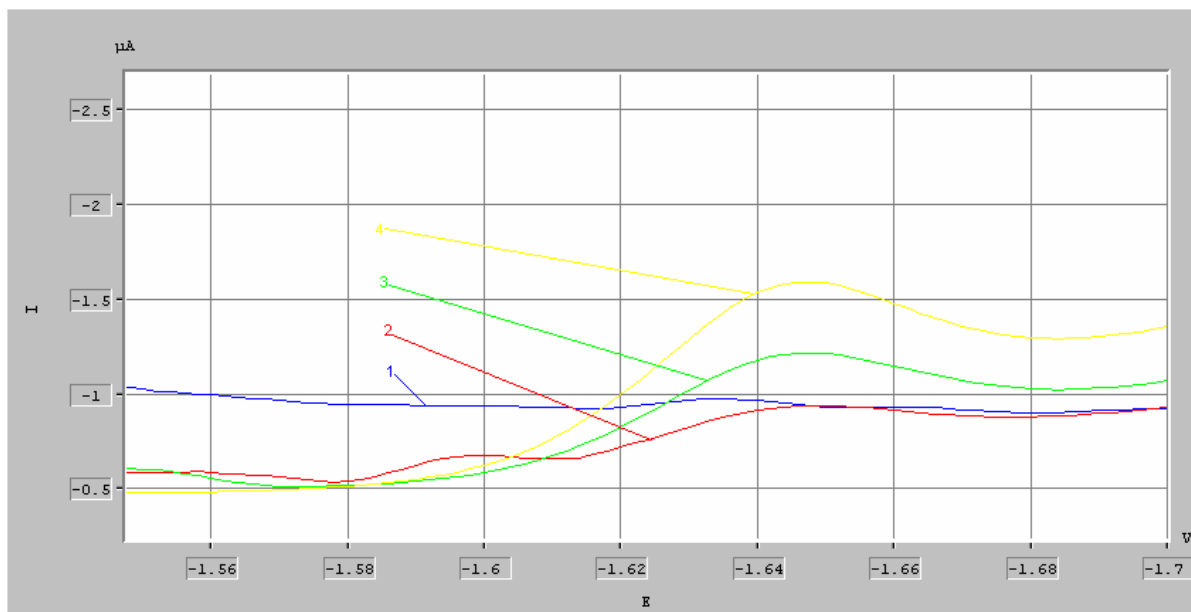
Figura 31. Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de adiciones de glucosa [0.1 M] en 8 mL de CaCl_2 [1 M] a temperatura ambiente, velocidad de barrido $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -50 mV y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

Como puede observarse en la figura 31 la glucosa a temperatura ambiente no modifica prácticamente la intensidad de la señal de fructosa pues las variaciones observadas con aleatorias y sin proporción.

Por lo tanto, esta técnica es la que se empleará para la determinación de fructosa en las muestras de miel.

Primero se hacen adiciones de miel diluida de concentración conocida (del orden de $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) hasta que se define la señal correspondiente a la fructosa. Posteriormente se adicionan alícuotas de disolución patrón [0.1 M] de fructosa, comprobándose así, por un lado, que la señal identificada corresponde a la fructosa y por otro, con un análisis de regresión

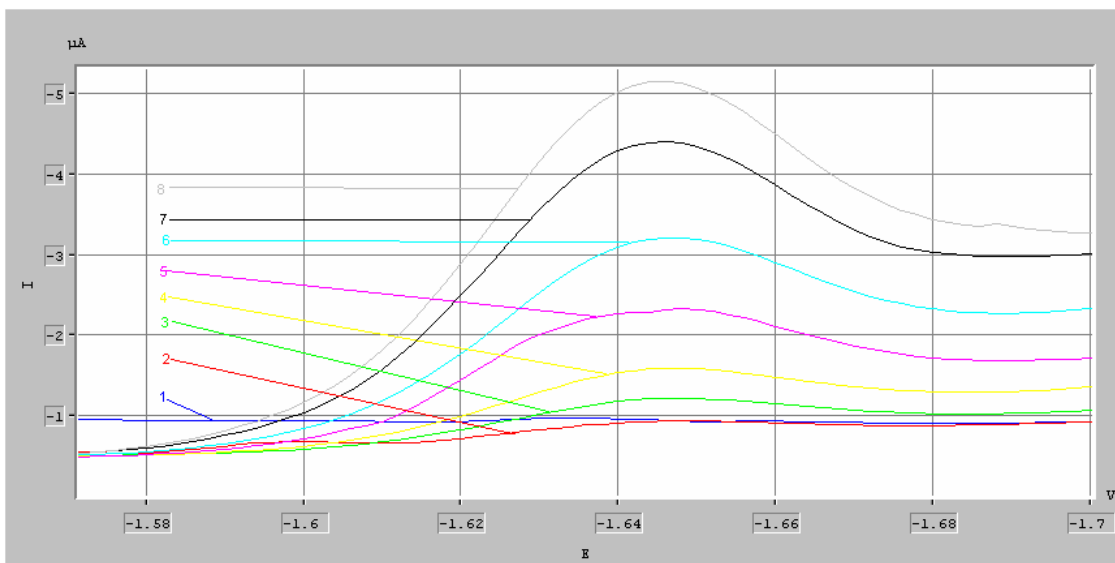
lineal de adiciones patrón, se obtiene la cantidad de fructosa en la miel estudiada. A manera de ejemplo, se muestra el análisis realizado a la muestra 6.



Curva	Adiciones de miel (muestra 6, $0.0497 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
1 —	0 mL
2 —	0.02 mL miel
3 —	0.04 mL miel
4 —	0.06 mL miel

Figura 32. Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) de miel (muestra 6, $0.0497 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) en 8 mL de CaCl_2 [1 M] a temperatura ambiente, velocidad de barrido $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -50 mV y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

Las adiciones sucesivas de miel indican la aparición de la señal de fructosa cerca del potencial visto anteriormente. En la 3ª adición de miel se observa cómo la señal de fructosa se define adecuadamente y entonces se procede a adicionar fructosa QP.



Curva	Disolución
1 —	0mL
2 —	0.02 mL miel
3 —	0.04 mL miel
4 —	0.06 mL miel
5 —	0.03 mL fructosa
6 —	0.06 mL fructosa
7 —	0.09 mL Fructosa
8 —	0.12 mL Fructosa

Figura 33. Polarogramas de impulsos diferenciales (DPP) Determinación de fructosa en miel (muestra 6, $0.0497 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) por adiciones patrón de fructosa $[0.1 \text{ M}]$ por el método de adiciones patrón. Medio: 8 mL de $\text{CaCl}_2 [1 \text{ M}]$ a temperatura ambiente, velocidad de barrido $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, impulso -50 mV y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

En los polarogramas resultantes, se lee la intensidad de corriente de pico para cada adición y se le sustrae la intensidad de la curva residual. Con los datos obtenidos se realizó el siguiente gráfico de intensidad de corriente (nA) contra la cantidad añadida de fructosa (μg) a la celda electroquímica. Se emplearon 0.06 mL ($60 \mu\text{L}$) de miel a una concentración de $0.0497 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (para un total adicionado de 2.982 mg de miel). Se hicieron 4 adiciones de $30 \mu\text{L}$ de una disolución de fructosa ($\text{PM} = 160.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) patrón $[0.101 \text{ M}]$ para un total de 1.94 mg de fructosa adicionada.

Curva de calibración de los polarogramas (DPP) de miel con adiciones patrón de fructosa

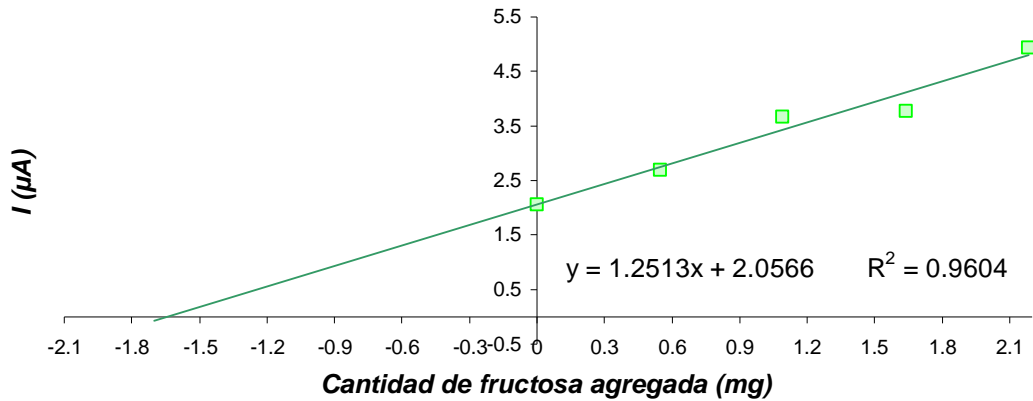


Figura 34. Curva de calibración de los polarogramas de impulsos diferenciales de miel (muestra 6, 0.0497 g·mL⁻¹) con fructosa [0.101 M] por adiciones patrón.

De la curva de calibración se toman los datos de linealidad para obtener la cantidad de fructosa en la muestra de miel

Tabla 9. Análisis lineal para la curva de adiciones patrón en la determinación de fructosa en miel (muestra 6, 0.0497 mg·µL⁻¹) CaCl₂ en muestra 6 de miel.

Análisis por regresión lineal de contenido de fructosa en miel		
Pendiente	1.2513	$r^2 = 0.9604$
Ordenada	2.0566	
Cant contenida en muestra	1.644	mg Fructosa
Porcentaje	55.12	Fructosa en miel

El valor de 1.644 se obtiene al dividir la ordenada al origen entre la pendiente al hacer el despeje de la ecuación de la recta. Este valor representa la cantidad (en mg) de fructosa en muestra y corresponde a un 55.13% del total de la masa de miel agregada de 2.982mg

Tabla 10. Análisis de fructosa en muestra 6 de miel.

Fructosa en muestra 6	
Cantidad miel (mg)	2.982
Fructosa en miel (mg)	1.644
Fructosa (%)	55.13

Análogamente se realizó el mismo estudio para todas las muestras de miel. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente.

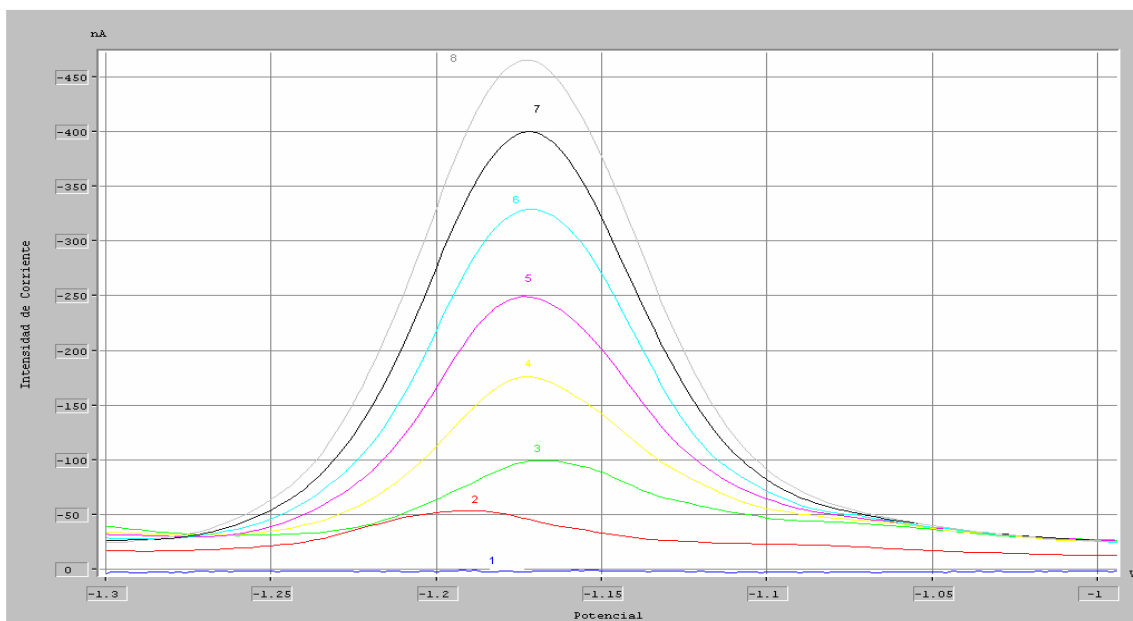
Tabla 11 Resultados del análisis de fructosa en las diferentes muestras de miel estudiadas

MUESTRA	FRUCTOSA EN MIEL (%)
1	51.72
2	35.80
3	39.84
4	43.03
5	13.10
6	55.13
7	21.17
8	25.22

5.5 Cuantificación de HMF en miel de abeja³.

Para la determinación de HMF en muestras de miel se utilizó la polarografía diferencial de impulsos con el método de adiciones patrón de la siguiente manera: se colocaron 8 mL de electrolito soporte (disolución amortiguadora de pH (buffer) de boratos a pH = 9). El dominio de electroactividad en este medio va de +300 a -1450 mV; la señal de HMF en este medio se presenta aproximadamente en -1.175 mV, por lo que se estudió la zona de potenciales de -1000 a -1300 mV. Primero se hacen adiciones de miel diluida de concentración conocida (del orden de 500 mg de miel por mL) hasta que se define la señal correspondiente al HMF. Posteriormente se adicionan alícuotas de disolución patrón [0.01 M] de HMF; comprobándose así que la señal identificada corresponde al HMF y con un análisis de regresión lineal de adiciones patrón se obtiene la cantidad de HMF en la miel estudiada. A manera de ejemplo, se muestra el análisis realizado a la muestra 5.

³ La determinación se realizó tomando como base la tesis: Juárez, D. *Determinación electroquímica de HMF (5(hidroximetil)-2-furancarboxaldehido en miel de abeja* Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, (2003) y el artículo Reyes O. *Direct Electrochemical Determination of Hydroxymethylfurfural (HMF) and its application to honey samples* Analytical letters, 39:161-171, (2006).



Curva	Disolución
1 —	0 mL
2 —	1 mL miel
3 —	2 mL miel
4 —	25 µL HMF
5 —	50 µL HMF
6 —	75 µL HMF
7 —	100 µL HMF
8 —	125 µL HMF

Figura 35. Polarogramas diferencial de impulsos para la determinación de HMF en miel (muestra 5, $0.501 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por adiciones patrón de HMF [0.01 M] en 8 mL de disolución amortiguadora de boratos a $\text{pH} = 9$, velocidad de barrido $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ impulso -50 mV y $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ como referencia.

En los polarogramas resultantes, se lee la intensidad de corriente de pico para cada adición y se le sustrae la intensidad de la curva residual. Con los datos obtenidos se realizó el siguiente gráfico de intensidad de corriente (nA) contra la cantidad añadida de HMF (μg) a la celda electroquímica. Se emplearon dos mililitros de miel a una concentración de $0.501 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (para un total adicionado de 1.002 g de miel). Se hicieron 5 adiciones de una disolución de HMF patrón para un total de $157.64 \mu\text{g}$ de HMF adicionado.

Determinación de HMF por adiciones patrón en miel (muestra 5)

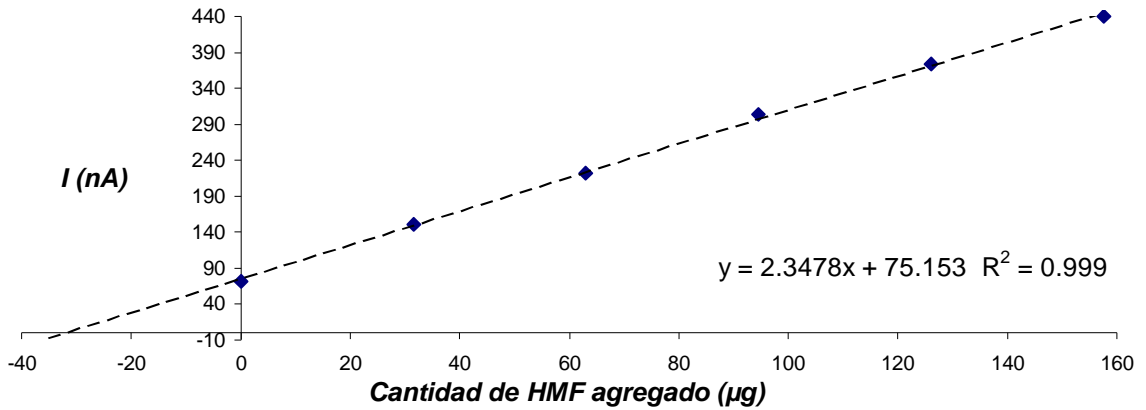


Figura 36. Curva de calibración de los polarogramas de impulsos diferenciales de miel (muestra 5, 0.501 g·mL⁻¹) con HMF [0.01 M] por adiciones patrón.

Con la extrapolación de la recta al cruce con el eje de las abscisas se obtiene la cantidad en µg de HMF presentes en la muestra de miel evaluada

Tabla 12. Análisis de HMF en muestra 5 de miel de abeja.

HMF en muestra 5	
Cantidad miel (g)	1.002
HMF (µg)	32.01
HMF (ppm)	31.95

Análogamente se realizó el mismo estudio para todas las muestras de miel. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente

Tabla 13. Contenido de HMF en las muestras de miel de abeja estudiadas.

MUESTRA	HMF (ppm)
1	19.818
2	59.566
3	39.967
4	38.553
5	31.944
6	35.375
7	19.794
8	34.457

El límite de HMF⁴ para una miel envasada en menos de 6 meses es de 40 ppm y para más de 6 meses 80 ppm para ser comercializada. Sólo la muestra 2 presenta altos niveles de HMF por lo que su aceptación sería dudosa.

5.6. Estudios adicionales en miel de abeja.

Este trabajo se completa con los estudios fisicoquímicos complementarios que están incluidos en las pruebas de plataforma con determinaciones fisicoquímicas tales como pH, humedad por refractometría y cenizas por conductimetría.

5.6.1. Humedad

La determinación de humedad se hace con el refractómetro en °Brix y se realiza con la miel sin ningún tratamiento. La lectura del refractómetro directamente da la lectura en °Brix, Esta lectura se corrige por la temperatura a la que fue hecha la lectura (25°C), en este caso el factor de corrección es de 0.38°Brix (el refractómetro esta calibrado a 20°C) que se adicionan al valor de lectura dado por el refractómetro. A 100 se le sustrae °Brix corregidos para obtener el por ciento de humedad. Esto puede ayudar a los productores pues la determinación se puede hacer al momento de cosechar la miel y el refractómetro no requiere mayor entrenamiento para su uso ni en la interpretación del resultado.

Tabla 14. Resultados de °Brix y % de Humedad.

Muestra	°Brix medidos	°Brix corregidos	% Humedad
1	79.0	79.4	20.6
2	78.6	79.0	21.0
3	76.0	76.4	23.6
4	77.6	78.0	22.0
5	83.8	84.2	15.8
6	79.2	79.6	20.4
7	80.2	80.6	19.4
8	79.8	80.2	19.8

5.6.2. Por ciento de cenizas

⁴ <http://www.senasica.sagarpa.gob.mx/miel/lineamientos.htm>

Se prepararon disoluciones de concentración aproximada a $0.1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se midió el valor de conductividad específica en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. El valor obtenido se corrige con la sustracción de conductividad del agua desionizada empleada. El valor corregido se introduce en la fórmula para la determinación de porcentaje de cenizas como conductividad específica.

$$\% \text{Cenizas} = [\text{Conductividad específica (mS}\cdot\text{cm}^{-1}) - 0.14] \div 1.74$$

Tabla 15. Resultados de conductividad y % de Cenizas.

Muestra	Concentración ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Conductividad ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)	% Cenizas
1	0.11576	0.264	0.071
2	0.10352	0.430	0.166
3	0.10050	0.298	0.091
4	0.10976	0.367	0.131
5	0.10306	0.185	0.026
6	0.10140	0.038	0.022
7	0.10389	0.430	0.166
8	0.10088	0.781	0.369

El valor máximo de porcentaje de cenizas es de 0.8% por lo que todas las mieles estudiadas están dentro de las especificaciones e intervalos de aceptación para esta prueba.

5.6.3. pH

El valor del pH se determinó con la dilución de miel para cenizas y se leyó el valor en el potenciómetro, previa calibración con disoluciones amortiguadoras de $\text{pH} = 4$ y $\text{pH} = 7$ para ajuste de la pendiente.

Tabla 16. Resultados de pH.

Muestra	Concentración ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	pH
1	0.11576	3.8
2	0.10352	4.1
3	0.10050	4.36
4	0.10976	3.8
5	0.10306	3.75
6	0.10140	3.64
7	0.10389	3.9
8	0.10088	4.8

Tabla 17. Resultados de pruebas fisicoquímicas adicionales

MUESTRA	% HUMEDAD	% CENIZAS	pH
1	20.6	0.071	3.8
2	21.0	0.166	4.1
3	23.6	0.091	4.36
4	22.0	0.131	3.8
5	15.8	0.026	3.75
6	20.4	0.022	3.64
7	19.4	0.166	3.9
8	19.8	0.369	4.8

La tabla 17 muestra globalmente el comportamiento de miel tanto artesanal como comercial evaluada por métodos fisicoquímicos.

5.7. Tabla de resultados finales globales.

En la siguiente tabla se resumen los resultados que se obtuvieron en el desarrollo del trabajo experimental.

Tabla 18. Resultados del estudio electroquímico de hidratos de carbono

Resultados voltamperométricos y potenciométricos en muestras de miel						
Muestra	Humedad (%)	Refractometría (% azúcares totales)	Potenciometría	Voltamperometría		% Fructosa en azúcares reductores
			Reacción de Fehling (% azúcares reductores)	Polarografía en CaCl₂ 1M (% Fructosa en miel)	Polarografía en Buffer pH=9 (HMF ppm)	
1	20.6	79.4	79.42	51.72	19.818	51.72
2	21.0	79.0	70.54	35.80	59.566	35.80
3	23.6	76.4	46.82	39.84	39.967	39.84
4	22.0	78.0	84.39	43.03	38.553	43.03
5	15.8	84.2	77.18	13.10	21.298	13.10
6	20.4	79.6	68.40	55.12	35.375	55.13
7	19.4	80.6	76.46	22.39	19.794	21.17
8	19.8	80.2	81.40	25.22	34.457	25.22

Según el **PLIEGO DE CONDICIONES PARA EL USO DE LA MARCA OFICIAL MÉXICO CALIDAD SUPREMA EN MIEL** basado en la norma oficial mexicana para miel (NMX-F-036-1997 (ALIMENTOS-MIEL-ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA) se tienen los siguientes parámetros:

Tala 19. Especificaciones permitidas por NMX-F-036-1997 (ALIMENTOS-MIEL-ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA).

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Contenido aparente de azúcar reductor expresado como % (g/100g) de azúcar invertido.	63.88	—
Contenido de glucosa % (g/100g).	—	38.0
Humedad % (g/100g).	—	20.0
Cenizas % (g/100g).	—	0.60
Hidroximetilfurfural (HMF), expresado en mg/kg en miel envasada de más de 6 meses	—	80.0
Hidroximetilfurfural (HMF), expresado en mg/kg en miel envasada de menos de 6 meses	—	40.0

De los análisis realizados se puntualiza que:

Todas las mieles cumplen con el mínimo de azúcares reductores y el máximo permitido de cenizas. Salvo la muestra 2, todas las mieles están por debajo de 40.0 mg/kg de HMF en miel (40ppm). Las mieles 1, 2, 3, 4 y 6 no cumplen con el requerimiento de humedad. En este estudio se pide glucosa y no fructosa que es el monosacárido mayoritario en miel.

6

Conclusiones

6.1. Conclusiones

- Es posible realizar la determinación potenciométrica de los hidratos de carbono reductores con el método de Fehling; esta determinación cuantifica los monosacáridos mayoritarios de la miel: fructosa y glucosa.
- La valoración potenciométrica permitió comprobar que la estequiometría de la reacción de Fehling, entre el hidrato de carbono y el ión cúprico es 1: 5.
- El conocimiento de la estequiometría de la reacción permite realizar la valoración potenciométrica para determinar la concentración de azúcares reductores totales sin necesidad de recurrir a las tradicionales tablas de equivalencia de Fehling.
- El reactivo de Fehling no es específico para glucosa o fructosa y únicamente permite cuantificar azúcares reductores totales.
- Es posible determinar selectivamente la concentración de fructosa en mieles por el método de polarografía diferencial de impulsos; se utiliza como electrolito soporte una disolución acuosa de CaCl_2 [1 M] y se mide la señal de pico en un valor de potencial cercano a -1.6 V, con respecto al electrodo de referencia de plata/cloruro de plata. Este valor puede variar en un intervalo de potencial pequeño dependiendo de la muestra de miel. En este medio la glucosa no interfiere en la señal ni con el electrodo de mercurio ni con el electrodo giratorio de oro o de platino.

- La glucosa puede ser detectada y determinada con el electrodo giratorio de oro a temperaturas superiores a 60 °C en LiClO₄ [1 M]. El estudio de mezclas de glucosa y fructuosa en mieles, a temperaturas más elevadas, no fue objeto del presente trabajo.
- La determinación conductimétrica de disoluciones acuosas de diversas mieles proporciona resultados equivalentes a los que se obtienen al calcinar la miel y determinar las cenizas. Esta forma de determinación resulta más rápida, sencilla y requiere de pequeñas cantidades de muestra.
- La determinación de HMF por polarografía en medio amortiguado de boratos a pH = 10 da un índice de calidad de la miel contemplado en la NMX-F-036-1997 (Alimentos-miel-especificaciones y métodos de prueba para el análisis rutinario de miel), por lo que su determinación es importante.
- Los resultados obtenidos muestran que las técnicas electroanalíticas empleadas presentan una buena alternativa para la realización de algunas de las pruebas de plataforma propuestas por la AOAC, Codex Alimentarius y NMX-F-036-1997.
- El contenido de HMF refleja la calidad en el proceso de extracción, envasado y almacenamiento de la miel. El método electroquímico empleado en este trabajo, permitió cuantificar con seguridad y de manera sencilla el contenido de HMF en las muestras de miel, cuantificación mucho más complicada con respecto a cualquiera de los otros métodos conocidos para ello.

6.2. Perspectivas.

Continuar el estudio para la detección y cuantificación conjunta de glucosa y fructosa por polarografía o voltamperometría en muestras de miel. Este estudio implica la búsqueda de medios acuosos o no acuosos, otros electrodos y/o electrolitos soportes diferentes y temperaturas superiores a las de medio ambiente.

7

Bibliografía

7.1. Bibliografía

- 1 Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001, Información comercial-Etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones. Diario Oficial, 23 de abril 2001. p3.
2. Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española. 20ªed. Espasa-Calpe. España. Vol. II p.907 (1984).
- 3 <http://es.wikipedia.org/wiki/Apicultura> (25/05/07).
- 4 NMX-F-036-1997 ALIMENTOS-MIEL-ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.
- 5 <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAmiel.htm> (25/05/07).
- 6 Instituto Nacional de la Nutrición (Chávez y colaboradores, 1992).
- 7 Belitz, H. Grosh, W. Food Chemistry. 2ªed. Springer. Alemania p 824. (1999).
- 8 Walstra, P. Physical chemistry of foods Dekker, EE.UU. pp. 807 (2003).
- 9 Shriner, R., Fuson, R., Curtin, D. Identificación sistemática de compuestos orgánicos Limusa –Willey S.A. México p.132 (1972),
- 10 Wade, L. Organic Chemistry 6ªed, Pearson Prentice Hall. EE.UU. p1114-1118 (2006),
- 11 C. A. Browne, C. Zerban F. Physical and chemical methods of sugar analysis : a practical and descriptive treatise for use in research, technical, and control laboratories: J. Wiley, EE.UU. pp744-749,(1941).
- 12 AOAC Oficial methods of análisis EE.UU: 16ªed. Cap. 44, pp20-22 (1995)
- 13 Fennema, O. Química de Alimentos. Acribia , España. p.100. (1993).
- 14 Ringbom A. "Formación de complejos en Química Analítica." Alhambra, Madrid , p334 (1979).
- 15 Overend, W., Peacocke, A. y Smith, J. Reactions at position 1 of carbohydrates. Part I. The polarographic reduction of carbohydrates. J. Chem. Soc. p.347-349. (1961).
- 16 Reyes O. Direct Electrochemical Determination of Hydroxymethylfurfural (HMF) and its application to honey samples Analytical letters, 39:161-171, (2006).

- 17 Juárez, D. Tesis: *Determinación electroquímica de HMF (5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído) en miel de abeja*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México (2003)
18. Vorwohl, G. *Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft*. In: Ann. de Abeille 7, 301-309 (1964).
19. Miller J. C., Miller H.N. *Estadística para química analítica*. 4ª ed. Prentice Hall, España, p.296 (2000)
20. *Dictionary of organic compounds* Chapman & Hall E.E.U.U. 5ªed vol. III pp2688, 2754 -57, 2760-61, 3623 (1982).
21. Meites, L.; Zuman, P. y Rupp, *ECRC Handbook series in Organic Electrochemistry*. CRC Press E.E.U.U. Vol I pp. 248-249. (1982).
22. <http://www.senasica.sagarpa.gob.mx/miel/lineamientos.htm> (25/05/07)
23. **Codex Alimentarius** *Standard for Honey*, Ref. Nr. CL 1993/14-SH FAO and WHO, Rome (1993).
24. **Codex Alimentarius** *Draft revised for honey at step 6 of the Codex Procedure*. CX 5/10.2, CL 1998/12-S, (1998).
25. Severinghaus, J. Astrup,P. *History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode* Journal of Clinical Monitoring and Computing. Vol 2, 2, April, (1986).
26. Electrochemistry Enciclopedia: <http://electrochem.cwru.edu/ed/encycl/> (25/05/07)
27. **General standard for food additives** CODEX STAN 192-1995 (Rev. 6-2005) pp174
28. **Revised Codex Standard for honey** CODEX STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001) p7.
29. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates.html> (25/05/07)
30. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/promiel9601.htm> (25/05/07)
31. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/FTP/invapi.pdf> (25/05/07)

32. Ojeda, G., et al. Characterization of honey produced in Venezuela Food Chemistry, Vol 84, 4. p. 499-502. (2004).
33. Cotte, J., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M. Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity Journal of Chromatography. A, Vol 1021, 1-2. p. 145-155. (2003).
34. Stanisław, P. Identification of honey types. Die Nahrung, Vol 47, 1. p 39-40. (2003).
35. Serra-Majem, L. et al. Comparative analysis of nutrition data from national, household, and individual levels: results from a WHO-CINDI collaborative project in Canada, Finland, Poland, and Spain Journal Of Epidemiology And Community Health, Vol 57, 1. p. 74-80. (2003).
36. Busserolles, J., et al. Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. The Journal Of Nutrition, Vol. 132, 11, November. p. 3379-3382. (2002).
37. Mendes, E. et al. Quality evaluation of Portuguese honey Carbohydrate Polymers, Vol. 37, 3. p. 219-223. (1998).
- 38 Goodall, I., et al. Contribution of high-performance liquid chromatographic analysis of carbohydrates to authenticity testing of honey. Journal of Chromatography A, Vol. 706, 1-2, 7 July. p. 353-359. (1995).

Figuras

Figura1. Pintura rupestre encontrada en la Cueva de la Araña en España. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Cueva_arana.jpeg (25/05/07)

Figura 2. Representación de Ah Muzencab, el dios abeja <http://www.sacred-texts.com/nam/maya/cbc/cbc06.htm> (25/05/07)

ANEXOS

Anexo A

Electroquímica Analítica

La IUPAC¹ (International Union of Pure and Applied Chemistry) ha propuesto un esquema general para las técnicas electroquímicas tomando como base la reacción al electrodo.

Cuando esta reacción tiene una excitación de señal constante o cero (potenciometría, amperometría) o si es variable. Cuando es variable puede considerarse grande cuando es al menos el doble del término $2.3RTn^{-1}F^{-1}$ ² esto se presenta en voltamperometría y polarografía.

La voltamperometría es una técnica en la que se relaciona la corriente y el voltaje en un electrodo de trabajo. El potencial que se impone a la celda, vía el electrodo de trabajo, varía con el tiempo y el parámetro de medición es el flujo de corriente. Si se mide la corriente directa (clásica), entonces el cambio de potencial en el tiempo es lo suficientemente lento para tener una respuesta cuantitativa y poderse describir con ecuaciones de equilibrio. Para el caso de polarografía esta se diferencia de la voltamperometría por el uso del electrodo de gota mercurio (EGM) que se basa en el goteo de pequeñas gotas de mercurio a través de un capilar de diámetro conocido.

La polarografía aun es muy usada puesto que ofrece muchas ventajas.

1. Se emplea el EGM en disoluciones no agitadas
2. Puede estudiarse sin mucha interferencia la reducción de muchas sustancias a partir de disoluciones ácidas, esto es debido al sobrevoltaje para formación de Hidrógeno elemental a partir de iones H^+ .

¹ http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/

² Donde **n** es mol y **F** la constante de Faraday

3. A tener el electrodo goteando, se renueva la superficie haciendo muy reproducibles las curvas de corriente vs. potencial eléctrico.

La polarografía diferencial de pulsos es una técnica en la que se aplica un impulso modulado por el usuario en la medida, durante el barrido de potencial en el tiempo en un breve periodo y que se registra como pequeñas derivadas hechas en tiempo real, lo que incrementa la sensibilidad con respecto a la polarografía clásica; además, la resolución de ondas contiguas mejora considerablemente.

Por polarografía se realizaron intentos exitosos de ver la reducción de los azúcares en fosfato de tetrametil amonio 0.002M donde la altura de la columna de mercurio modificaba los potenciales de media onda -2000mV hasta -3500mV. En el trabajo presentado por Overend, W., Paecocke A. y Smith J ¹⁵ (1961) presentan la glucosa sin calentar, además de emplear derivados metilados de los hidratos de carbono de interés.

¹⁵ W. Overend, A. Peacocke and J. Smith *Reactions at position 1 of carbohydrates. Part I. The polarographic reduction of carbohydrates.* J. Chem. Soc., p347-349 (1961)

Anexo B

Ficha fisicoquímica de HMF³⁴⁵

Número de registro. CAS: 67-47-0

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

Estructura, fórmula y peso molecular

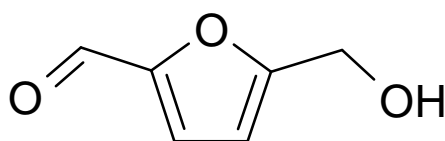


Figura 38 Estructura del HMF.

$C_6H_6O_3$. 126.11u.m.a.

Descripción: sólido cristalino³⁰ o líquido amarillo oscuro³¹, olor a flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

Punto de ebullición: 110 °C

Punto de fusión: 31.5 °C

Densidad: 1.2062 g•mL⁻¹

UV máxima absorción: 283 nm

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

Reactividad: ligeramente volátil con vapor, debe guardarse protegido de la luz y del aire. Carbonizado para su descomposición emite humo irritante.

³ The Merck Index (13 ed.) (2001)

⁴Netherlands Expertise Centre for Tropical Apicultural Resources

<http://www.xs4all.nl/~jtemp/hmf.html>

⁵ http://www.beekeeping.com/articulos/mieles_chaco.htm

Incompatible con bases fuertes, agentes oxidantes fuertes, agentes reductores fuertes.

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

Exposición en humanos: Los humanos están potencialmente expuestos al HMF a través de preparaciones farmacéuticas, humo del cigarro y por el consumo de algunos alimentos y bebidas. Se recomienda evitar el contacto con los ojos, en piel produce manchas amarillas No se han encontrado límites de tolerancia por exposición ocupacional que sean recomendados por organismos internacionales de salud pero la normatividad mexicana establece límites de hasta 40 ppm.

Ocurrencia: HMF ha sido identificado en miel abeja, jugos de frutas, cerveza, brandy, leche, cereal, y café. El HMF es un compuesto intermediario de reacciones de oscurecimiento no enzimático (reacción de Maillard) y de degradación de hidratos de carbono principalmente por tratamiento térmico

Regulación: Evidencias de posible actividad carcinogénica.

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

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

Anexo C

Fichas fisicoquímicas de carbohidratos⁶

Nombre	Sinónimos	Fuente	Punto de fusión (°C)
Fructosa	Levulosa azúcar de fruta, arabino-Hexulosa	Miel, gran variedad de frutas, particularmente manzanas y jitomates; así como semen humano y bovino	102-104
Glucosa	Dextrosa, azúcar de uva, azúcar de sangre, azúcar de maíz	Azúcar más común, abundante en forma libre y combinada. Fuente en sangre, líquido cefaloraquídeo, frutas, miel y jugos de fruta. Componente mayoritario de varios oligo y polisacáridos	Forma - α -D-glucopiranososa Monohidratada 83, anhidra 146 Forma - β -D-glucopiranososa anhidra 148-150 -
Maltosa	4-O- α -D-glucopiranosil-D-glucosa	Producto de descomposición hidrolítica de fibra	-----

Datos electroquímicos de carbohidratos patrón⁷

Carbohidrato	Electrolito soporte	Electrodo de trabajo	Electrodo de referencia	Señal (mV)	Observaciones
Fructosa	LiOH 0.01M / LiCl 0.1M	DME	Ag / AgCl	$E_{1/2} = -1.91$	T=30°C
	LiOH 0.01M / LiCl 0.1M / BOR $1 \cdot 10^{-2}$ M	DME	Ag / AgCl	$E_{1/2} = -1.90$	T=30°C Tec PY
Glucosa	PHOS (Me ₄ N) ₃ PO ₄	DME	SCE	$E_{1/2} = -1.97$	T=25°C pH=8 Tec: PY
	H ₂ SO ₄ 0.5M	RPDE	NHE	$E_p = 1.0$ $E_p = 1.4$	T=25°C Tec: VY

VY Voltamperometría

PY Polarografía

DME Electrodo de gota de Mercurio

RPDE Electrodo de disco giratorio de Platino

SCE Electrodo de calomel saturado

Ag/AgCl Electrodo de Plata/Cloruro de Plata

⁶ Dictionary of organic compounds (1982) Chapman & Hall E.E.U.U. 5°ed vol. III pp2688, 2754-57, 2760-61, 3623

⁷ Meites, L.; Zuman, P. y Rupp, E. (1982) CRC Handbook series in Organic Electrochemistry. CRC Press E.E.U.U. Vol I pp. 248-249

Anexo D

Pruebas a la gota

Las pruebas cualitativas “a la gota” proveen información sobre la reactividad entre sustancias.

Se probó la reactividad de Glucosa y Fructosa en:

ESPECIE	HIDRATO DE CARBONO		OBSERVACIONES
	Glucosa	Fructosa	
Ag^+	•	•	con H_2SO_4 (dil)
Co^{2+}	—	—	con H_2SO_4 (dil)
Pb^{2+}	—	—	con H_2SO_4 (dil)
Sr^{2+}	—	—	con H_2SO_4 (dil)
Sb^{3+}	•	•	sin/con H_2SO_4 (dil)
Hg^{2+}	—	—	con H_2SO_4 (dil)
Cd^{2+}	—	—	con H_2SO_4 (dil)
I^{3-}	—	—	con H_2SO_4 (dil)
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	•	•	con H_2SO_4 (dil)
MnO_4^{2-}	•	•	con H_2SO_4 (dil)
Ba^{2+}	—	—	con H_2SO_4 (dil)

Primero se probó la especie con los carbohidratos sin ácido sulfúrico
teniéndose un cambio en Sr como gel blanco en presencia de ácido. Con Sb se
presenta un precipitado con capa metálica sin ácido; al adicionar ácido se da
una solubilización parcial del precipitado. Tanto el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ y el MnO_4^{2-}
presentan un cambio en el color de la disolución. En el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ se presenta
aparentemente una reacción más lenta en la Glucosa.

Anexo E

Disoluciones

Reactivo de fehling

- Disolución "A": 69.28g de sulfato de cobre (II) pentahidratado (también llamado vitriolo azul⁸, calcantita) en 1L de agua destilada
- Disolución "B": 346g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (sal de la Rochelle, sal de Seignette) y 120g de hidróxido de sodio (sosa cáustica) en 1L de agua destilada

Sacarosa invertida

- Pesar 1.76 g de Sacarosa + gotas de HCl 1:1 Aforo a 25 mL dejar reposar 1 día
- 2) Se toma alícuota de 5 mL, se neutraliza y se lleva a 50 mL

Las disoluciones para polarografía, voltamperometría y conductividad fueron elaboradas con agua desionizada proporcionada por el laboratorio 115 de DEPg de la Facultad de Química de la UNAM.

⁸ <http://ciencianet.com/nombres.html>

Anexo F
Cotizaciones

Sistema HPLC para el análisis de hidratos de carbono⁹

N_PART	# CATALOGO	DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	PRECIO
1	A50303	BOMBA SMARTLINE 1000 - 0.001 A 9.999 mL/mim - 400 BAR - ACERO INOX.	7,056.00
2	A5326	BANDEJA PARA FASE MOVIL	437.85
3	A5325	FRASCO DE 1000mL PARA FASE MOVIL - TORRE SMARTLINE	52.50
4	-----	Válvula de inyección y soporte	1,300.00
5	A0910	START-UP KIT, ANALYTICAL	834.75
6	A54403	KIT DE CAPILARES PARA INTERCONEXIONES - CON AUTOSAMPLER	65.10
7	A0585	HORNO PARA COLUMNA 5 A 85 °C - SIN VALVULA DE INYECCION	3,255.00
8	A5160	DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION - SMARTLINE 2300 - ANALITICO	5,670.00
9	A1245-5	PROGRAMA PARA HPLC ANALITICA - EuroChrom Version 3.05	1,795.50
10	00H-0130-K0	COLMNA HPLC - REZEX 8% Ca MONOSACARIDO - 300 X 7.8 mm	906.05
11	AJ0-4493	CARTUCHO SECURITY GUARD - CALCIO 4X3mm - PAQ. DE 8	254.21
12	KJ0-4282	KIT DE GUARDIA SecurityGuard	126.00
SUBTOTAL			21,752.95
IVA			3,262.94
TOTAL			25,015.89

Precios en dólares EE.UU.

⁹ Información recibida el 8 de Junio de 2007 y facilitada por la M. en C. Ma. del Rosario Covarrubias.

Polarógrafo Radiometer TraceMaster.¹⁰

						JRP 0651/07	
CLIENTE							
DIRECCION :						FECHA : 14 DE JUNIO DEL 2007 REQUISICION : CONDICIONES DE PAGO : PRECIOS EN : M.N.	
ATENCIÓN:							
Tel 01 444 82 62 440 ,46 ext							
521, 520 Fax 01 444 8262372							
- - - - -							
EN ATENCION A SU SOLICITUD, ENVIO LA SIGUIENTE COTIZACIÓN.							
PARTIDA	CANTIDAD	CATALOGO	DESCRIPCION	PRECIO UNITARIO	TOTAL		
	1	A31A008	TRACELAB50 115 VOLTS Laboratorio Polarografico incluye: Polarographic analyzer POL150 Polarographic stand PC software Tracemaster5 Electrode kit for MDE 150 Setup accesory kit for MDE 150 Mercury drop electrode kit	\$ 228,000.00	\$ 228,000.00		
NOTAS IMPORTANTES							
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Adicionar a los precios anteriores el 15% del IVA ◦ Tiempo de Entrega: 8 A 10 SEMANAS ◦ Vigencia de la presente cotización: 15 días 							

Precios en Moneda Nacional

El polarografo tiene ventaja económica sobre el cromatógrafo pues el precio en pesos de 228,000.00 es inferior a los 25,000 dólares del cromatógrafo. Al tipo de cambio de 10.84 pesos por dólar para el 20 de junio de 2007 (271,172.25 pesos).

¹⁰ Información proporcionada por M en C Norma E. Gascón Orta