



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE MIELES MEXICANAS Y EXTRANJERAS  
A TRAVÉS DE MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS  
Y LA REACCIÓN DE FEHLING.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO**

**PRESENTA:**

**ERICK ADRIÁN SÁNCHEZ DÍAZ**



**CD.MX.**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Eugenio Octavio Reyes Salas

**VOCAL:** María del Pilar Cañizares Macías

**SECRETARIO:** Silvia Patricia Zafra Ramírez

**1er. SUPLENTE:** Gustavo Adolfo Zelada Guillén

**2° SUPLENTE:** Claudia Inés Rivera Cárdenas

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Departamento de Química Analítica DEPg

Laboratorio 114. Sótano del Edificio B.

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

\_\_\_\_\_  
M. en C. Edgar Islas Ortiz

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
Erick Adrián Sánchez Díaz

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo general .....	3
2.2 Objetivos particulares .....	3
3. ANTECEDENTES .....	4
3.1 La apicultura .....	4
3.1.1 Historia de la apicultura .....	5
3.1.2 La miel de abeja .....	8
3.1.2.1 Miel en México .....	9
3.1.2.2 Clasificación de la miel .....	12
3.1.2.3 Características físicas de la miel .....	14
3.1.2.3.1 Olor, sabor y color .....	14
3.1.2.3.2 Cristalización .....	15
3.1.2.3.3 Densidad .....	16
3.1.2.3.4 Higroscopicidad .....	16
3.1.2.3.5 Viscosidad .....	16
3.1.2.3.6 Conductividad eléctrica .....	17
3.1.2.3.7 Índice de refracción .....	17
3.1.2.4 Composición química de la miel .....	17
3.1.2.5 Normativa nacional e internacional .....	18
3.1.2.6 Parámetros de calidad en la miel .....	19
3.2 Identificación de azúcares reductores .....	21
3.2.1 Reacción de Fehling .....	21
3.2.1.1 Factores involucrados en la reacción .....	21
3.2.1.2 Método volumétrico .....	21
3.2.1.3 Método potenciométrico .....	22
3.3 Técnicas utilizadas .....	22
3.3.1 Electroquímica .....	22
3.3.1.1 La electrólisis .....	24

3.3.1.2 Transporte de materia .....	25
3.3.1.3 El electrolito soporte .....	25
3.3.1.4 Celda electroquímica .....	26
3.3.1.5 Polarografía .....	27
3.3.1.5.1 El polarograma .....	28
3.3.1.5.2 Polarografía Clásica .....	29
3.3.1.5.3 Polarografía Diferencial de Impulsos .....	31
3.3.2 Conductimetría .....	32
3.3.3 Potenciometría .....	34
3.3.4 Refractrometría .....	37
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
4.1 Equipo, material y reactivos .....	40
4.2 Muestras analizadas.....	41
4.3 Metodología experimental.....	42
4.3.1 Método potenciométrico de Fehling .....	42
4.3.1.1 Efecto del hidróxido de sodio.....	43
4.3.2 Parámetros fisicoquímicos en mieles.....	44
4.3.2.1 Humedad .....	44
4.3.2.2 Cenizas .....	45
4.3.2.3 pH.....	46
4.3.2.4 Acidez libre y lactónica.....	47
4.3.2.5 Azúcares reductores.....	48
4.3.2.6 Fructosa.....	49
4.3.2.7 Sacarosa.....	49
4.3.2.8 Hidroximetilfurfural (HMF).....	50
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	52
5.1 Resultados del método potenciométrico de Fehling .....	52
5.1.1 Efecto de hidróxido de sodio.....	52
5.1.1.1 Relación molar Cu(II)/Glucosa.....	52
5.1.1.2 Relación molar Cu(II)/Fructosa.....	56
5.2 Resultados de análisis fisicoquímicos en mieles .....	59
5.2.1 Humedad .....	59

5.2.2 Cenizas .....	61
5.2.3 pH.....	63
5.2.4 Acidez libre y láctónica.....	64
5.2.5 Azúcares reductores.....	67
5.2.6 Fructosa.....	71
5.2.7 Sacarosa.....	74
5.2.8 Hidroximetilfurfural.....	75
5.2.9 Resultados globales .....	79
6. CONCLUSIONES .....	80
7. BIBLIOGRAFÍA .....	82
8. ANEXOS.....	86
8.1 Estimación de la incertidumbre.....	86
8.1.1 Incertidumbre en métodos instrumentales.....	87
8.1.2 Estimación de la incertidumbre en un estándar .....	89
8.1.3 Estimación de la incertidumbre relación molar Cu(II)/Fructosa .....	90
8.2.3 Muestras de miel analizadas y sus incertidumbres .....	93
8.2 Linealidad, límite de detección(LD) y cuantificación(LDC) del método.....	93
8.3 Diagrama de distribución de especies de la solución de Fehling.....	96

## 1. INTRODUCCIÓN

Las abejas son tan antiguas como el hombre y quizás, como él, llevaron en sus inicios una vida nómada. Probablemente las dificultades presentadas con otros animales les obligaron a vivir en sociedad con los de su especie. La miel es considerada en el mundo entero un regalo de la naturaleza y símbolo de pureza; numerosos cantos de alabanza se han escrito a través del tiempo, ponderando a la miel y sus beneficios, por ejemplo en el Viejo Testamento, los Vedas, el Popol-Vuh e incluso con poetas contemporáneos.<sup>[1]</sup>

La miel es una disolución sobresaturada en azúcares y puede cristalizar por diferentes factores: contenido de agua, semillas de nucleación, temperatura, grado de sobresaturación y viscosidad. Se considera que durante el proceso cristaliza principalmente glucosa debido a la formación de monohidrato de glucosa y la fructosa, al presentar una mayor solubilidad, se exhibirá más tiempo en solución.<sup>[1]</sup>

Por sus características sensoriales en la industria de alimentos se le ha empleado como ingrediente de varios productos; además de su consumo directo, la miel tiene usos medicinales en afecciones oculares, dolores musculares, heridas cutáneas, enfermedades respiratorias y gastrointestinales.<sup>[2]</sup> También otros estudios han demostrado su actividad antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante y antiinflamatoria.<sup>[3-5]</sup>

La miel puede conservar sus propiedades hasta por años; sin embargo, factores ambientales pueden ocasionar la pérdida del olor, sabor y color. Además, se puede generar el 5-(hidroximetil)-2-furaldehído, que es un producto de degradación de azúcares por calentamiento. Sin embargo, al tener buenas condiciones de almacenamiento es posible aumentar su vida de anaquel. Como prueba de ello, en el Museo de Agricultura de Dokki, en Egipto, se conservan dos recipientes que contienen miel que data del 1400 a.C.<sup>[6]</sup>

El presente trabajo plantea el estudio de mieles mexicanas y extranjeras utilizando métodos electroquímicos con la finalidad de establecer la calidad de las distintas mieles. Dentro de los parámetros de calidad a evaluar en las muestras de miel se encuentran: azúcares reductores, fructosa, hidroximetilfurfural (HMF), humedad, cenizas, acidez libre y pH. Las determinaciones han sido realizadas por medio de la potenciometría, conductimetría y polarografía. Además, ha sido determinado el contenido de humedad a través de refractometría.

Adicionalmente se pretende verificar el efecto que ejerce la concentración de hidróxido de sodio sobre la reacción de Fehling, la cual es una alternativa en la cuantificación de azúcares reductores a través de una volumetría, donde el vire del indicador azul de metileno establece el final de esta valoración; para el presente estudio se pretende monitorear esta reacción por medio de una potenciometría.<sup>[7]</sup>

Actualmente la producción de miel en México es exportada principalmente a Europa (Alemania, Inglaterra, etc.) y Estados Unidos, por lo que se hace evidente que este producto posee ciertas características que aún continúan siendo utilizadas. Se espera que esta investigación pueda incentivar más estudios sobre miel y en sí sobre productos naturales; además se espera no perder el carácter informativo, cumpliendo así el compromiso de la ciencia con la sociedad.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Analizar y comparar mieles mexicanas y extranjeras por medio de técnicas electroquímicas.

### 2.2 Objetivos particulares

- I. A través de métodos analíticos se determinarán los principales parámetros de calidad establecidos para mieles en la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006.
- II. Estudiar el efecto que ejerce la concentración de hidróxido de sodio sobre la reacción de Fehling.
- III. Cuantificar el contenido de azúcares reductores empleando potenciometría.
- IV. Utilizar la Polarografía Diferencial de Impulsos en la cuantificación de HMF y Fructosa.
- V. Cuantificar el contenido de acidez libre a través de una valoración ácido-base y el contenido en cenizas por conductimetría.
- VI. Comparar la calidad de las mieles analizadas.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 La apicultura

La apicultura como actividad del sector agropecuario está destinada al manejo y crianza de la abeja *Apis mellifera* con la finalidad de obtener los productos derivados de esta: miel, polen, jalea real, propóleo y veneno. Otro beneficio de esta práctica y no menos importante es la polinización cruzada, la cual se efectúa cuando la abeja recolecta néctar y polen de las flores. Es esencial en muchas cosechas y en otras hace que sean más abundantes, de mejor calidad o más tempranas que las que resultan de la autopolinización.<sup>[6]</sup>

Esta actividad inició con la especie *Apis mellifera* sobre el continente americano en el momento en que los colonizadores trajeron colmenas durante el siglo XVII; su importancia radica principalmente en la producción de miel que de ésta se deriva. Hablando en cifras, el promedio de producción de miel en México entre el 2012 al 2017 fue de 59 mil toneladas de miel por año. En el siguiente diagrama se encuentran los datos de producción correspondientes a cada año durante el periodo mencionado.

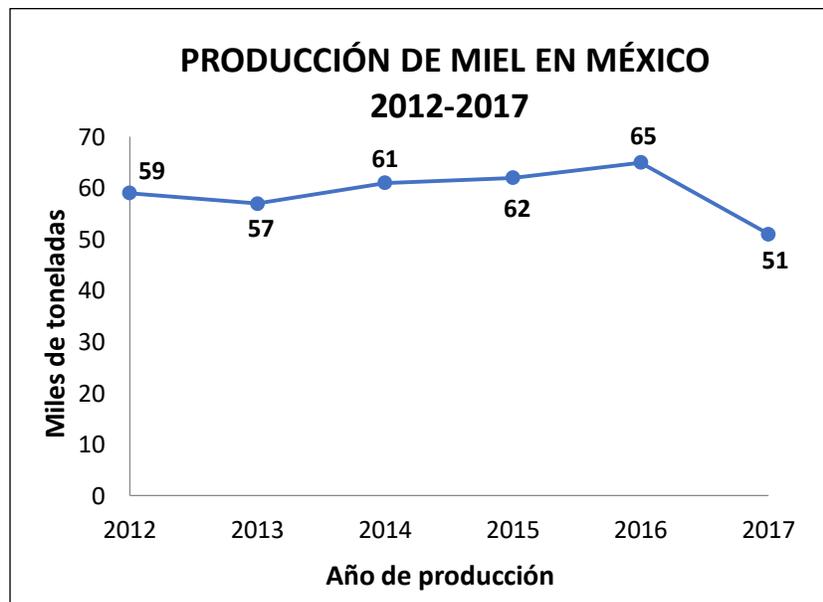


Figura 1. Producción de miel en México durante el período de 2012-2017.<sup>[8,9]</sup>

Durante el periodo de 2012 a 2016 México ocupó el séptimo lugar en producción a nivel mundial; los Estados con mayor producción fueron: Yucatán, Campeche y Jalisco. En el siguiente mapa se encuentran los principales Estados productores del país y su producción promedio durante el período mencionado en la República Mexicana.

Figura 2. Principales Estados productores de miel en México dentro de la República Mexicana durante el período 2012-2016.<sup>[10]</sup>



Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

### 3.1.1 Historia de la apicultura

Las abejas aparecen sobre la Tierra hace unos 60 millones de años, en la era terciaria y, por lo tanto, su existencia es anterior al hombre. Éste descubre que la miel que producían estos insectos era una sustancia dulce capaz de mejorar sus alimentos, por lo que inicia su recolección en el periodo Mesolítico (comprendido

entre 10,000 y 5,000 a.C.), y se piensa que en el Neolítico aprende a controlar las abejas y enjambres.<sup>[11,7]</sup>

Como testimonio de la recolección de miel durante el periodo mesolítico, se encuentra una pintura rupestre en la Cueva de la araña, ubicada en la localidad de Bicorp en Valencia, España.

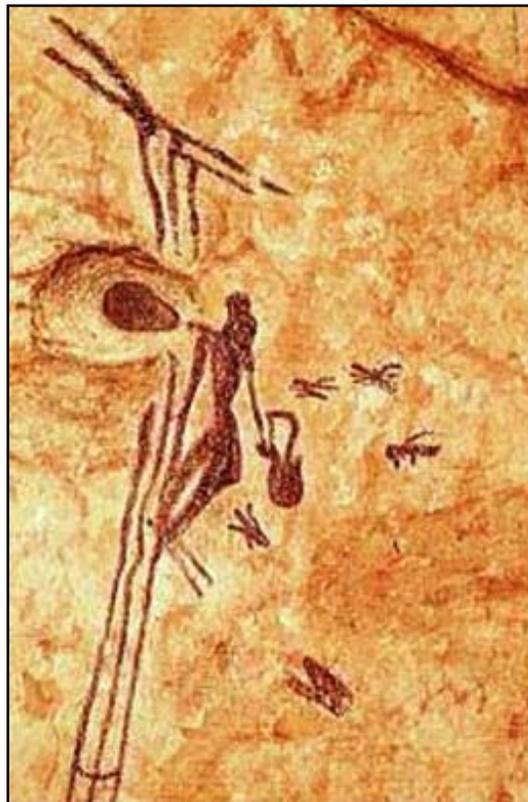


Figura 3. Pintura rupestre que ilustra la recolección de miel, situada en la Cueva de la araña en España.

Probablemente, la transición de la recolección primitiva de la miel a la apicultura debió ocurrir independientemente en muchos lugares. Sin embargo, se considera que durante el periodo comprendido entre el 8,000 y 4,000 a.C., esta actividad se fue gestando en las civilizaciones mediterráneas. En tablillas de arcilla con escritura pictográfica correspondientes al 4,000 a.C., los Sumerios reflejaron su conocimiento de la miel y las abejas.<sup>[12]</sup>

Los antiguos egipcios criaban abejas y comerciaban con la miel y la cera a lo largo de la costa oriental de África. La miel, además de ser un ingrediente básico en la momificación, desempeñó un papel importante en la sociedad egipcia como se aprecia en pinturas encontradas en paredes de tumbas y templos egipcios, donde se da una idea de los medios de los que se valían en ese entonces para la extracción y almacenamiento de miel. Como prueba de ello, se encuentran pinturas en las tumbas de Luxor (1,450 a.C.) y en las paredes del templo del Sol de Ne-user-re (2,400 a.C.).

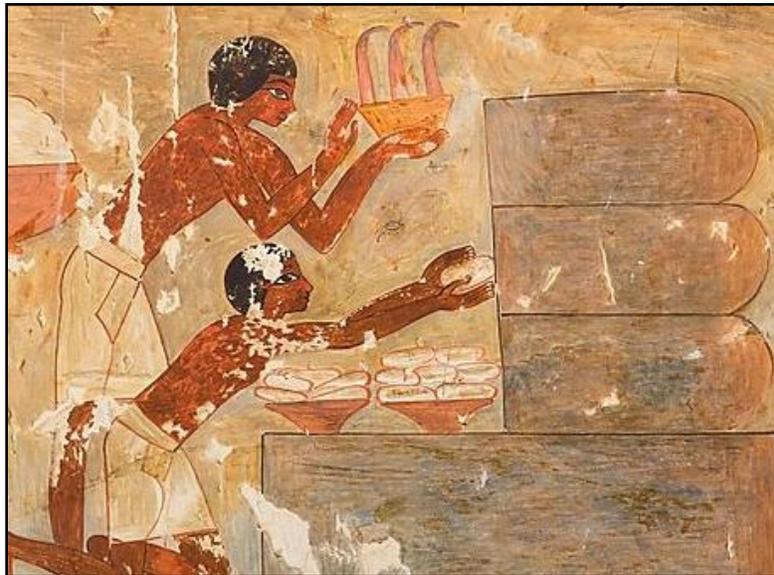


Figura 4. Fragmento del mural en la Tumba 100, Luxor. Como se puede apreciar se almacena miel en vasijas.

De Egipto, la apicultura pasó a Grecia y más tarde a Roma. En Grecia, la apicultura fue venerada a tal grado que en algunas monedas del siglo V y IV a.C. se representa a la diosa Artemisa con el cuño de una abeja. Además, el consumo de miel fue abundante y se empleaba para embalsamar. Se cuenta que al morir Alejandro Magno, su cuerpo fue trasladado de Babilonia a Alejandría en un recipiente lleno de miel para conservar su cuerpo. Los romanos también practicaron la apicultura y aprovecharon las propiedades medicinales, cicatrizantes

y antisépticas de la miel. Debido a la expansión del Imperio Romano la apicultura se extendió al resto de Europa.

El impulso de la apicultura como actividad se logró en el siglo XV, época en que se investiga la vida de las abejas, su morfología, su reproducción, entre otros aspectos. Posteriormente, en el siglo XIX algunos científicos (Huber, Dzierzon, Sylviac, et al.) realizaron observaciones que resultaron en una transformación de la apicultura, convirtiéndose así en una industria floreciente. Desde ese momento, surgieron inventos (colmena móvil de Langstroth), modificaciones a los métodos de trabajo y mejoras en el material apícola, logrando un gran progreso para la industria apícola.<sup>[11,13]</sup>



Figura 5. Tetradracma de Éfeso (ciudad griega de la época arcaica). En esta moneda se observa una abeja y un ciervo (símbolos de Artemisa).

### 3.1.2 La miel de abeja

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006, la miel “es la sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones o de otras partes vivas de la planta que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales; de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición”.<sup>[14]</sup>

La miel es una solución sobresaturada de azúcares simples, principalmente fructosa y glucosa, además presenta otros carbohidratos en proporciones mínimas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, sustancias volátiles, cera, polen, algas, levaduras y partículas sólidas a causa de la cadena de producción.<sup>[1]</sup>

El proceso de elaboración de la miel inicia en la vesícula melífica de la abeja, pequeño depósito que se encuentra aislado de su aparato digestivo. Aquí es donde se almacena el néctar u otros jugos dulces que la abeja recolecta previamente con su trompa y enriquece con enzimas (invertasas) procedentes de las glándulas salivales de la abeja. Esta mezcla es cedida a otra abeja, y así sucesivamente hasta ser depositada finalmente en las celdillas del panal. Durante la transformación del néctar a miel básicamente ocurren cambios físicos y químicos, como pérdida de la humedad del néctar debido a evaporación durante su almacenamiento en la colmena e hidrólisis de la sacarosa por acción de la invertasa.<sup>[15]</sup>

La cosecha de la miel generalmente se lleva una o dos veces al año y su precio es mayor comparado con otros edulcorantes como el azúcar de caña y el jarabe de maíz, por ello su adulteración es una práctica frecuente. Por tal motivo, varios países cuentan con especificaciones y normas para su comercialización.

La miel ha acompañado a la humanidad durante bastante tiempo por su función edulcorante; sin embargo, el uso de azúcar de caña y endulzantes de naturaleza sintética (sacarina o aspartame) ha provocado una disminución en su consumo.

#### **3.1.2.1 Miel en México**

No existen evidencias de que el género *Apis* existiese en la época precolombina. Sin embargo, sí se desarrolló la meliponicultura y fue así como algunas culturas asentadas emplearon esta abeja. Se cultivaron principalmente diversas variedades de abejas sin aguijón de los géneros *Trigona* y *Melipona*, destacando la especie

*Melipona beechei bennett*, conocida en Yucatán y nombrada en idioma maya como: “xunaan-kab”, “kolel-kab” o “pool-kab”.<sup>[11]</sup>

El desenvolvimiento de la meliponicultura maya es interesante y representativo del resto del área mesoamericana. Los mayas cortaban los troncos donde encontraban panales, los transportaban a sus viviendas y los cuidaban hasta el instante de su cosecha.<sup>[13]</sup> De esta manera en festividades religiosas se preparaba el “balché”, bebida a base de miel, corteza del balcheé y agua.

El documento más antiguo sobre aspectos relacionados con el cultivo de las abejas en esta zona es el código Tro-Cortesiano en el cual se hace mención de estas festividades. Festejos similares fueron descritos por el Obispo Diego de Landa, quien comenta que en los meses de noviembre y diciembre los meliponicultores mayas celebraban fiestas dedicadas principalmente al dios Ah Mucen Cab (“dios descendente”, asociado con las abejas). Según algunas leyendas Ah Mucen Cab, “el que cuida la miel” es, también, quien carga el cielo para asegurar un buen flujo de néctar, tan importante para asegurar una buena cosecha de miel.<sup>[7]</sup>

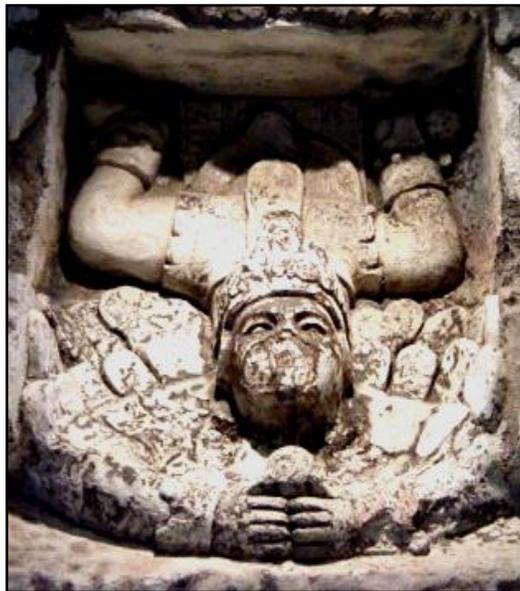


Figura 6. Ah Mucen Cab (Dios maya de las abejas y la miel).

En nuestro México prehispánico también se apreció la cera, pues en la península de Yucatán se cree que la cera negra, producida por las abejas meliponas, tiene gran fuerza en ofrendas. Razón por la cual se le empleaba en la elaboración de velas.

La miel era ampliamente conocida por las culturas prehispánicas y se comercializaba mediante trueque en grandes mercados como Tlatelolco y Acolman. Las culturas que practicaron esa actividad fueron las asentadas en el Golfo de México, Centroamérica y diversos pueblos del valle de México: Aztecas, Xochimilcas, Tlacopenses, Acolhuas y Texcocanos.

A la llegada de los españoles a América, se hubiera pensado en una introducción inmediata de la abeja común *Apis mellifera*, pero la delicadeza de este insecto para soportar grandes viajes aunado al monopolio real de miel y cera en España, complicaron su inserción al continente americano. Se cree que fue introducida por América del Norte, y que fueron los ingleses al contar con mejores barcos, pues en 1622 ya se encontraba esta especie en Virginia, colonia inglesa en ese momento. Para 1722 fue trasladada a Florida, que por entonces era colonia española. Con la ocupación inglesa sobre la isla cubana en 1763, España cedió Florida a cambio de la Habana usurpada por los ingleses y bajo estas circunstancias entra la abeja melífera a la isla de Cuba.

Existen testimonios de la difusión de la abeja melífera sobre Centroamérica y América del Sur durante los siglos XIX y XX. En 1834 fueron llevadas a Uruguay, en 1848 a Chile, en 1855 a Argentina, 1868 a Bolivia y en 1911 a Yucatán. La lenta expansión de la crianza de *Apis mellifera* en el Estado de Yucatán se debió a la resistencia que presentaron los criadores de abeja *melipona*. Hoy en día México es el quinto lugar en exportación de miel de *Apis mellifera* a nivel mundial; sin embargo, aún existe la cosecha de abeja *melipona* hasta el punto en que ambas especies coexisten en algunas regiones del país.

### 3.1.2.2 Clasificación de la miel

La miel se puede clasificar desde diversos aspectos:

#### De acuerdo con su origen botánico:

a) Miel de flores: Es aquella que es obtenida principalmente del néctar de las flores.

-Miel monofloral: compuesta primordialmente de flores de una misma familia, género o especie y posee características sensoriales, fisicoquímicas y microscópicas propias.

-Miel multifloral: compuesta primordialmente de néctar de diferentes especies vegetales sin que ninguna sea predominante.

b) Miel de mielada: Es aquella que es obtenida principalmente de secreciones de partes vivas de las plantas o excreciones de insectos succionadores.

#### De acuerdo con su método de extracción:

Miel escurrida: Se obtiene por el drenado de la miel de los panales desoperculados, sin larvas.

Miel prensada: Obtenida mediante el prensado del panal, sin larvas.

Miel centrifugada: Obtenida por proceso de centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.

Miel filtrada: Ha sido sometida a filtración y durante el proceso es eliminado el polen de manera significativa [Cabe resaltar que el análisis de polen (palinología) ayuda a identificar las flores de las que proviene el néctar, este estudio se realiza a través de un microscopio, y se observa el tamaño, la forma y los relieves superficiales del polen]. En general todo tratamiento o exposición al que se someta la miel produce ligeros cambios que reducen su valor gastronómico.

De acuerdo con su presentación:

- a) Miel: puede encontrarse en estado líquido, cristalizado o mezcla de ambos.
- b) Miel en panal: se comercializa en panales enteros, cerrados o secciones de tales panales.
- c) Miel con trozos de panal: contiene uno o más trozos de panales con miel, exentos de larvas.
- d) Miel cristalizada o granulada: Ha experimentado un proceso de solidificación como consecuencia de la cristalización de azúcares que puede ser natural o inducido.
- e) Miel cremosa o cremada: La que tiene una estructura cristalina fina y que pudo haber sido sometida a un proceso que le confiera esa estructura.

De acuerdo con su forma de producción:

- a) Miel convencional: Obtenida por métodos tradicionales de producción.
- b) Miel orgánica/ecológica: La que durante su producción y procesamiento, cumple los requisitos de certificación para esta denominación (Control de plagas con ácido fórmico o aceites esenciales, excluye el uso de medicamentos obtenidos por síntesis química para el tratamiento de enfermedades en las abejas, prohíbe la alimentación artificial con azúcar no orgánico y mantiene un estricto control sobre la zona de recolección de néctar).

De acuerdo con su destino:

- a) Miel para consumo directo.
- b) Miel para uso industrial: Responde a los requisitos de control de calidad a excepción del índice de diastasa y contenido de HMF, los cuales podrán ser menor que 8 (escala Shade) y mayor que 80 mgkg<sup>-1</sup> respectivamente.

De acuerdo con su proceso:

- a) Miel procesada: Es aquella que ha sido sometida a un proceso de acondicionamiento que podría incluir homogenización, filtración, fraccionamiento mecánico de cristales o tratamiento térmico.
- b) Miel no procesada: Es aquella que no ha sido sometida a procesos de acondicionamiento.

### **3.1.2.3 Características físicas de la miel**

#### **3.1.2.3.1 Olor, sabor y color**

Toda miel es dulce, debido a su gran contenido en azúcares, pero algunas son más dulces que otras porque los azúcares presentan grados de dulzura. Así, la fructosa es ligeramente más dulce que la sacarosa, la glucosa es menos dulce y la maltosa, otro disacárido, es menos dulce aún. Por tanto, mieles extremadamente dulces generalmente contienen cantidades de fructosa superiores al promedio. Las mieles de acacia, pipirigallo (*Onobrychis sativa*), la de cardos (*Cirsium*) y la de balsamina (*Impatiens glandulifera*) son extremadamente dulces. Sin embargo, este no es el único factor que determina la dulzura de la miel, pues los humanos sentimos la dulzura subjetivamente. Además, la dulzura relativa no es la misma en todas las concentraciones: una disolución de sacarosa al 10% se percibe como más dulce que una de azúcar invertido a la misma concentración, pero a medida que se aumenta la concentración en ambas, la disolución de azúcar invertido se percibe como más dulce que la de sacarosa.<sup>[6]</sup>

El sabor de la miel también guarda relación con su aroma, el cual se atribuye a compuestos aromáticos presentes en pequeñas proporciones; estos provienen de los vegetales de origen. Los compuestos más agradables del aroma presentan puntos de ebullición bajos y son los más volátiles. No obstante, el aroma característico de una miel está determinado por compuestos que presentan puntos de ebullición elevados.

El color de una miel comúnmente va desde transparente (acacia, salvia y el trébol rojo) hasta casi negro, con algunas excepciones hacia el verde (miel de tilo), amarillo grisáceo (miel de borraja), café verdoso (miel del árbol del cielo). Entre las más oscuras están las de color vino violáceo, color café rojizo u oscuro.

Las mieles con sabores delicados son siempre claras, mientras que las mieles oscuras tienen por lo general sabores más fuertes. Aunque, es posible encontrar mieles claras con sabores fuertes.

El color puede indicar en cierta forma la calidad de una miel, pues al estar almacenada el aumento en la temperatura provoca oscurecimiento, aunque la presencia de metales también oscurece la miel. Sin embargo, hay que tener presente que la naturaleza de algunas mieles es oscura en sí misma y las diferentes mieles oscurecen a diferentes velocidades. Para medir y clasificar el color de la miel se utiliza un colorímetro de Pfund que utiliza una escala de 0 a 140 milímetros, con el cual se clasifica las diferentes tonalidades, la gama de colores inicia en el blanco agua hasta el ámbar oscuro.

#### **3.1.2.3.2 Cristalización**

Fenómeno natural que se presenta en la miel debido a que es una disolución sobresaturada en azúcares. Este proceso puede efectuarse en cuestión de semanas o meses y no está relacionado con la pérdida de la calidad del producto. Los factores asociados a la cristalización de la miel son: relación entre el contenido de fructosa (levulosa) y glucosa (dextrosa) (L/D; mayor cantidad de glucosa más rápido se efectúa la cristalización, mayor cantidad de fructosa menor es la tendencia a cristalizar), humedad (si es menor a 17% tiene más probabilidad de cristalizarse), temperatura y presencia o ausencia de partículas suspendidas (cristales diminutos, burbujas de aire, partículas de cera o propóleos, granos de polen, polvo del aire o del recipiente contenedor).<sup>[1,6]</sup>

Algunas mieles permanecen líquidas sin recibir algún tratamiento especial, entre éstas se encuentra la de acacia, nisa (*Nyssa aquatica*), y la de algodóncillo (*Asclepias*). Otras granulan con bastante rapidez; sucede con la de diente de león y la de Tah (*Viguiera helianthoides*).

#### **3.1.2.3.3 Densidad**

La densidad relativa de la miel está en función del contenido en agua y esta oscila entre 1.40 y 1.44 a la temperatura de 20 °C. Para medirla se utiliza comúnmente un hidrómetro o puede evaluarse por medio del índice de refracción dado por un refractómetro, empleando posteriormente una tabla de conversión.

#### **3.1.2.3.4 Higroscopicidad**

La miel absorbe agua muy fácilmente bajo ciertas condiciones a pesar de ser un producto natural. Esto plantea una desventaja en el sentido de que la miel es más proclive a fermentar, pero gracias a esta propiedad se brinda suavidad y no se permite que los alimentos donde se incorpora se sequen.

La absorción de agua en una muestra de miel se relaciona con su contenido en agua y el grado de saturación del vapor de agua del aire.

#### **3.1.2.3.5 Viscosidad**

Las mieles presentan diferentes viscosidades y, por lo tanto, fluirán lenta o rápidamente. Su viscosidad está asociada principalmente a su contenido de agua; si este es menor, mayor será la viscosidad y fluirá lentamente. También se relaciona con la temperatura; al aumentar la temperatura sobre la miel disminuye su viscosidad y hay una tendencia a fluir más rápidamente. Esta propiedad se presenta cuando el líquido exhibe un comportamiento newtoniano; sin embargo, algunas mieles tienen comportamientos no newtonianos. Por ejemplo, en la miel

de brezo se necesita agitar para volverse más líquida y fluir con mayor facilidad, por lo que esta tendencia se atribuye al contenido en proteínas.

#### **3.1.2.3.6 Conductividad eléctrica**

Es útil para saber si la fuente de miel es néctar o ligamaza, y quizá pueda emplearse para saber si la miel se encuentra adulterada. Esta propiedad se mide sobre miel diluida, y es posible que su medición sea un método para saber si la miel es o no apropiada para que las abejas la almacenen y la consuman durante el invierno, ya que algunos de sus elementos relacionados con su aumento en la conductividad también hacen que la miel no sea apropiada para las abejas confinadas a sus colmenas en la estación fría.<sup>[6]</sup>

#### **3.1.2.3.7 Índice de refracción**

Es una propiedad óptica importante, su aumento se debe al contenido de sólidos presentes en las muestras de miel, y su disminución se debe a que el contenido de agua es alto. Por lo que es útil en la determinación de humedad; para ello se emplea un refractómetro.

#### **3.1.2.4 Composición química de la miel**

La miel es una mezcla muy compleja de sustancias cuya composición varía según diferentes factores como, la situación geográfica, época del año, vegetación circundante a la colmena, entre otras.<sup>[16-17]</sup> De manera general, la miel se compone de carbohidratos (fructosa y glucosa, principalmente), proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, polen, sustancias minerales, hongos, algas, levaduras y otras partículas a consecuencia de la cadena de producción.<sup>[18]</sup>

En la tabla 1 se muestran los resultados promedio de la composición química de la miel obtenidos de un estudio de 490 muestras de miel florales de E.U.A.<sup>[19]</sup>

Tabla 1. Composición química promedio de la miel.

Composición	Promedio	Contenido
Humedad	17.2	13.4-22.9%
Fructosa	38.2	27.2-44.3%
Glucosa	31.3	22.0-40.7%
Sacarosa	1.3	0.2-7.6%
Maltosa	7.3	2.7-16.0%
Azúcares mayores	1.5	0.1-8.5%
Ácido libre (Glucónico)	0.43	0.13-0.92%
Lactona (Gluconolactona)	0.14	0.00-0.37%
Ácido total	0.57	0.17-1.17%
Cenizas	0.17	0.02-1.03%
Nitrógeno	0.04	0.00-0.13%
pH	3.91	3.42-6.10

En pequeñas cantidades es posible encontrar enzimas, hormonas, metales pesados, etc. Por eso no puede hablarse de una composición única para la miel, pues las características de cada cosecha hacen cada lote de producción distinto.

### 3.1.2.5 Normativa nacional e internacional<sup>[11]</sup>

Los criterios aceptados a nivel mundial para evaluar la calidad de las mieles son los sugeridos en el Codex Alimentarius, con sus ligeras variantes en cuanto a valores máximos y mínimos establecidos. Además del Codex Alimentarius, se encuentra la Directiva Europea, la International Honey Commission (IHC) y la NMX-F-036-NORMEX 2006 (Norma Mexicana).

La IHC surge en un principio para discutir los métodos de análisis y los estándares de calidad de la miel de abeja; en colaboración con la comisión del Manual Suizo de Alimentos (Swiss Food Manual) dirigió análisis inter-laboratorios, y más tarde se interesó en estudiar la composición de miel de abeja monofloral.

La legislación de la UE especifica no añadir a la miel ningún ingrediente alimentario, ni ninguna otra sustancia aparte de miel, mientras el Codex sugiere no

extraer ningún constituyente particular de la miel salvo cuando no pueda evitarse a cambio de garantizar la ausencia de materia extraña, inorgánica u orgánica. La miel no puede ser procesada hasta el punto de alterar su composición esencial. Además, en el Codex se tiene en cuenta la inclusión de mieles que provienen de otras especies de abejas.

Por otro lado, la legislación de la UE considera la definición de miel para uso industrial, sujeta a consideración en el Codex. Denominación que se refiere a mieles apropiadas para su uso industrial o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios elaborados ulteriormente, y por lo tanto puede:

- Presentar un sabor o un olor extraño
- Haber comenzado a fermentar o haber fermentado
- Haberse sobrecalentado

En general, estas comisiones están encaminadas hacia la búsqueda de parámetros que nos permitan discernir sobre la calidad de una miel. Aunque, algunos criterios son muy específicos, otros se asemejan entre sí.

#### **3.1.2.6 Parámetros de calidad en la miel**

Para evaluar la calidad de la miel se emplean análisis fisicoquímicos y microbiológicos como indicadores de las condiciones de madurez y frescura, en general se espera un deterioro mínimo desde su cosecha hasta el correspondiente análisis para que su consumo sea aceptable.

Los criterios de calidad aceptados en el Codex Alimentarius no son obligatorios y pueden ser adoptados por cualquier Estado. Sin embargo, en la norma de la Unión Europea se especifica claramente que todos los Estados integrantes deben abstenerse de adoptar disposiciones no contempladas en la Directiva 2001/110/CE.

Para la legislación del Codex y la Directiva de la UE, el contenido en cenizas fue uno de los criterios de calidad que desapareció. En su lugar encontramos como criterio de calidad la medida en la conductividad eléctrica. Con respecto a la norma mexicana se mantiene como criterio de calidad el contenido en cenizas.

En la siguiente tabla se resumen los criterios de calidad que establecen en la Unión Europea (Directiva 2001/110/CE), Codex Alimentarius y la Norma Mexicana (NMX-F-036-NORMEX-2006).

Tabla 2. Principales criterios de calidad para mieles en distintas normativas.

Criterios de calidad	Codex	Directiva de la UE	NMX-F-036-NORMEX 2006
<b>Contenido en humedad:</b>			
Mieles florales	≤20g/100g	≤21g/100g	≤20g/100g
Brezo, treból	≤23g/100g	≤23g/100g	
Industrial o de panadería		≤25g/100g	
<b>Contenido aparente en azúcares reductores:</b>			
Mieles florales	≥60g/100g	≥60g/100g	≥64g/100g
Miel de mielada o mezclas de miel de mielada con mieles de flores	≥45/100g	≥45/100g	
<b>Contenido aparente en Sacarosa:</b>			
Mieles florales	≤5g/100g	≤5g/100g	≤5g/100g
Alfalfa, Citrus spp., Falsa acacia, MadreSelva francesa, Menzies Branksia, RegGum, Leatherwoog y Eucriphiamilligani.	≤10g/100g	≤10g/100g	
Espliego y borraja	≤15g/100g	≤15g/100g	
<b>Contenido de sólidos insolubles en agua:</b>			
Mieles distintas de la miel prensada	≤0.1g/100g	≤0.1g/100g	≤0.3g/100g
Mieles prensadas	≤0.5g/100g	≤0.5g/100g	
<b>Conductividad eléctrica:</b>			
Mieles	≤0.8 mS/cm	≤0.8 mS/cm	No mencionado
Miel de mielada y miel de castaño y mezclas de las mismas	≥0.8 mS/cm	≥0.8 mS/cm	
<b>Acidez:</b>			
Mieles	≤50meq/kg	≤50meq/kg	≤40meq/kg
Miel para uso industrial		≤80meq/kg	
<b>Actividad de diastasa (luego de procesar y mezclar):</b>			
Mieles florales (en escala Schade)	≥8	≥8	≥8
Mieles con bajo contenido natural de enzimas	≥3	≥3	≥3
<b>Contenido de hidroximetilfurfural:</b>			
En general, excepto para uso industrial	≤40mg/kg	≤40mg/kg	≤40mg/kg
De origen tropical	≤80mg/kg	≤80mg/kg	≤80mg/kg

## 3.2 Identificación de azúcares reductores

### 3.2.1 Reacción de Fehling

#### 3.2.1.1 Factores involucrados en la reacción

De acuerdo con una investigación realizada anteriormente se determinó que en la reacción redox que se utiliza para cuantificación de azúcares reductores se encuentran involucrados diversos factores: temperatura, presión y dismutación de  $\text{Cu}^{1+}_{(\text{ac})}$  en la solución de Fehling; así, también se determinó el efecto que tiene la concentración de  $\text{CuSO}_{4(\text{ac})}$ ,  $\text{KOOOC}(\text{CHOH})_2\text{COONa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}_{(\text{ac})}$  y  $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$  en la reacción; el método usado fue gravimetría.<sup>[20]</sup> No obstante, es fundamental ahondar sobre la relación que guardan los moles de  $\text{Cu}(\text{II})$  con los moles de azúcar reductor con base en las condiciones planteadas por Fehling.

#### 3.2.1.2 Método volumétrico

Este método consiste en una reacción redox que ayuda a identificar aldosas y cetosas, pues ambas poseen carácter reductor. Por ejemplo, la glucosa y la fructosa que dan positivo en la reacción de Fehling; también la sacarosa al ser previamente sometida a una hidrólisis ácida, pues bajo estas condiciones esta molécula se rompe en una molécula de fructosa y una de glucosa (ambas se oxidan con el licor de Fehling).

El método fue publicado por Hermann von Fehling en 1848, siendo este en principio una alternativa a la cuantificación de azúcares reductores en orina. Aunque, se menciona que esta prueba posee un carácter más técnico; simultáneamente, se indica la cantidad de Sulfato de cobre y azúcar reductor que posiblemente reaccionan en disolución sobre el punto de ebullición.

Para hoy en día esta reacción sigue dando controversia pues se reportan diferentes estequiometrías, algunos mencionan que no es estequiométrica u otros se basan en tablas que ayudan a determinar la cantidad de azúcar reductor

reaccionante. Sin embargo, este método ha sufrido modificaciones como la introducida por Eynon-Lane en 1923; en la cual se utiliza azul de metileno como indicador del punto final de la valoración; el vire de este indicador es de azul a incoloro y, representa el punto a la equivalencia. El Dr. Octavio Reyes Salas y Q. Joaquín Preza de la Vega introducen una modificación a este método e inclusive determinan que 5 moles de Cu(II) reacciona por un mol de azúcar reductor.<sup>[7]</sup>

#### **3.2.1.3 Método potenciométrico**

El método potenciométrico, es una alternativa al seguimiento de la reacción de Fehling, pues esta reacción puede monitorearse como una valoración potenciométrica.<sup>[7]</sup> Adicionalmente, en esta investigación se concluye que 5 moles de Cu(II) reaccionan con un mol de azúcar reductor (fructosa, glucosa y el doble para una hidrólisis de sacarosa) y que este punto a la equivalencia coincide con 5/6 de  $\Delta E$  de la curva potenciométrica obtenida experimentalmente.

El equipo potenciométrico consiste en: un alambre de cobre, un electrodo de referencia de (Ag/AgCl/KCl<sub>(ac)</sub> 3 molL<sup>-1</sup>) y un voltímetro. Se debe tener en cuenta que esta reacción debe efectuarse a temperatura de ebullición del agua (92 °C en el Centro de la Ciudad de México).

### **3.3 Técnicas utilizadas**

#### **3.3.1 Electroquímica**

La química electroanalítica abarca un grupo de técnicas analíticas sustentadas en las propiedades eléctricas y químicas de las sustancias cuando forman parte de un sistema electroquímico. Asimismo, puede definirse como el estudio de los procesos de reacción que ocurren en la interfase electrodo-disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa.

Los métodos electroquímicos se basan en la medición de la corriente en función del potencial, empleando condiciones que favorecen la carga o polarización del electrodo de trabajo. Esta polarización se favorece cuando los electrodos de trabajo tienen un área superficial muy pequeña, unos pocos milímetros cuadrados como máximo.<sup>[21]</sup>

Las reacciones químicas heterogéneas ocurridas en la interfase electrodo-disolución, producto de la diferencia de potencial entre dos electrodos se conoce como electrólisis. Para que se lleve a cabo la reacción electroquímica, la especie electroactiva deberá difundir desde el seno de la disolución hasta la interfase electrodo-disolución, allí podrá sufrir una transformación química debida a la ganancia o la pérdida de electrones, al terminar el proceso la especie difunde nuevamente.<sup>[21]</sup>

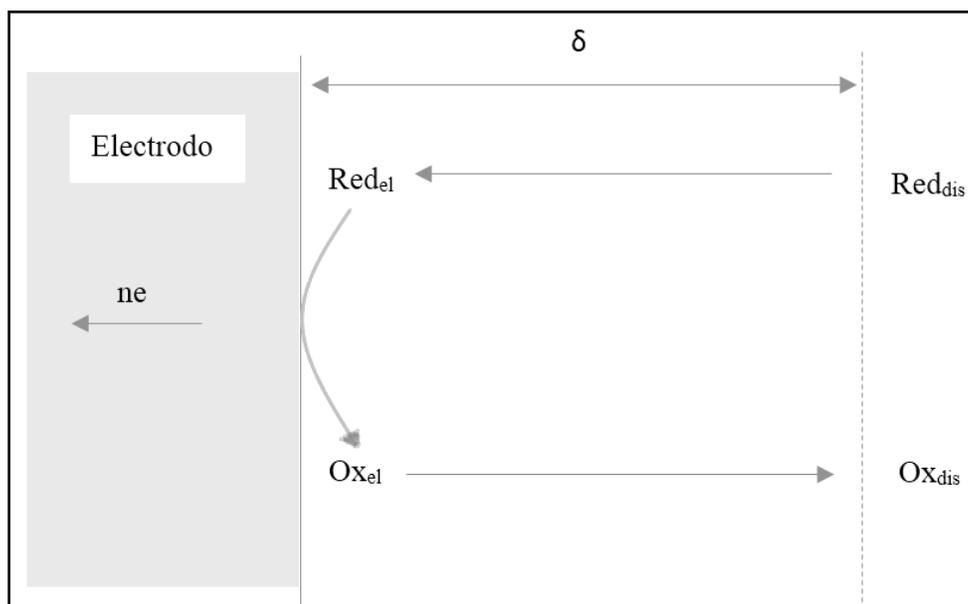


Figura 7. Oxidación de una especie reductora sobre un electrodo convencionalmente llamado "ánodo".

Las técnicas abarcadas por la electroquímica permiten obtener límites de detección bajos e información termodinámica y cinética sobre los sistemas

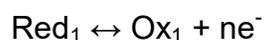
estudiados. Además, presentan las siguientes ventajas con respecto a otras técnicas analíticas:<sup>[22]</sup>

- Detección de estados de oxidación particulares de un elemento.
- Detección de sustancias orgánicas e inorgánicas.
- Aplicable a compuestos con propiedades redox particulares y, sustancias involucradas de alguna manera en reacciones redox.
- La instrumentación es barata con respecto a otras técnicas.

### 3.3.1.1 La electrólisis

Si se impone una perturbación de carácter eléctrico por medio de un generador de corriente eléctrica sobre un sistema compuesto por un ánodo, un cátodo y una disolución que permita el movimiento de las cargas transportadas por los iones, se efectuará una reacción electroquímica debida a la transferencia de carga interfacial, sea iónica o electrónica.

En el ánodo ocurrirá una reacción de oxidación donde el reductor cede electrones:



En el cátodo ocurrirá la reacción complementaria, reacción de reducción, donde el oxidante acepta electrones:



La dirección de la corriente eléctrica va del cátodo al ánodo, por lo que los electrones van a fluir en sentido contrario, es decir del ánodo al cátodo. En ese sentido, el estudio de la electrolisis acepta la siguiente suposición: las velocidades de todas las reacciones son infinitas, como el cambio de electrones y el desplazamiento de los iones.<sup>[23]</sup>

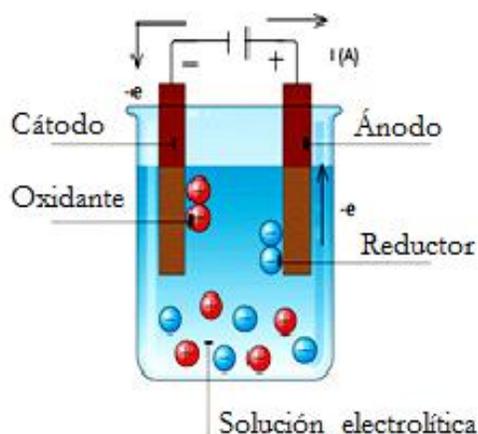


Figura 8. En la electrolisis, una especie dona electrones (reductor) y otra especie acepta electrones (oxidante).

### 3.3.1.2 Transporte de materia

La especie electroactiva puede aproximarse al electrodo a través de tres fenómenos: migración, difusión y convección.

El movimiento por migración se efectúa cuando la especie cargada es sometida a un campo eléctrico; si se genera un gradiente en la concentración de la especie esta tenderá a moverse por difusión y cualquier movimiento no efectuado por cualquiera de las anteriores podrá llamarse convección; por ejemplo, el movimiento de una especie bajo la influencia de agitación.<sup>[23]</sup>

### 3.3.1.3 El electrolito soporte

Es una sustancia iónica, disociada completamente en el medio y presente en exceso respecto al analito. Además, tiene la particularidad de disminuir la resistencia interna en la celda electroquímica y asegurar que la especie electroactiva llegue al electrodo mediante difusión.<sup>[23]</sup> La misión del electrolito soporte es minimizar la corriente debida a migración por la especie electroactiva.

Por ello, la velocidad de migración del analito hacia el electrodo de carga opuesta se hace prácticamente independiente del potencial aplicado.

Los electrolitos soportes pueden ser: ácidos fuertes ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), sales neutras (cloruros, sulfatos, nitratos o percloratos alcalinos), disoluciones amortiguadoras o agentes complejantes (tartrato, citrato, cianuro, fluoruro, amoníaco) en concentraciones al menos 1000 veces superiores al analito.

### 3.3.1.4 Celda electroquímica

Sistema compuesto por tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y electrodo auxiliar. La diferencia de potencial ( $\Delta E$ ) es establecida entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, mientras que la corriente ( $i$ ) se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar.

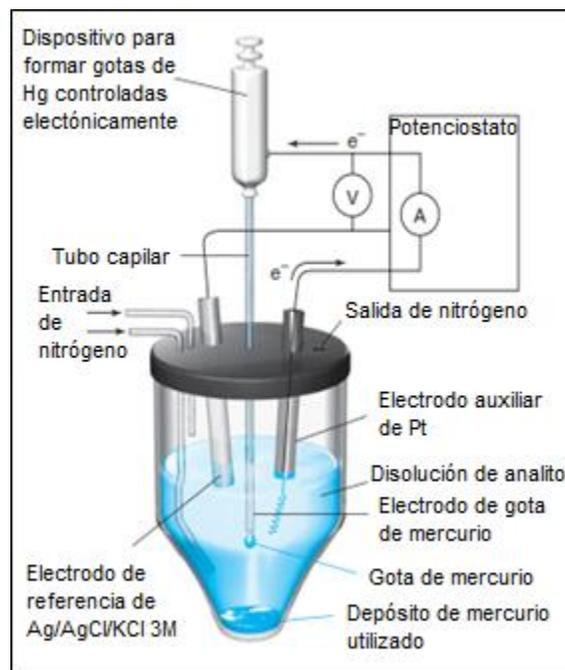


Figura 9. Componentes de una celda electroquímica.

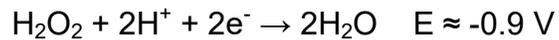
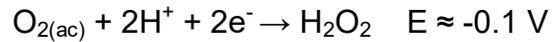
### 3.3.1.5 Polarografía

El primer tipo de voltamperometría fue la polarografía de barrido lineal desarrollada por el químico Jaroslav Heyrovsky a principios de 1920.<sup>[24]</sup> Esta técnica voltamperométrica obtiene información sobre el analito a través de la corriente que circula en una celda electroquímica en función del potencial aplicado sobre un electrodo indicador o de trabajo. La diferencia de esta con respecto a otras voltamperometrías es la utilización del electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo.<sup>[25,26]</sup>

El electrodo de gota de mercurio está constituido por un tubo de vidrio capilar de 10 a 15 cm de longitud, diámetro interno entre 0.06 y 0.08 mm, y se encuentra conectado a un depósito de mercurio. La gota de mercurio crece continuamente hasta que cae, generalmente a una frecuencia de 1 a 6 segundos; durante tal proceso se registra la corriente y el potencial. Actualmente se cuenta con dispositivos automatizados que controlan la caída de la gota con un martillo que puede ser impulsado de forma mecánica o por impulsos electromagnéticos.

Una ventaja presente en el electrodo de gota de mercurio es la elevada sobretensión para la reducción de protones, lo que permite ampliar el campo para efectuar reducciones en medio ácido; otra de sus características es la obtención de curvas intensidad potencial reproducibles, ya que la superficie del electrodo se renueva constantemente.

Entre los inconvenientes se encuentra la limitación del uso del electrodo como ánodo, pues la oxidación del mercurio ocurre a potenciales ligeramente superiores a 0 V al utilizar el electrodo de referencia de  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{ac})}$  3 molL<sup>-1</sup>. Otra dificultad que no es exclusiva al electrodo de gota de mercurio es la interferencia debida al oxígeno disuelto en el medio, pues produce dos ondas de reducción que corresponden a los siguientes procesos:



Para solucionar este problema se burbujea nitrógeno o argón durante unos minutos en la disolución donde se encuentra el analito, eliminando de esta forma el oxígeno disuelto.<sup>[27]</sup>

### 3.3.1.5.1 El polarograma

Las curvas de intensidad de corriente en función del potencial obtenidas mediante el uso de un electrodo de gota de mercurio se denominan polarogramas.

Los parámetros de mayor interés en la polarografía desde el punto de vista analítico son la intensidad de corriente y el potencial. La intensidad de corriente límite ( $i_d$ ), es establecida cuando en una reducción el potencial es lo suficientemente negativo para que todo el analito en la superficie del electrodo se reduzca. El potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ), es la variable cualitativa del método, debido a que es característico del analito en un determinado medio.

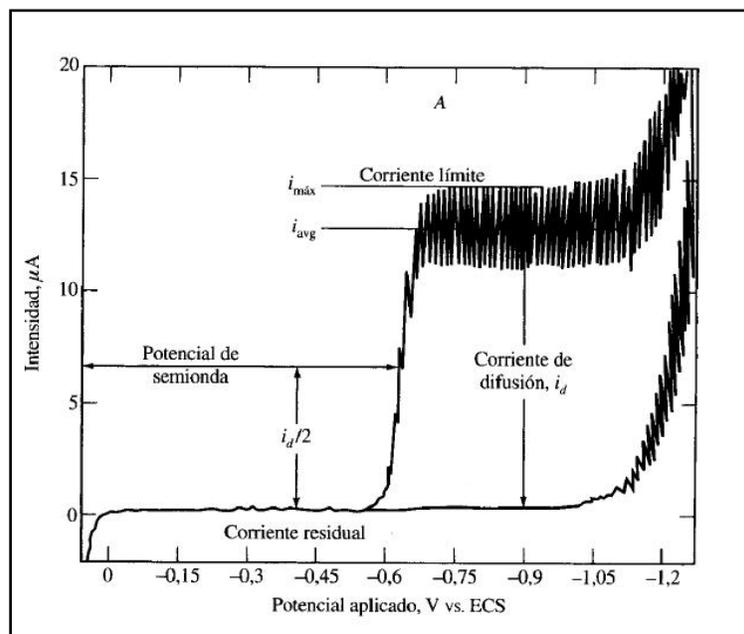
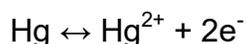


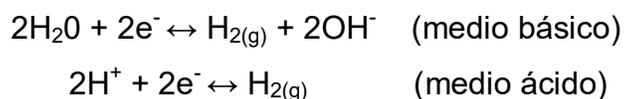
Figura 10. Polarograma típico y sus partes. Como la corriente es positiva es probable que el proceso corresponda a una oxidación. Este polarograma fue obtenido por Polarografía Clásica.

Las reacciones de oxidación ocurren a valores positivos de corriente, mientras que las reducciones están atribuidas a valores negativos de corriente.

Si la intensidad de corriente que crece de forma ilimitada se situa en la parte derecha del polarograma, se llamará barrera anódica, esta se corresponde a la reacción de oxidación del mercurio, el cual puede representarse como:



Si la intensidad de corriente que crece de forma ilimitada se situa en la parte izquierda del diagrama, se llamará barrera catódica; esta se puede encontrar asociada a las siguientes reacciones de reducción:



Entonces, el intervalo de potenciales que se encuentra entre la barrera anódica y catódica se llama dominio de electroactividad, dentro de este se oxidan o se reducen las especies electroactivas.<sup>[23]</sup>

### 3.3.1.5.2 Polarografía Clásica

La polarografía clásica es un tipo de electrólisis, donde se registra la corriente que fluye en el electrodo de gota de mercurio (EGM) durante una variación lineal del potencial (polarografía clásica o de corriente directa, DCP).

La corriente que fluye a través del electrodo de trabajo tiene dos componentes, la corriente faradaica ( $i_f$ ), que depende de la oxidación o reducción del analito, y la corriente capacitiva ( $i_c$ ), debida a la carga y descarga de la doble capa electroquímica en la superficie del electrodo de trabajo.

La corriente de difusión ( $i_d$ ) será el valor máximo para ( $i_f$ ), cuando todo el analito, transportado al electrodo de trabajo por difusión, se oxida o reduce.

La relación entre la corriente de difusión (corriente límite de difusión) y la concentración de la especie esta descrita por la ecuación de Ilkovic:

$$i_d = 0.607nD^{1/2}m^{2/3}t_d^{1/6}C$$

Donde:

$i_d$  : Corriente de difusión

$n$ : Número de electrones intercambiados

$D$ : Coeficiente de difusión

$m$  : Flujo del mercurio

$t$ : Tiempo de goteo

$C$ : Concentración del analito

Bajo condiciones experimentales constantes, la ecuación de Ilkovic toma la siguiente forma general:

$$i_d = nK^D C$$

Donde  $K^D$  es la constante de difusión convectiva;  $n$  el número de electrones intercambiados y  $C$  la concentración de la especie.

La no linealidad entre la intensidad de corriente y la concentración del analito puede asociarse a fenómenos de adsorción en el electrodo, factores cinéticos, reacciones químicas acopladas o una posible evaporación del disolvente durante la eliminación de oxígeno disuelto.<sup>[28]</sup>

### 3.3.1.5.3 Polarografía Diferencial de Impulsos

La polarografía diferencial de impulsos es una técnica electroanalítica basada en la medida de la corriente antes y después de aplicar un impulso de potencial al electrodo. La diferencia de la corriente por cada impulso ( $\Delta i$ ) es registrada en función del potencial cuyo aumento es lineal, obteniendo una curva en forma de pico, la altura máxima del pico es proporcional a la concentración.<sup>[29, 30,31]</sup>

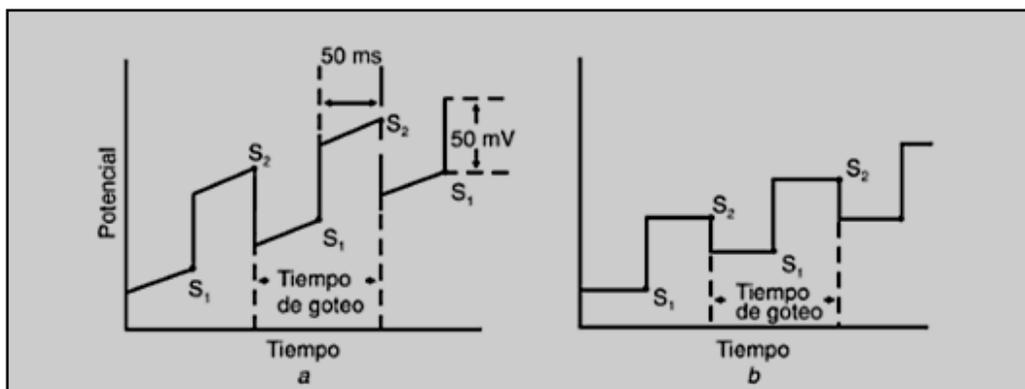


Figura 11. Señales de excitación empleadas en Polarografía Diferencial de Impulsos.

La polarografía diferencial de impulsos presenta límites de detección más bajos que la polarografía clásica; es posible medir concentraciones de hasta  $10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ , mientras que la polarografía clásica detecta concentraciones hasta  $10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ .

Esto se debe porque al aplicar un impulso, se provoca un aumento de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, generando un salto en la corriente faradaica y una disminución en la corriente capacitiva debido a la carga de la gota.

Por tanto, hay una disminución más rápida de la corriente capacitiva con respecto a la faradaica, de tal forma que al medir la corriente total antes de la caída de la gota, la corriente capacitiva es prácticamente nula y la faradaica aun es importante. Obteniendo así, una mayor sensibilidad de la técnica y, además hay una mejor resolución de ondas contiguas con respecto a la polarografía clásica.

La ecuación que relaciona la intensidad de corriente para esta técnica es la siguiente:

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} AC \Delta E_A \sqrt{\frac{D}{\pi T_p}}$$

Donde:

$i_p$ : Corriente de pico

$n$ : Número de electrones intercambiados

$F$ : Constante de Faraday

$R$ : Constante de los gases

$T$ : Temperatura absoluta

$A$ : Área de superficie del electrodo

$C$ : Concentración del analito

$\Delta E_A$ : Amplitud del impulso

$T_p$ : Tiempo de la corriente muestreada por impulso

### 3.3.2 Conductimetría<sup>[32]</sup>

La conductimetría se basa en el hecho de que las disoluciones electrolíticas se comportan como conductores eléctricos donde los iones en solución son los responsables del transporte de carga. Como un conductor obedece la ley de Ohm, dicha conducción se verifica en el volumen de solución delimitado por la distancia entre dos electrodos de posición fija.

La resistencia eléctrica de una disolución medida con una celda conductimétrica está dada por:

$$R = \rho \frac{\ell}{A}$$

Donde  $R$  es la resistencia eléctrica de la disolución expresada en Ohms ( $\Omega$ ),  $\rho$  la resistividad eléctrica ( $\Omega \cdot \text{cm}$ ),  $\ell$  la longitud entre los electrodos (cm) y  $A$ , el área traslapable de los electrodos ( $\text{cm}^2$ ).

La relación  $\ell/A$  puede definirse como constante de celda conductimétrica,  $k_c$  es característica de cada arreglo de electrodos. Su valor debe permanecer constante durante todo el experimento si se desea precisión en los resultados.

La conductancia es el inverso de la resistencia de la disolución ( $G = R^{-1}$ ), y la conductividad específica es el inverso de la resistividad ( $\kappa = \rho^{-1}$ ). Las unidades de la conductancia están dadas en Siemens ( $S = \Omega^{-1}$ ) y la conductividad específica en  $S\text{cm}^{-1}$ .

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\kappa}{k_c}$$

La constante de celda se determina midiendo la resistencia de una celda conductimétrica que contiene una disolución estándar de conductividad conocida.

La relación entre la conductividad y la concentración se define por medio de la conductividad molar o equivalente, dependiendo de las unidades usadas para expresar la concentración, tenemos que esta relación se expresa por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\Lambda_m = \frac{\kappa}{C_0}$$

$$\Lambda_{eq} = \frac{\kappa}{zC_0}$$

Donde  $\Lambda_m$  es la conductividad molar ( $S\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ),  $C_0$  es la concentración molar ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $\Lambda_{eq}$  es la conductividad equivalente ( $S\text{cm}^2\text{eq}^{-1}$ ) y  $zC_0$  la concentración equivalente ( $\text{eq}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), donde  $z$  corresponde a la carga del ión considerado (o las cargas, positivas o negativas, involucradas en la sal).

En esta última ecuación resulta conveniente expresar la concentración en  $\text{mol cm}^{-3}$  o en  $\text{eq cm}^{-3}$ , de tal manera que se simplifiquen las unidades de  $\Lambda_m$ . Es importante reiterar que el equivalente en conductimetría, a diferencia del equivalente químico,

solo depende de la carga del ion ( $z$ ), de tal forma que se construye la siguiente correspondencia:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{z\Lambda_m C_0}{k_c}$$

Y como todo ion participa en la conducción de la corriente en las disoluciones:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\sum z\Lambda_m C_0}{k_c}$$

De esta manera, si se mide la conductancia o la resistencia de las soluciones, es fácil calcular la conductividad de estas por medio de la concentración y el valor de la constante de la celda:

$$\Lambda = \frac{G \cdot k_c}{zC_0} = \frac{1}{zC_0}$$

### 3.3.3 Potenciometría

La potenciometría es un método de análisis electroquímico que permite relacionar la diferencia de potencial generada en una celda electroquímica en función de la actividad de las especies iónicas presentes en el medio.<sup>[33]</sup>

La actividad de la especie  $i$  es un valor que depende de la fuerza iónica del medio; cuyo valor para disoluciones muy diluidas se aproxima al valor de la concentración de la especie  $i$ .

$$A_i = \gamma_i \cdot C_i^{[34]}$$

Donde:

$A_i$ : Actividad de la especie  $i$

$\gamma_i$ : Coeficiente de actividad de la especie  $i$

$C_i$ : Concentración de la especie  $i$

Los métodos de análisis potenciométricos se basan en la medida del potencial de celdas electroquímicas sin paso de corriente apreciable. El equipo empleado en potenciometría comprende un electrodo de referencia, un electrodo indicador y un dispositivo de medida de potenciales. A diferencia de otras técnicas presenta la ventaja de ser sencilla y barata.

El electrodo de referencia ideal tiene un potencial que se conoce con exactitud, es constante y no sufre modificaciones por la composición de la disolución de analito.

El electrodo indicador responde de manera rápida y reproducible a cambios en la concentración de analito y puede ser de tres tipos: metálico, de membrana y los transistores de efecto de campo sensibles a iones.<sup>[35]</sup>

Los electrodos indicadores que sirven como sensores potenciométricos en una celda electroquímica son modelados por la ecuación de Nernst-Nikolsky.

$$E = E + \frac{RT}{nF} \ln(A_i)$$

Donde:

$E$ : Potencial del electrodo

$E$  : Potencial estándar del electrodo

$R$ : Constante de los gases ideales ( $8.314510 \text{ CVmol}^{-1}\text{K}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ )

$T$ : Temperatura absoluta (Kelvin)

$n$ : Número de electrones intercambiados

$F$ : Constante de Faraday ( $9.6485309 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ )

$A_i$ : Actividad de la especie  $i$

Si asumimos que trabajamos a  $25^\circ\text{C}$  y realizamos la conversión al logaritmo decimal, la ecuación anterior se simplifica de la siguiente manera.

$$E = E + \frac{0.05916}{ni} \text{Log}(A_i)$$

Como no es posible determinar el potencial absoluto de un electrodo, se hace uso de un potencial relativo del electrodo, definido como el potencial de una celda electroquímica que contiene un electrodo de referencia y un electrodo trabajo y un potencial asociado a la unión líquida que se manifiesta al poner en contacto dos disoluciones de electrolito de diferente composición, este se desarrolla a través de la interfase y proviene de la desigualdad de cationes y aniones en la superficie de contacto debida a la diferencia en las velocidades de difusión de estas especies. Por lo tanto, el potencial relativo del electrodo será:

$$E_{rel} = E_{trabajo} - E_{referencia} + E_j$$

Si los potenciales del electrodo de referencia y de unión líquida se consideran constantes, el valor de la diferencia de potencial en función de la actividad del analito está dado en la siguiente ecuación:

$$\Delta E = K + \beta \frac{0.05916}{ni} \text{Log}(A_i)$$

Donde  $K$  engloba los valores de  $E_{c\ todo}$  y  $E_j$ , mientras  $\beta$  es un factor que considera las desviaciones de las condiciones ideales. La ecuación anterior describe el comportamiento de la diferencia de potencial ( $\Delta E$ ) en función del logaritmo de la actividad del analito ( $\text{Log}(A_i)$ ).<sup>[36]</sup>

En una titulación potenciométrica se sigue la variación del potencial electroquímico de una solución en función del volumen o de la cantidad de una solución titulante.<sup>[26]</sup> Por lo tanto, es necesario que el electrodo indicador sea sensible al analito, o a una especie que mantenga relación estequiométrica con él. La información brindada por este tipo de titulaciones es mucho más confiable y útil que la que proviene de una titulación con indicadores químicos, ya que describe el comportamiento de la concentración del analito y el potencial durante la titulación completa. Además, en una titulación colorimétrica aplicada a soluciones

coloreadas o turbias, el vire del indicador no siempre es perceptible, mientras que el color de la disolución no afecta las mediciones potenciométricas.

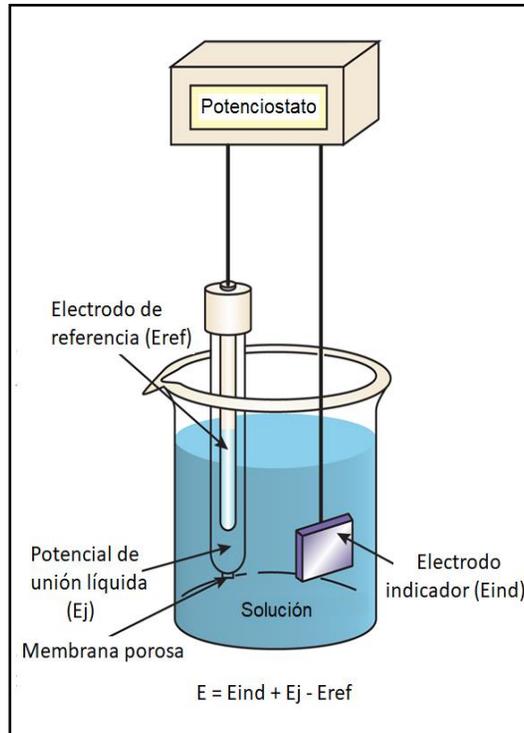


Figura 12. Componentes de un sistema potenciométrico formado por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un voltímetro.

### 3.3.4 Refractometría

La refracción es el cambio de dirección y velocidad que experimenta una onda electromagnética al pasar de un medio a otro, el cual tiene distinto índice de refracción.

El índice de refracción es un cociente de velocidades, la velocidad de la onda en el medio de referencia (vacío) entre la velocidad de la onda en el medio de estudio. La ecuación de esta relación es la siguiente:

$$\eta = \frac{c}{v}$$

Donde:

$\eta$  : Índice de refracción

$C$ : Velocidad de la luz en el vacío ( $3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$V$ : Velocidad de la luz en el medio

El seno del ángulo de incidencia se relaciona con el seno del ángulo de refracción de la onda, donde el producto del índice de refracción del primer medio por el seno del ángulo de incidencia es igual al índice de refracción del segundo medio por el seno del ángulo del segundo medio. Esto, queda plasmado en la siguiente ecuación que ilustra la Ley de Snell:

$$\eta_1 \text{Sen} \theta_1 = \eta_2 \text{Sen} \theta_2$$

Uno de los instrumentos más empleados en refractometría es el refractómetro de Abbe; el líquido problema se coloca formando una película muy delgada entre dos prismas, y la radiación rasante incide y se refracta en el prisma de refracción.

Recorriendo con un anteojo la cara superior de este prisma, se puede encontrar el ángulo de emergencia del rayo límite. Por ello, el prisma va montado de tal modo que puede girar alrededor de un punto central de su superficie, siendo sometido a rotación hasta que se hace coincidir la línea de separación de las regiones claras y oscuras que se observa a través del anteojo con el retículo del ocular. El aparato tiene una escala donde es posible medir directamente el valor del índice de refracción.

El índice de refracción para mezclas binarias varía linealmente con la composición de éstas, aunque siempre será conveniente comprobar esta actividad mediante la construcción de curvas de calibrado.

Existen también refractómetros más sencillos que los de Abbe. A continuación se presenta una imagen que ilustra la refracción de la luz.

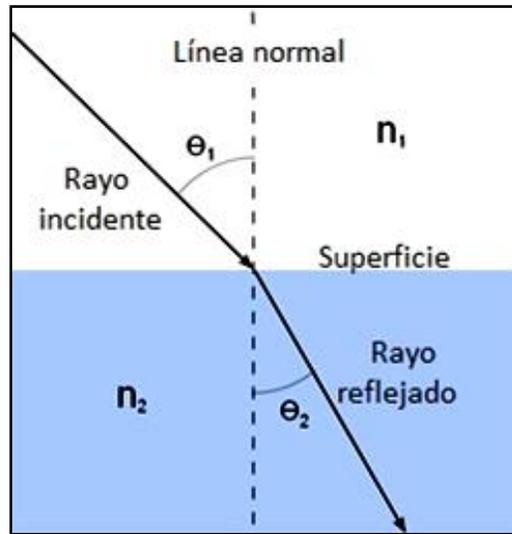


Figura 13. Refracción de la luz.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipo, material y reactivos

Tabla 3. Material y equipo de laboratorio utilizados.

Material y equipo	
•Balanza analítica "Mettler AE240"	•Agitadores de vidrio y magnéticos
•Conductímetro "644 Metrohm"	•Micropipetas de 100 y 1000 µL
•Milivoltímetro "Tacusel" S6N	•Pipetas volumétricas de 2,3 y 10 mL
•Polarógrafo "797 VA Computrance"	•Vasos de precipitados de 50 mL
•pH metro "713 Metrohm"	•Buretas de 10 y 50 mL
•Refractómetro "Atago N-3E"	•Soporte universal
•Parrilla de calentamiento "Corning"	•Pinzas para bureta
•Termómetro Branna de -10°C a 110°C	•Espátula
•Electrodos: gota de mercurio, platino, cobre y Ag/AgCl/KCl <sub>(ac)</sub> 3 M	•Vidrio de reloj
	•Matraces volumétricos de 10 y 25 mL

Tabla 4. Lista de reactivos utilizados.

Reactivo	Pureza	Marca comercial
Acetato de sodio trihidrato	R.A. (99%)	J.T. Baker
Ácido acético glacial	R.A. (≥ 99%)	Merck
Ácido bórico	R.A. (99%)	Analytyka
Ácido clorhídrico	R.A.	Merck
Ácido nítrico	R.A.	Merck
Agua desionizada y destilada	-	-
Azul de metileno	R.A. (99%)	Gurr
Bórax	R.A.	J.T. Baker
Cloruro de calcio	R.A.	Mallinckrodt
Cobre electrolítico	-	-
Disoluciones amortiguadoras de pH (4, 7 y 10)	R.A.	Merck
Fructosa anhidra	R.A. (≥ 99%)	Sigma-Aldrich
Glucosa	Q.P.	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	99.30%	J.T. Baker
Hidroximetilfurfuraldehído	R.A. (99%)	Sigma-Aldrich
Tartrato de sodio y potasio	R.A. (99%)	J.T. Baker
Sulfato de cobre pentahidratado	R.A. (99%)	CIVEQ
Nitrógeno	99.90%	Praxair

## 4.2 Muestras analizadas

Tabla 5. Información de las muestras analizadas.

Muestra	Información del producto	Descripción de la muestra
<b>M1 (Japón)</b>	Miel "Nature's Finest Pure Honey" (Acacia, Fecha de envase: 05-Abril-2012)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: ligero a flores de acacia
<b>M2 (Azerbaiyán)</b>	Miel "Qinyet Ogullari" (Fecha de envase: 05-Julio-2015)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: intenso a nueces
<b>M3 (Alemania)</b>	Miel "Akazien Honig" (Fecha de envase: 01-October-2014)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: ligero y característico
<b>M4 (Japón)</b>	Miel "Nature's Finest Pure Honey" (Milkvetch; Fecha de envase: 13-Mayo-2010)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: ligero y característico de Milkvetch
<b>M5 (Cuba)</b>	Miel "Apisun" (Fecha de envase: 2016)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: intenso
<b>M6 (Alemania)</b>	Miel "Breltsaner Honig" (Miel de Wald Wurzig; Fecha de envase: Noviembre de 2012)	Estado físico: líquido, Color: ámbar oscuro, Olor: intenso
<b>M7 (México)</b>	Miel "Panalli" (Miel de Mezquite, México; Fecha de envase:NR*)	Estado físico: sólido, Color: blanco agua, Olor: suave y agradable
<b>M8 (México)</b>	Miel "Erongarícuaro" (Fecha de envase: 2016)	Estado físico: sólido, Color: ámbar oscuro, Olor: Desagradable, tonos a piloncillo
<b>M9 (El Salvador)</b>	Miel "Miel de las abejitas" (Fecha de envase: NR)	Estado físico: sólido, Color: ámbar oscuro, Olor: Intenso
<b>M10 (E.U.A.)</b>	Miel "Texas Honey" (Fecha de envase: NR)	Estado físico: sólido, Color: ámbar claro, Olor: intenso y desagradable
<b>M11 (México)</b>	Miel "Maya Vinic" (Miel de Yucatán; Fecha de envase: 2017)	Estado físico: sólido, Color: ámbar claro, Olor: suave y característico
<b>M12 (Canadá)</b>	Miel "Canadian Pure Honey" (Fecha de envase:15-Junio-2012)	Estado físico: líquido, Color: ámbar oscuro, Olor: intenso y desagradable
<b>M13 (Francia)</b>	Miel "Miel de Fleurs Flower Honey" (Fecha de envase: NR)	Estado físico: líquido con cristales depositados, Color: ámbar, Olor: intenso
<b>M14 (Canadá)</b>	Miel "Clover Crest" (Fecha de envase: 25-NOVIEMBRE-2011)	Estado físico: líquido, Color: ámbar oscuro, Olor: intenso y desagradable
<b>M15 (Alemania)</b>	Miel "Langnes" (Fecha de envase: Diciembre de 2012)	Estado físico: líquido, Color: ámbar oscuro, Olor: ligero y agradable
<b>M16 (Guatemala)</b>	Miel "Guatebee" (Fecha de envase NR)	Estado físico: sólido, Color: ámbar oscuro, Olor: ligero con tonos a canela
<b>M17 (Francia)</b>	Miel "Lune de miel" (Miel de acacia, Fecha de envase: 11-Diciembre de 2011)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: ligero a flor de acacia
<b>M18 (Tailandia)</b>	Miel "DaiTung" (miel de macadamia; Fecha de envase: NR)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: intenso y característico

Muestra	Información del producto	Descripción de la muestra
M19 (Tailandia)	Miel vuvu Chunchan (Miel de Wild Blossom; Fecha de envase: 27-Abril-2017)	Estado físico: líquido, Color: ámbar claro, Olor: intenso
M20 (Tailandia)	Miel "SangPhueng" (Fecha de envase: 9-Enero-2017)	Estado físico: líquido, Color: ámbar, Olor: intenso
M21 (Tailandia)	Miel "Raw Honey" (Fecha de envase: 20-Mayo-17)	Estado físico: líquido, Color: ámbar claro, Olor: ligero
M22 (Tailandia)	Miel "Good.bLonejan Honey" (Fecha de envase: 16-Enero-2017)	Estado físico: líquido, Color: ámbar oscuro, Olor: ligero y floral

NR: No reportado

### 4.3 Metodología experimental

#### 4.3.1 Método potenciométrico de Fehling

Es factible, monitorear la reacción de Fehling por medio de una potenciometría, donde un alambre de cobre funciona como electrodo de trabajo, el electrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{ac})}$   $3 \text{ molL}^{-1}$  como electrodo de referencia y se utiliza un voltímetro para medir potenciales.<sup>[7]</sup>

Asimismo, se ha descrito que la reacción de Fehling guarda una relación de 5 moles de  $\text{Cu(II)}$  presente en disolución ( $[\text{Cu}_2\text{H}_4]^{-6}$ )<sup>[37]</sup> por cada mol de azúcar reductor a la temperatura de ebullición.<sup>[7,38]</sup> No obstante, aún no se encuentra reportada una estequiometría, dado que no se concluyen los productos definitivos de reacción. Además, es sabido que está en función de diversos factores.<sup>[20]</sup>

Asumiendo las consideraciones anteriores, se pretende evaluar el efecto que tiene la concentración de hidróxido de sodio en la disolución B (Fehling) sobre la relación molar  $\text{Cu(II)}/\text{Az. reductor}$ . Por tal motivo, se variará la concentración de hidróxido de sodio desde  $0 \text{ molL}^{-1}$  hasta  $2.5 \text{ molL}^{-1}$  en diferentes disoluciones de sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ . En tal caso, se espera que la concentración de hidróxido de sodio tenga un efecto en la cuantitividad de la reacción. En este trabajo, asumimos la seriedad de la investigación realizada por Joaquín Preza de la Vega, quien concluye que tras obtener experimentalmente una curva potenciométrica para una valoración de este tipo, es posible definir un punto a la

equivalencia a  $5/6$  de  $\Delta E$ . Este valor se encuentra cercano al vire del indicador sugerido para esta reacción redox (azul de metileno).<sup>[7]</sup>

Es importante destacar que uno de los objetivos perseguidos en Química Analítica es la exactitud y la precisión de sus resultados. Por otro lado, las reacciones redox en teoría presentan constantes de reacción considerables; es decir, valores que se traducen en reacciones muy favorecidas. Asimismo, este método de cuantificación ha sido utilizado por diferentes tesis en el laboratorio 114 del Posgrado de la Facultad de Química; por mencionar algunos trabajos:

- Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles (Joaquín Preza de la Vega en 2007)
- Nuevos criterios de calidad para miel basados en procedimientos electroquímicos (Héctor Demián Caballero Puente en 2009)
- Aporte analítico al conocimiento de la calidad de la miel. Comparación entre algunas mieles mexicanas y extranjeras (Aguiles Tlaonin Díaz Roldán en 2012)
- Aplicación de la electroquímica analítica al control de calidad de productos apícolas (Norma Elisa Gazcón Orta en 2012)
- Estudio de la calidad para la miel basados en procedimientos electroquímicos (Diana Berenice Romero Molotla en 2013)

##### **4.3.1.1 Efecto del hidróxido de sodio**

Asumiendo que el reactivo hidróxido de sodio es relevante en la reacción de Fehling, se optó por evaluar el efecto que tiene la concentración de este sobre la disolución final de Fehling (Mezcla de disolución A y B). Uno de los fines perseguidos es encontrar la concentración de NaOH en la disolución B a partir de la cual es plausible obtener resultados precisos en cada valoración efectuada. Para cumplir este objetivo, se decidió variar la concentración de hidróxido de sodio en distintas soluciones de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ ; entonces, se varió la concentración

de hidróxido de sodio desde  $0 \text{ molL}^{-1}$  hasta  $2.5 \text{ molL}^{-1}$ . Por otro lado, se considera que la concentración de la disolución A empleada en todos los experimentos será cercana a  $0.28 \text{ molL}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

Se asumirá que la relación estequiométrica es de 5 moles de Cu(II) por cada mol de azúcar reductor. Esta, se obtuvo considerando las tesis mencionadas y las condiciones establecidas por Fehling en 1848 y obedeciendo a la ley de proporciones constantes, donde se establece que dos o más elementos se combinan para dar un determinado compuesto y esto sucede en una relación constante de masas.

### **4.3.2 Parámetros fisicoquímicos en mieles**

#### **4.3.2.1 Humedad**

Por diversas razones el contenido de humedad en una miel puede ser elevado, la más común es su cosecha antes de alcanzar su maduración en panal, aunque, también suele atribuirse a su proceso de extracción, condiciones de envasado, almacenamiento y su exposición prolongada a ambientes húmedos.

Un alto contenido de humedad facilita el desarrollo de mohos y levaduras, por lo que la miel con alto contenido de humedad es susceptible de fermentar.

De acuerdo con lo establecido en la Norma Mexicana (NMX-F-036 NORMEX 2006) se puede calcular el contenido de humedad en muestras de miel a través del método refractométrico, en el cual se determina el contenido de humedad por medio de la medición de sólidos disueltos.

Experimentalmente se colocaron una o dos gotas de muestra en la lente del refractómetro (ATAGO N-3E) y se cubrió esta superficie, entonces, se procedió a tomar la lectura resultante del equipo. Estas lecturas registradas en  $^{\circ}$  Brix tuvieron una corrección a la temperatura a la cual se efectuó la medición. Para este caso

hay que sumar o restar respectivamente 0.0023 ° Brix por grado Celsius en que la temperatura se encuentra por encima o por debajo de la temperatura de trabajo del instrumento (20°C). Entonces, el porcentaje de humedad corresponderá a la diferencia entre 100 y los grados corregidos a la temperatura de trabajo.

#### 4.3.2.2 Cenizas

La conductividad eléctrica de una disolución de miel se relaciona con la cantidad de sustancias minerales presentes en la muestra. Por lo tanto, es posible establecer una relación entre el contenido de cenizas (minerales) y la conductividad específica de una disolución de miel, ya que en medio acuoso los minerales se encuentran disociados en iones con capacidad para conducir la electricidad.

La conductividad específica ( $x_i$ ) es una medida de la facilidad con que la corriente eléctrica fluye a través de una solución, esta propiedad depende de la concentración de cada especie conductora (iones en solución), la temperatura y la naturaleza de las especies en solución. La conductividad específica de una solución de una especie  $i$  está dada por:

$$x_i = G \cdot k_c$$

Donde:

$x_i$ : Conductividad específica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )

$G$ : Conductancia ( $\mu\text{S}$ )

$k_c$ : Constante de celda ( $\text{cm}^{-1}$ )

Asimismo, es mediante la conductividad específica de una disolución de miel que se puede calcular el porcentaje de cenizas en la misma. A continuación, se presenta la ecuación lineal que expresa la relación entre ambos parámetros:<sup>[39,40]</sup>

$$X_m = 1.74A + 0.14$$

Donde:

$X_m$ : Conductividad específica de la miel ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ )

A: Contenido de ceniza (g /100 g miel)

La conductividad es una medida importante en mieles y se encuentra en algunas normas como parámetro de calidad. Varios estudios proponen que la conductividad en miel es importante en el conocimiento del *origen palinológico, botánico y geográfico*.<sup>[16,17]</sup>

En esta determinación se empleó un conductímetro (644 Metrohm), mediante el cual se tienen valores de conductancia ( $G$ ) que son transformados a conductividad específica. A cada disolución de miel elaborada se le midió su conductancia a temperatura ambiente y se le restó el valor de la conductancia del blanco; el blanco en este caso, fue la misma agua utilizada en las disoluciones de miel. Con la conductancia debida a la muestra de miel ( $X_m$ ), se empleó la ecuación descrita anteriormente en este apartado para obtener así el porcentaje de cenizas.

Es importante saber que para emplear la ecuación se deben elaborar disoluciones de miel de concentración cercana a  $0.10 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; tomando en cuenta esta consideración se procede a efectuar las medidas en la conductividad eléctrica y se procede a obtener el contenido de cenizas para cada muestra.

#### 4.3.2.3 pH

El nivel de acidez en muestras de miel tiene un marcado efecto sobre el sabor. Mieles como las de mielato son ricas en elementos minerales y presentan valores bajos de pH. Otras, presentan características diferenciables según el origen floral. Los ácidos de la miel representan aproximadamente el 0.5 % de los sólidos, pero estos no solo contribuyen al sabor, sino a dar una mayor estabilidad de la miel frente a microorganismos.

Para realizar esta determinación se empleó un potenciómetro (Metrohm 713), el cual fue previamente calibrado con disoluciones estándar de pH 4, 7 y 10. Las lecturas registradas de pH, corresponden a lecturas de diluciones preparadas a partir de la disolución madre de miel. Se tomaron 2.0 mL de disolución madre y se llevaron al aforo a 10.0 mL con agua desionizada, por lo tanto, se utilizó la misma disolución empleada para determinar el porcentaje de cenizas, de tal manera que la concentración final en cada disolución fue aproximadamente  $1 \times 10^{-1} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

#### 4.3.2.4 Acidez libre y lactónica

La miel es una matriz compleja que contiene diversos compuestos, por lo que las especies que aportan protones en disolución al encontrarse en distintas concentraciones y con  $pK_a$ 's similares, dificultan la homogenización de puntos finales de acidez libre y lactónica. La acidez total en la miel es la suma de la acidez libre y lactónica, y puede atribuirse a ácidos orgánicos, lactonas o ésteres internos y algunos iones inorgánicos (Al, Fe, Cu, Ni, Zn y Pb). Las lactonas durante el tratamiento con una base abren rápidamente el anillo lactónico para producir una sal de cadena abierta.

La fermentación en la miel causa un incremento en la acidez, por ello es importante monitorear la concentración de ácido en las muestras como criterio de calidad. El límite máximo de acidez permitido en la NMX-F-036-NORMEX-2006 es de  $40 \text{ meq} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ; sin embargo, en normas como el "Codex" se considera  $50 \text{ meq} \cdot \text{Kg}^{-1}$  como límite superior debido a la existencia de mieles con una acidez natural elevada. El contenido de acidez libre puede considerarse una medida indirecta de la frescura de una miel, aunque existen parámetros que son más directos y confiables para determinar dicha frescura, como el contenido en HMF y azúcares reductores. Se dice que el ácido glucónico es el que más contribuye a la acidez en una miel, pues es sabido que la glucosa oxidasa presente de forma natural en una miel efectúa una reacción de oxidación en la cual se genera dicho ácido.

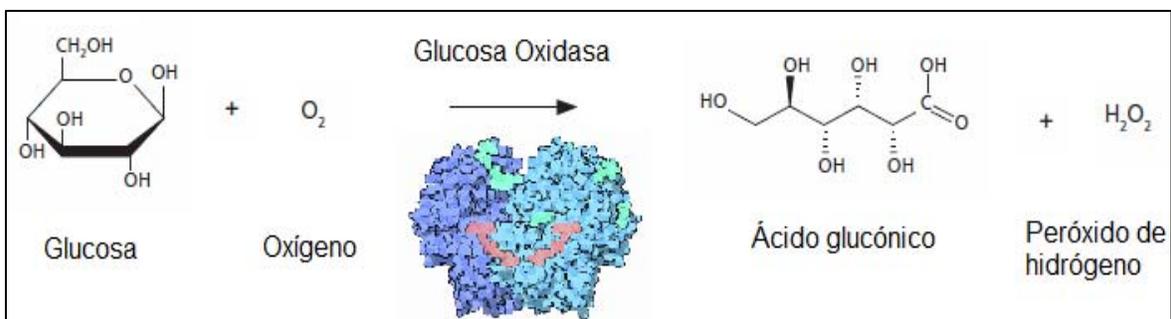


Figura 14. Catálisis de descomposición de  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico a través de Glucosa oxidasa (GOD).

Durante el proceso de descomposición de la glucosa por acción de la glucosa oxidasa existe como intermediario de reacción la gluconolactona, esta influye en la concentración de acidez.

En la determinación de acidez libre y láctica se prepararon dos disoluciones de hidróxido de sodio de concentración  $9.7 \times 10^{-3}$  y  $9.3 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , estas soluciones fueron estandarizadas con biftalato de potasio. Para efectuar la valoración ácido-base, se colocó la solución de sosa en una bureta de 10.0 mL y se procedió a valorar cada muestra de miel; por lo que se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de solución madre y se vertió en un vaso de precipitados de 50 mL, se adicionó agua desionizada hasta cubrir el electrodo del potenciómetro y se colocó el sistema en agitación constante.

#### 4.3.2.5 Azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se efectuó mediante una valoración potenciométrica, para lo cual se prepararon las soluciones propuestas por Fehling: disolución A ( $\text{CuSO}_4 \approx 0.28 \text{ molL}^{-1}$ ) y disolución B (Tartrato de sodio y potasio  $1.2 \text{ molL}^{-1}$  en  $\text{NaOH } 1.2 \text{ molL}^{-1}$ ). En un vaso de precipitados de 50 mL se colocó una alícuota de 3.0 mL de cada una de las disoluciones y se procedió a valorar con una disolución de miel previamente preparada; para su elaboración se tomaron 250  $\mu\text{L}$  de solución madre vertidos en un matraz volumétrico de 25.0 mL y

aforados con agua desionizada para una concentración final de miel aproximada  $5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Para efectos cuantitativos, se utilizará la relación que existe entre los moles de cobre y los moles de azúcar reductor, en las cual 5 moles de Cu(II) reaccionan con 1 mol de azúcar reductor a temperatura de ebullición.<sup>[7]</sup>

##### 4.3.2.6 Fructosa

La fructosa o levulosa es un monosacárido de fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  y masa molecular de  $180.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Esta cetosa se encuentra enlazada a glucosa para formar sacarosa o azúcar común. En condiciones ambientales se presenta como cristales blancos que se descomponen a temperaturas entre  $103 - 105^\circ\text{C}$ , también presenta una elevada solubilidad en agua.

En la cuantificación de fructosa en mieles se empleará la Polarografía Diferencial de Impulsos, asumiendo que una de las dos señales de reducción presentadas en el medio  $\text{CaCl}_2 1 \text{ molL}^{-1}$  presenta una buena definición y correlación lineal al tratar sus correspondientes datos. La señal de reducción mencionada se encuentra a  $-1.560 \text{ mV}$  de un dominio de electroactividad para el cloruro de calcio de  $73.20 \text{ mV}$  a  $-2100 \text{ mV}$ . Asimismo, el método empleado será el de adiciones patrón a través de una solución de fructosa previamente elaborada.

##### 4.3.2.7 Sacarosa

La sacarosa es un disacárido de fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  y masa molecular de  $342.20 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Es un sólido blanco que descompone a  $186^\circ\text{C}$  y presenta una solubilidad en agua de  $200 \text{ g}/100 \text{ mL}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Se compone de fructosa y glucosa unidas por un enlace covalente o-glucosídico, al romper este enlace mediante hidrólisis ácida o empleando enzimas se producen un equivalente de glucosa y un equivalente de fructosa, azúcares reductores que se pueden determinar por el método volumétrico de Fehling.

Para realizar la hidrólisis ácida de la sacarosa se adicionaron 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado a una solución elaborada a partir de 250  $\mu\text{L}$  de disolución madre de miel vertidos en un matraz volumétrico de 25.0 mL, a este se le adicionó suficiente cantidad de agua desionizada hasta la línea de aforo. Esta solución se dejó reposar por un lapso de 24 horas para posteriormente llevar al aforo con agua desionizada. Esta disolución se valoró por el método volumétrico de Fehling y por comparación entre los azúcares reductores determinados para una disolución elaborada de la misma forma, pero sin adición de ácido es posible calcular la cantidad de sacarosa presente en la muestra.

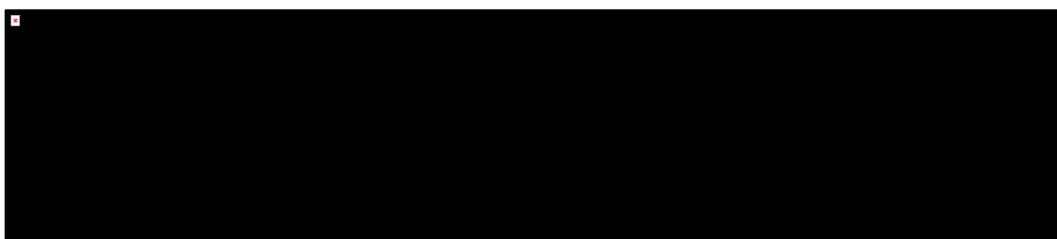


Figura 15. Hidrólisis ácida de la Sacarosa ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ); este proceso genera una molécula de fructosa y una molécula de glucosa. La ruptura también puede generarse por acción de la enzima invertasa.

#### 4.3.2.8 Hidroximetilfurfural (HMF)

El 5-(hidroximetil)-2-furfuraldehído es un compuesto heterocíclico de fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$  y masa molar de  $126.11 \text{ g mol}^{-1}$ . Es un sólido cristalino amarillento oscuro con punto de fusión de  $31.5 \text{ }^\circ\text{C}$  y es soluble en agua, metanol, etanol, acetona, etc. Es ligeramente volátil por lo que debe conservarse en refrigeración.

La miel al envejecerse o al ser sometida a calentamiento incrementa su cantidad de HMF, proceso que se ve favorecido en mieles con mayor acidez. El HMF es un compuesto sin valor nutricional y es producto de la oxidación de fructosa y glucosa en medio ácido. Además, es un intermediario en la formación de los pigmentos oscuros que producen el pardeamiento y su presencia en la miel está relacionada

con alteraciones de color, desarrollo de sabores, olores extraños y pérdida del valor nutritivo del producto. Al formarse este compuesto en mieles se da la aparición de una coloración oscura sobre el producto.

La cuantificación de HMF se realizó a través de electroquímica analítica y el método de adiciones patrón. En este análisis se empleó el polarógrafo (797 VA Computrance de Metrohm) y la técnica empleada fue Polarografía Diferencial de Impulsos. Los electrodos utilizados fueron: el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo, el de  $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{ac})}$   $3 \text{ molL}^{-1}$  como electrodo de referencia y un electrodo auxiliar, platino.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 5.1 Resultados del método potenciométrico de Fehling

#### 5.1.1 Efecto de hidróxido de sodio

##### 5.1.1.1 Relación molar Cu(II)/Glucosa

En el estudio del efecto que tiene la concentración de hidróxido de sodio en la relación molar Cu(II)/Glucosa sobre la determinación volumétrica de azúcares reductores, se prepararon disoluciones a distintas concentraciones de hidróxido de sodio en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$  (Disoluciones B). Por lo tanto, se pesaron distintas masas de hidróxido de sodio, estas fueron disueltas y aforadas en matraces volumétricos de 10.0 mL. En la siguiente tabla se encuentran las masas de hidróxido de sodio empleadas; así también, el valor de su concentración en la correspondiente disolución B en un medio de sal de tartratos constante  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ .

Tabla 6. Disoluciones B preparadas a partir de diferentes masas de hidróxido de sodio (P.M.  $40 \text{ g mol}^{-1}$ ; P. 91.74 %) disueltas y aforadas a 10.0 mL en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ .

Disoluciones B								
Especificaciones	1	2	3	4	5	6	7	8
$m_{\text{NaOH}} \text{ (g)}$	0.0000	0.1499	0.3216	0.4674	0.6594	0.8168	0.9718	1.1115
$\text{NaOH (molL}^{-1}\text{) real}$	0.00	0.34	0.74	1.07	1.51	1.87	2.23	2.55

Además, se prepararon 200 mL de Sulfato de cobre ( $0.2785 \pm 6 \times 10^{-3}$ )  $\text{molL}^{-1}$   $_{95\%}$  (Disolución A) y 3 disoluciones de glucosa de 250 mL (titulante) con las siguientes concentraciones: ( $6 \times 10^{-3} \pm 7.09 \times 10^{-5}$ )  $\text{molL}^{-1}$   $_{95\%}$ , ( $1.5 \times 10^{-2} \pm 1.76 \times 10^{-4}$ )  $\text{molL}^{-1}$   $_{95\%}$  y ( $3 \times 10^{-2} \pm 3.51 \times 10^{-4}$ )  $\text{molL}^{-1}$   $_{95\%}$ .

Para evaluar el efecto de la concentración de hidróxido de sodio presente en la disolución B sobre la relación molar Cu(II)/Glucosa en la reacción de Fehling, se prepararon licores de Fehling (mezcla de disolución A y B) en distintos vasos de precipitados con los siguientes volúmenes: 2.0, 5.0 y 10.0 mL.

Finalmente, se concretaron un total de 24 experimentos conservando las condiciones establecidas por Fehling, a excepción de la concentración de sosa en la disolución B, como se describió anteriormente. El punto de equivalencia de la valoración rédox se puede determinar de dos formas: potenciométricamente y por el vire del indicador azul de metileno (azul rey-incoloro). De esta forma, se calcularon las relaciones molares Cu(II)/Glucosa en el punto final de la valoración en cada uno de los experimentos; el vire del indicador coincide con  $5/6 \Delta E$  de la curva potenciométrica experimental. En la siguiente tabla se encuentran los resultados de la relación molar para cada uno de los experimentos efectuados.

Tabla 7. Resultados de la relación molar Cu(II)/Glucosa para 2.0, 5.0 y 10.0 mL de licor de Fehling.

Disolución B		Estequiometría Cu(II)/Gluc		
No.	NaOH (molL <sup>-1</sup> )	2 mL Fehling	5 mL Fehling	10 mL Fehling
1	0.00	RNE	RNE	RNE
2	0.34	RNE	RNE	RNE
3	0.74	RNE y PP	RNE y PP	RNE y PP
4	1.07	4.74	4.99	5.02
5	1.51	4.74	4.99	5.16
6	1.87	4.84	5.01	5.16
7	2.23	4.86	5.07	5.27
8	2.55	4.89	5.15	5.21
$X_{prom}$		4.81	5.04	5.16
$S_{n-1}$		0.07	0.07	0.09
$U_A$		0.03	0.03	0.04
$U_B$		0.06	0.06	0.07
$U_T (95\%)$		0.14	0.14	0.16
<b>Resultados</b>		$4.81 \pm 0.14$	$5.04 \pm 0.14$	$5.16 \pm 0.16$

Fehling: Sulfato de cobre  $0.2785 \text{ molL}^{-1}$  (Disolución A) e Hidróxido de sodio  $X \text{ molL}^{-1}$  en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$  (Disolución B). Donde,  $X = 0.00, 0.34, 0.74, 1.07, 1.51, 1.87, 2.23$  y  $2.55$ .

RNE: Relación no estimada pues la reacción no fue completa o determinada.

PP: Presencia de precipitado (óxido cuproso).

En las condiciones establecidas para la reacción de Fehling se cumple que 1 mol de azúcar reductor reacciona con 5 moles de Cu(II) para dar diferentes productos de reacción y un precipitado rojo ladrillo  $\text{Cu}_2\text{O}_{(s)}$ . Sin embargo, al variar la concentración de hidróxido de sodio presente en la disolución B es posible encontrar relaciones molares distintas al 5/1 o en su defecto no estimar una relación molar. Tal como puede observarse en la tabla 7, donde para disoluciones B de concentración de hidróxido de sodio por debajo de  $7.4 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$  no es posible asociar una relación estequiométrica, pues no se registraron saltos potenciométricos (curvas) para estos sistemas y no fue posible establecer un punto de equivalencia. No obstante, en algunos casos existe evidencia de la generación de óxido cuproso en el fondo del recipiente, como el que se presentó en los experimentos en los cuales se utilizó una disolución B No. 3 (Figuras 16 y 17).

A continuación, se presentan dos fotografías correspondientes a una serie de valoraciones para 10.0 mL de licor de Fehling. En cada experimento efectuado se utilizó una disolución B distinta de acuerdo con la tabla 6. Además, esta serie de reacciones fueron seguidas potenciométricamente y por el vire del indicador azul de metileno (2 gotas al 1%).

Figura 16. Serie de valoraciones rédox correspondientes a 10.0 mL de licor de Fehling con diferentes disoluciones B conforme la tabla 6. Titulante glucosa ( $3 \times 10^{-2} \pm 3.51 \times 10^{-4}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$ . Fotografía tomada 2 horas después de obtener la serie.

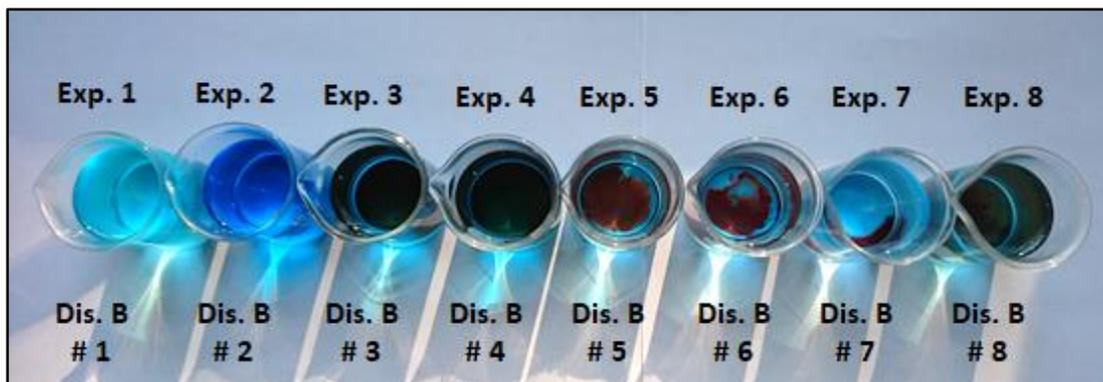
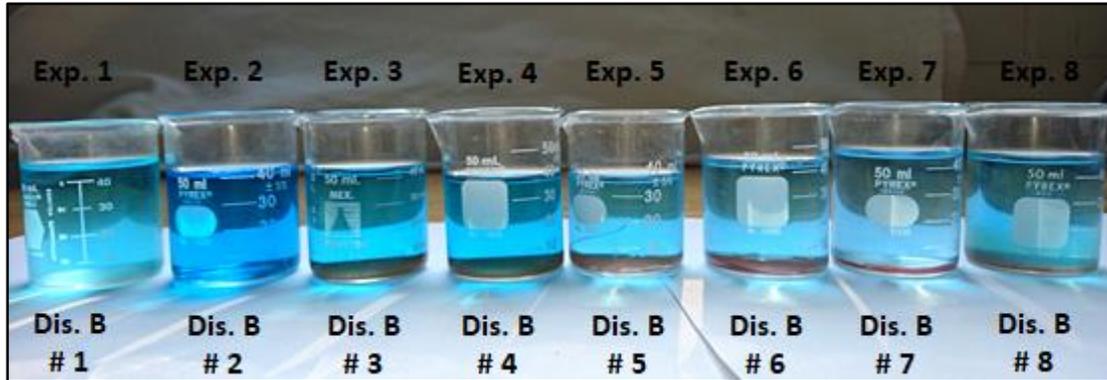


Figura 17. Serie de valoraciones rédox correspondientes a 10.0 mL de licor de Fehling con diferentes disoluciones B conforme la tabla 6. Titulante glucosa ( $3 \times 10^{-2} \pm 3.51 \times 10^{-4}$ ) molL<sup>-1</sup><sub>95%</sub>. Fotografía tomada 2 horas después de obtener la serie.



Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que a partir de una disolución B de concentración de hidróxido de sodio mayor o igual a 1.07 molL<sup>-1</sup> es posible registrar curvas potenciométricas y estimar relaciones molares de Cu(II)/Glucosa. El valor promedio de las relaciones molares Cu(II)/Glucosa fue cercano a 5 para licores de Fehling de 5.0 mL con una ligera imprecisión en la medida. No obstante, el valor promedio de la relación Cu(II)/Glucosa para licores de 2.0 y 10.0 mL es menor y mayor a 5 respectivamente, estos valores indican sesgo en la medida y denotan la existencia de errores de carácter sistemático.

Como primera suposición, este error se encuentra asociado al volumen dispensado por las alícuotas; sin embargo, es necesario un análisis más detallado para poder detectarlo. Se sabe que este tipo de errores no se detectan fácilmente y se atribuyen a errores en los instrumentos de medida o al método de medición.

Con base en los datos de la tabla 7 se concluye que para obtener una relación de 5 moles de Cu(II) por cada mol de azúcar reductor es necesario utilizar una disolución B con al menos 1 molL<sup>-1</sup> de hidróxido de sodio en sal de tartratos 1.2 molL<sup>-1</sup> (Serie de 5mL; Tabla 7). Es importante recordar que en esta serie de valoraciones el azúcar reductor fue glucosa, un isómero de la fructosa que posee

la misma fórmula molecular pero diferente arreglo en el espacio. Por lo tanto, es de suponerse que ambas posean distinta cinética de reacción, que finalmente pueda contribuir al resultado final de esta determinación.

### 5.1.1.2 Relación molar Cu(II)/Fructosa

De la misma forma en que se evaluó el efecto ejercido por la concentración de hidróxido de sodio presente en la disolución B sobre la relación molar Cu(II)/Glucosa, también se determinó el efecto sobre la relación Cu(II)/Fructosa.

La fructosa es un monosacárido que presenta propiedades reductoras y, por lo tanto, da positivo en la reacción de Fehling. Por lo cual, para evaluar este efecto se prepararon disoluciones B a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ . Por lo tanto, se pesaron distintas masas de hidróxido de sodio, estas fueron disueltas y aforadas en matraces volumétricos de 25.0 mL con una disolución de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$  previamente elaborada. En la siguiente tabla se encuentran los valores correspondientes a las masas de hidróxido de sodio empleadas, así también sus respectivas concentraciones en cada una de las disoluciones B.

Tabla 8. Disoluciones B preparadas a partir de diferentes masas de hidróxido de sodio (P.M.  $40 \text{ g mol}^{-1}$ ; P. 91.74 %) disueltas y aforadas a 25.0 mL en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ .

Disoluciones B								
Especificaciones	1	2	3	4	5	6	7	8
$m_{\text{NaOH}} \text{ (g)}$	0.000	0.4144	0.8122	1.236	1.6004	2.0557	2.4123	2.8164
$\text{NaOH (molL}^{-1}\text{) real}$	0.00	0.38	0.75	1.13	1.47	1.89	2.21	2.58

Además, se elaboraron 200 mL de una disolución de Sulfato de cobre ( $0.2783 \pm 5.99 \times 10^{-3}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$  (Disolución A) y 3 disoluciones de fructosa de 250 mL (titulante) con las siguientes concentraciones: ( $5.9 \times 10^{-3} \pm 7.08 \times 10^{-5}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$ , ( $1.48 \times 10^{-2} \pm 1.75 \times 10^{-4}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$  y ( $2.95 \times 10^{-2} \pm 3.5 \times 10^{-4}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$ .

Para cuantificar el efecto de la concentración de hidróxido de sodio presente en la disolución B sobre la relación molar Cu(II)/Fructosa para la valoración de Fehling se tomaron licores de 2.0, 5.0 y 10.0 mL. De esta forma, se procedió la reacción en las condiciones establecidas por Fehling; asimismo, se determinaron los puntos de equivalencia sobre el diagrama potenciométrico experimental para cada valoración redox y se obtuvieron las siguientes relaciones molares Cu(II)/Fructosa al final de cada valoración.

Tabla 9. Resultados de la relación molar Cu(II)/Fructosa para 2.0, 5.0 y 10.0 mL de licor de Fehling.

Disolución B		Estequiometría Cu(II)/Fruc		
No.	NaOH (molL <sup>-1</sup> )	2 mL Fehling	5 mL Fehling	10 mL Fehling
1	0.00	RNE	RNE	RNE
2	0.38	RNE	RNE	RNE
3	0.75	RNE y PP	RNE y PP	RNE y PP
4	1.13	4.88	4.86	4.99
5	1.47	4.71	4.86	4.99
6	1.89	4.69	4.86	5.01
7	2.21	4.71	4.88	5.01
8	2.58	4.71	4.88	5.04
<b>X<sub>prom</sub></b>		4.74	4.87	5.01
<b>S<sub>n-1</sub></b>		0.08	0.01	0.020
<b>U<sub>A</sub></b>		0.04	0.005	0.009
<b>U<sub>B</sub></b>		0.06	0.06	0.07
<b>U<sub>T</sub> (95%)</b>		0.14	0.12	0.14
<b>Resultados</b>		4.74 ± 0.14	4.87 ± 0.12	5.01 ± 0.14

Fehling: Sulfato de cobre 0.2783 molL<sup>-1</sup> (Disolución A) e Hidróxido de sodio X molL<sup>-1</sup> en sal de tartratos 1.2 molL<sup>-1</sup> (Disolución B). Donde, X = 0.00, 0.38, 0.75, 1.13, 1.47, 1.89, 2.21 y 2.58.

RNE: Relación no estimada pues la reacción no fue completa o determinada.

PP: Presencia de precipitado (óxido cuproso).

Con base en la tabla anterior a partir de una disolución B de concentración de hidróxido de sodio 1.13 molL<sup>-1</sup> en disolución de tartratos 1.2 molL<sup>-1</sup> es posible

obtener curvas potenciométricas y relaciones molares de Cu(II)/Fructosa. Por lo tanto, se recomienda trabajar con disoluciones B con una concentración de hidróxido de sodio al menos  $1 \text{ molL}^{-1}$  en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ .

Adicionalmente, con la finalidad de disminuir el error asociado al volumen dispensado al momento de preparar los licores de Fehling y, encontrar las relaciones molares Cu(II)/Fructosa más cercanas a 5/1, se decidió utilizar buretas para tomar los diferentes volúmenes de disolución A y B al preparar los licores de Fehling. De tal forma, que se prepararon licores de Fehling con los siguientes volúmenes: 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0 y 18.0 mL. Por lo que, previamente se elaboraron 500 mL de Sulfato de cobre ( $0.27825 \pm 6 \times 10^{-3}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$ , 500 mL de fructosa ( $0.1003 \pm 2.5 \times 10^{-3}$ )  $\text{molL}^{-1}_{95\%}$  y 4 disoluciones B de 100 mL con las siguientes concentraciones de hidróxido de sodio: 1.2, 1.6, 2.0 y  $2.5 \text{ molL}^{-1}$ , todas en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$ . En la siguiente tabla, se encuentran los resultados obtenidos para las relaciones molares Cu(II)/Fructosa para diferentes volúmenes del licor de Fehling, considerando diferentes disoluciones B.

Tabla 10. Resultados de la relación molar Cu(II)/Fructosa para 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0 y 18.0 mL de licor de Fehling.

Disolución B		Estequiometría Cu(II)/Fruc					
No.	NaOH ( $\text{molL}^{-1}$ )	3 mL Fehling	6 mL Fehling	9 mL Fehling	12 mL Fehling	15 mL Fehling	18 mL Fehling
1	1.20	4.58	4.77	4.99	5.07	4.88	5.05
2	1.60	5.11	5.09	5.16	5.13	5.13	5.16
3	2.00	5.11	5.11	5.16	5.13	4.94	5.16
4	2.50	4.97	4.83	4.95	5.01	4.96	4.97
$X_{\text{prom}}$		4.94	4.95	5.07	5.09	4.98	5.09
$S_{n-1}$		0.25	0.18	0.11	0.06	0.11	0.09
$U_A$		0.13	0.09	0.06	0.03	0.05	0.05
$U_B$		0.13	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09
$U_T (95\%)$		0.37	0.26	0.22	0.19	0.20	0.20
<b>Resultados</b>		$4.94 \pm 0.37$	$4.95 \pm 0.26$	$5.07 \pm 0.22$	$5.09 \pm 0.19$	$4.98 \pm 0.20$	$5.09 \pm 0.20$

Fehling: Sulfato de cobre  $0.27825 \text{ molL}^{-1}$  (Disolución A) e hidróxido de sodio  $X \text{ molL}^{-1}$  en sal de tartratos  $1.2 \text{ molL}^{-1}$  (Disolución B). Donde,  $X = 1.2, 1.6, 2.0$  y  $2.5$ .

Luego de observar los resultados de la tabla 10 se concluye que el valor promedio de la relación molar Cu(II)/Fructosa para los diferentes volúmenes del licor de Fehling es ligeramente sesgado de 5 en la mayoría de los casos. De esta manera, se concluye que utilizar buretas para adicionar los volúmenes de la disolución A y B ha mejorado el resultado promedio de las valoraciones. Sin embargo, los valores han mostraron una imprecisión ligeramente mayor con respecto a los experimentos realizados con el uso de pipetas (Tabla 7 y 9). Finalmente, se confirma que la concentración de hidróxido de sodio en la disolución B de Fehling juega un papel importante en la cuantificación de azúcares reductores y que es necesario emplear una concentración al menos  $1 \text{ molL}^{-1}$  en la disolución B (Tabla 7 y 9) para que se cumpla que 5 moles de Cu(II) reaccionan con un mol de azúcar reductor.

## **5.2 Resultados de análisis fisicoquímicos en mieles**

### **5.2.1 Humedad**

El contenido de humedad en mieles es un factor importante para su conservación; un porcentaje alto, generalmente  $\geq 20 \%$  representará un riesgo de fermentación debido a acción por levaduras. Consecuentemente, se vuelve imprescindible el monitoreo de humedad en mieles; para ello, se utilizó un refractómetro (Atago N-3E). El funcionamiento de este equipo se sustenta en el fenómeno que presenta la luz al cambiar de un medio a otro (refracción) y por medio de esta propiedad es posible estimar los sólidos totales sobre las muestras de miel.

Experimentalmente se colocaron 1 o 2 gotas de la correspondiente muestra sobre el cristal del instrumento; entonces, se cubrió el prisma y se registraron los grados Brix determinados por éste.

A continuación, se presentan los resultados de humedad correspondientes a las muestras de miel analizadas.

Tabla 11. Resultados globales del porcentaje de humedad en mieles de *Apis mellífera*.

Muestra	° Brix medidos	° Brix corregidos	% Humedad ± 0.1 %*
M1 (Japón)	80.60°	80.59°	19.41 %
M2 (Azerbaiyán)	83.20°	83.19°	16.81 %
M3 (Alemania)	82.00°	81.99°	18.01 %
M4 (Japón)	79.00°	78.99°	21.01 %
M5 (Cuba)	80.60°	80.59°	19.41 %
M6 (Alemania)	82.80°	82.79°	17.21 %
M7 (México)	80.80°	80.79°	19.21 %
M8 (México)	82.40°	82.39°	17.61 %
M9 (El Salvador)	83.00°	82.99°	17.01 %
M10 (E.U.A.)	83.00°	82.99°	17.01 %
M11 (México)	80.40°	80.39°	19.61 %
M12 (Canadá)	79.40°	79.39°	20.61 %
M13 (Francia)	83.80°	83.79°	16.21 %
M14 (Canadá)	80.20°	80.19°	19.81 %
M15 (Alemania)	80.80°	80.79°	19.21 %
M16 (Guatemala)	79.60°	79.59°	20.41 %
M17 (Francia)	83.60°	83.59°	16.41 %
M18 (Tailandia)	82.00°	81.99°	18.01 %
M19 (Tailandia)	81.80°	81.79°	18.21 %
M20 (Tailandia)	82.20°	82.19°	17.81 %
M21 (Tailandia)	81.40°	81.39°	18.61 %
M22 (Tailandia)	82.40°	82.39°	17.61 %

\*Con base en el informe de calibración del instrumento se reporta una incertidumbre de  $\pm 0.1$  % para el refractómetro (Atago N-3E).

*Ejemplo de cálculo del contenido de Humedad: Muestra M1.*

$$\text{Grados Brix medidos} = 80.60^\circ$$

$$\text{Grados Brix corregidos} = 80.60^\circ + (-0.0023^\circ)(2) = 80.59^\circ$$

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = 100 - 80.59 = 19.41 \%$$

Con base en la tabla anterior se puede decir que todas las muestras a excepción de tres (M4, M12 y M16) cumplen con la Norma Mexicana NMX-F-036-2006, la cual establece un 20% de humedad como valor máximo para mieles que son producidas por *Apis mellífera*; por lo tanto, las muestras que no se ajustaron a lo

establecido en dicha norma presentarán un riesgo mayor de fermentación. Cabe mencionar que estas tres muestras presentaron olores ligeramente desagradables, quizá como producto de una posible descomposición. Además, estas fueron analizadas anteriormente, por lo que sus condiciones de almacenamiento debieron afectar su calidad. Generalmente una miel puede conservarse por años, perdiendo solo algunas de sus propiedades con el paso del tiempo. Sin embargo, la exposición prolongada a factores externos produce la pérdida de su color, olor y sabor.

### 5.2.2 Cenizas

La determinación de cenizas es referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la completa incineración de la materia orgánica de un alimento. De forma alterna, es mediante la conductividad específica de disoluciones de miel que se puede estimar el contenido de cenizas totales.

Para el correspondiente análisis se prepararon disoluciones a partir de 2.0 mL de disolución madre (Aproximadamente 5g de miel en 10mL) aforados en un matraz volumétrico de 10.0 mL con agua desionizada. Consecutivamente, se registró la conductancia en Siemens (expresada en S u  $\Omega^{-1}$ ) perteneciente a cada disolución; de este valor se restó la conductancia correspondiente al blanco; finalmente, este valor se multiplicó por la constante de celda del instrumento  $K_c$  ( $7.8 \times 10^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para obtener la conductividad específica de la disolución de miel analizada.

La conductividad específica ( $X_m$ ) se substituyó en la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de cenizas totales:

$$A = \frac{X_m - 0.14}{1.74}$$

Donde:

A: Porcentaje de cenizas en miel (%)

$X_m$ : Conductancia específica de solución de miel ( $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Tabla 12. Resultados globales del porcentaje de cenizas en muestras de miel de *Apis melífera*.

Muestra	Concentración (g mL <sup>-1</sup> )	$X_{sm}$ (mS cm <sup>-1</sup> )	$X_m = X_{sm} - X_{H_2O}$ (mS cm <sup>-1</sup> )	% Cenizas	$U_{95\%}$ (% Cenizas)
M1 (Japón)	0.10176	0.190	0.189	0.028	$\pm 1.6 \times 10^{-5}$
M2 (Azerbaiyán)	0.10013	0.464	0.463	0.185	$\pm 4.3 \times 10^{-5}$
M3 (Alemania)	0.10009	0.570	0.569	0.247	$\pm 4.7 \times 10^{-5}$
M4 (Japón)	0.10110	0.228	0.227	0.050	$\pm 2.4 \times 10^{-5}$
M5 (Cuba)	0.10093	0.296	0.295	0.089	$\pm 3.3 \times 10^{-5}$
M6 (Alemania)	0.10009	0.517	0.516	0.216	$\pm 4.5 \times 10^{-5}$
M7 (México)	0.10024	0.266	0.265	0.072	$\pm 2.9 \times 10^{-5}$
M8 (México)	0.10004	0.456	0.455	0.181	$\pm 4.3 \times 10^{-5}$
M9 (El Salvador)	0.10016	0.236	0.234	0.054	$\pm 2.5 \times 10^{-5}$
M10 (E.U.A.)	0.10006	0.380	0.379	0.137	$\pm 3.9 \times 10^{-5}$
M11 (México)	0.10011	0.190	0.189	0.028	$\pm 1.6 \times 10^{-5}$
M12 (Canadá)	0.10015	0.190	0.189	0.028	$\pm 1.6 \times 10^{-5}$
M13 (Francia)	0.10006	0.163	0.162	0.013	$\pm 8.5 \times 10^{-5}$
M14 (Canadá)	0.10008	0.247	0.246	0.061	$\pm 2.7 \times 10^{-5}$
M15 (Alemania)	0.10001	0.289	0.288	0.085	$\pm 3.2 \times 10^{-5}$
M16 (Guatemala)	0.10016	0.217	0.215	0.043	$\pm 2.2 \times 10^{-5}$
M17 (Francia)	0.10012	0.365	0.364	0.129	$\pm 3.8 \times 10^{-5}$
M18 (Tailandia)	0.10009	0.176	0.176	0.020	$\pm 1.3 \times 10^{-5}$
M19 (Tailandia)	0.10002	0.179	0.179	0.022	$\pm 1.3 \times 10^{-5}$
M20 (Tailandia)	0.10008	0.162	0.161	0.012	$\pm 8.1 \times 10^{-6}$
M21 (Tailandia)	0.10003	0.150	0.150	0.006	$\pm 4.0 \times 10^{-6}$
M22 (Tailandia)	0.10009	0.237	0.236	0.055	$\pm 2.5 \times 10^{-5}$

$X_{sm}$ : Conductancia de solución de miel;  $X_{H_2O}$ : Conductancia de agua desionizada y  $X_m$ : Conductancia específica de solución de miel.

De acuerdo con los resultados anteriores todas las muestras de miel presentaron un contenido en cenizas por debajo del 0.6 % (0.6 g de cenizas / 100 g de miel). Por ello puede decirse que todas las muestras cumplen con lo establecido en la norma. Adicionalmente se concluye que estas muestras son de mieles florales pues presentaron una conductividad específica  $X_m < 0.8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  y, no son mieles de mielada  $X_m > 0.8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ , estos parámetros son considerados en el Codex y la Directiva de la Unión Europea.

### 5.2.3 pH

Las lecturas de pH se efectuaron directamente en las mismas disoluciones de miel empleadas en la determinación de cenizas. En la siguiente tabla se encuentran tabulados los resultados correspondientes a las muestras analizadas.

Tabla 13. Resultados globales de la determinación de pH en muestras de miel de *Apis melífera*.

Muestra	pH $\pm$ 0.003*
M1 (Japón)	3.452
M2 (Azerbaiyán)	4.775
M3 (Alemania)	3.705
M4 (Japón)	3.422
M5 (Cuba)	3.746
M6 (Alemania)	4.383
M7 (México)	3.810
M8 (México)	4.564
M9 (El Salvador)	3.782
M10 (E.U.A.)	3.645
M11 (México)	3.550
M12 (Canadá)	3.514
M13 (Francia)	3.589
M14 (Canadá)	3.580
M15 (Alemania)	3.616
M16 (Guatemala)	3.436
M17 (Francia)	3.830
M18 (Tailandia)	3.250
M19 (Tailandia)	3.247
M20 (Tailandia)	3.527
M21 (Tailandia)	3.562
M22 (Tailandia)	4.043

\*Con base en el informe de calibración del instrumento se reporta una incertidumbre de  $\pm$  0.003 pH para un potenciómetro (713 Metrohm).

El valor de pH de las soluciones de miel cae dentro del intervalo de 3 a 5, por lo que las mieles son ácidas; esto es debido principalmente a la disociación de ácidos débiles (orgánicos) y a la presencia de equilibrios de hidrólisis que efectúan algunos metales presentes en su forma iónica al encontrarse en disolución acuosa. El grado de acidez influye sobre el desarrollo de ciertos microorganismos, la actividad enzimática (invertasa, diastasa, glucosa oxidasa, catalasa y fosfatasa ácida) y la textura, entre otras propiedades.

#### **5.2.4 Acidez libre y lactónica**

Para cuantificar la acidez libre, lactónica y total se prepararon dos disoluciones de hidróxido de sodio cercanas a  $10^{-2} \text{ molL}^{-1}$  con agua destilada previamente hervida para eliminar carbonatos. Posteriormente, se estandarizaron con Biftalato de potasio R.A, encontrando así que la concentración de ambas fue:  $9.7 \times 10^{-3}$  y  $9.3 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ . Una vez calculada la concentración, se procedió a adicionar una de ellas en una bureta de 10.0 mL y se efectuó la correspondiente valoración ácido-base. Para ello, se vertieron 500  $\mu\text{L}$  de solución madre en un vaso de precipitados de 50 mL, se adicionó agua destilada hasta cubrir el electrodo de vidrio y se dejó el sistema en agitación constante. Durante la valoración se realizaron adiciones de 0.1 mL de solución titulante, de esta forma se obtuvieron los diagramas para cada valoración y, mediante estos se cuantificó tanto la acidez libre como la lactónica.

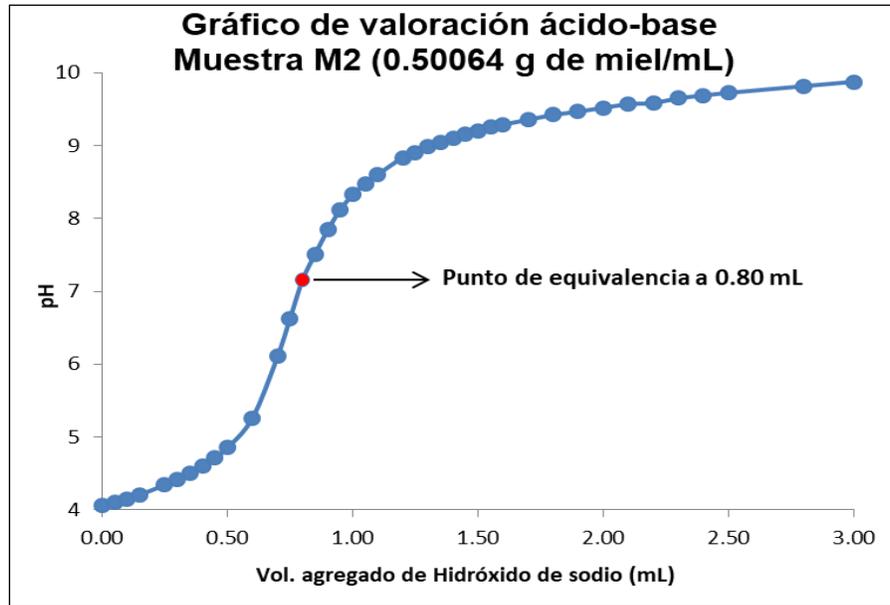


Figura 18. Valoración ácido-base. 500  $\mu\text{L}$  de disolución madre M2 con hidróxido de sodio  $9.7 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ .

Como puede apreciarse en el gráfico anterior (Figura 18) solo hay un punto de equivalencia que concierne al contenido de acidez libre; por consiguiente, esta muestra no contiene acidez láctica. Al considerar el volumen gastado al punto de equivalencia y la concentración del titulante; 0.8 mL de hidróxido de sodio  $9.7 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , el contenido de acidez libre presente en la muestra M2 es el siguiente:

$$H^+ (\text{meq}) = (C_{\text{NaOH}})(V_{\text{NaOH}})$$

$$H^+ (\text{meq}) = \left( \frac{9.7 \times 10^{-3} \text{ meq}}{\text{mL}} \right) (0.8 \text{ mL}) = 7.76 \times 10^{-3} \text{ meq}$$

$$[H^+] = \left( \frac{7.76 \times 10^{-3} \text{ meq}}{0.5 \text{ mL}} \right) = 1.55 \times 10^{-2} \text{ meq/mL}$$

Para expresar la acidez libre en los términos sugeridos en la norma mexicana ( $\text{meq H}^+ / \text{Kg de miel}$ ) hay que considerar la forma en que fue elaborada la disolución madre de miel para la muestra M2, de acuerdo con esto:

$$\frac{meq H^+}{Kg} = \left( \frac{1.55 \times 10^{-2} meq}{mL} \right) \left( \frac{10 mL}{5.0064 g} \right) \left( \frac{1000 g}{1 Kg} \right) = 31 meq/Kg$$

Este mismo procedimiento se utilizó en las muestras restantes, encontrando únicamente la presencia de acidez libre y descartando la acidez láctica debido a que en todos los casos se obtuvieron gráficas con un solo punto de equivalencia.

A continuación, en la tabla siguiente se muestran los resultados de las muestras de miel analizadas.

Tabla 14. Resultados globales del contenido de acidez libre en muestras de miel de *Apis mellifera*.

Muestra	Acidez libre (meq·Kg <sup>-1</sup> )	U <sub>95%</sub> (meq·Kg <sup>-1</sup> )
M1 (Japón)	9.53	± 0.23
M2 (Azerbaiyán)	31.00	± 0.73
M3 (Alemania)	8.72	± 0.21
M4 (Japón)	14.39	± 0.35
M5 (Cuba)	25.95	± 0.63
M6 (Alemania)	33.47	± 0.81
M7 (México)	8.71	± 0.21
M8 (México)	29.50	± 0.72
M9 (El Salvador)	14.47	± 0.35
M10 (E.U.A.)	14.35	± 0.35
M11 (México)	22.10	± 0.54
M12 (Canadá)	13.00	± 0.32
M13 (Francia)	9.29	± 0.23
M14 (Canadá)	9.29	± 0.23
M15 (Alemania)	20.46	± 0.50
M16 (Guatemala)	20.43	± 0.50
M17 (Francia)	5.57	± 0.14
M18 (Tailandia)	5.58	± 0.14
M19 (Tailandia)	9.30	± 0.23
M20 (Tailandia)	5.58	± 0.14
M21 (Tailandia)	9.30	± 0.23
M22 (Tailandia)	5.58	± 0.14

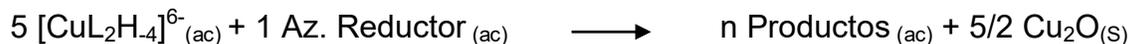
Los niveles de acidez libre para estas muestras se encuentran por debajo de 40 meq·kg<sup>-1</sup>; por consiguiente, todas las muestras cumplen con la norma mexicana y son aptas para su consumo. El ácido más abundante en una miel es el ácido glucónico que se encuentra en equilibrio con la gluconolactona.

Aunque es sabido que durante una fermentación también se incrementan los niveles de acidez, algunas muestras tienen la particularidad de ser más ácidas, tal es el caso de la miel de abeja *meliponini*. El sobrecalentamiento es otro factor que contribuye al incremento de acidez sobre una muestra.

### 5.2.5 Azúcares reductores

En la cuantificación de azúcares reductores en miel se utilizó el método volumétrico de Fehling, este se basa en una reacción redox, donde los azúcares reductores se oxidan y el ión Cu(II) que forma un complejo en disolución con la sal de tartratos a pH básico ( $[\text{CuL}_2\text{H}_4]^{6-}$ )<sup>[37]</sup> se reduce, formando de esta manera un precipitado de color rojo ladrillo Cu<sub>2</sub>O.

Aunque muchos autores declaran que es desconocida la estequiometría de esta reacción, se sabe experimentalmente que 5 moles de Cu(II) reaccionan con 1 mol de azúcar reductor a la temperatura de ebullición.<sup>[7,38]</sup> Por lo tanto se plantea lo siguiente:



Esta reacción se monitoreó de acuerdo con el procedimiento desarrollado en varias tesis previas a la presente, usando un simple alambre de cobre, un electrodo de Ag/AgCl/KCl<sub>(ac)</sub> 3 molL<sup>-1</sup> y un potenciómetro; por lo tanto, es una adaptación que está al alcance de cualquier laboratorio pues el costo del material es relativamente barato y es una técnica que cualquier estudiante puede manipular sin el más mínimo problema. Si recordamos que una potenciometría

consiste en el registro del potencial de una solución en función de titulante agregado el cual a su vez reacciona con una sustancia de interés (analito) y como resultado es posible obtener un gráfico a través del cual se determina el punto a la equivalencia de la reacción redox. En el caso de la reacción de Fehling este punto se encuentra a 5/6 del potencial impuesto por la especie  $[\text{CuL}_2\text{H}_4]^{6-}$  o también a 1/6 del potencial condicional del azúcar reductor. Entonces, sencillamente se puede plantear la siguiente ecuación que describe el potencial de equilibrio al punto de equivalencia:

$$E = E_{\frac{\text{Cu}^{2+}}{\text{Cu}^+}} + \frac{5}{6} \Delta E^{[18]}$$

De modo que, antes de efectuar la correspondiente valoración, se preparó una disolución a partir de 250  $\mu\text{L}$  de disolución madre aforados con agua destilada en un matraz de 25.0 mL. Esta disolución se colocó en una bureta de 10.0 mL y se procedió a montar el siguiente sistema, formado por: un electrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  3 mol  $\text{L}^{-1}$ , como electrodo de referencia, un alambre de cobre, como electrodo de trabajo y un milivoltímetro. Posteriormente, en un vaso de precipitados de 50 mL se adicionaron 3.0 mL de disolución de Sulfato de cobre 0.27825 mol $\text{L}^{-1}$  y 3.0 mL de disolución de L-(+)-tartrato de sodio y potasio 1.2 mol $\text{L}^{-1}$  en hidróxido de sodio 2.5 mol $\text{L}^{-1}$ , asimismo, se adicionó suficiente agua destilada hasta cubrir los electrodos del sistema descrito anteriormente y una gota de azul de metileno al 1%. Esta solución se calentó hasta llevar al punto de ebullición; una vez que esto sucede y, con una agitación vigorosa en el sistema, se procede a adicionar lentamente la disolución de miel. Para identificar el punto de equivalencia en esta reacción hay dos posibilidades: el vire del indicador azul de metileno (azul rey-incoloro) y de forma potenciométrica. A continuación, se presenta la curva de valoración potenciométrica obtenida para la muestra M15.

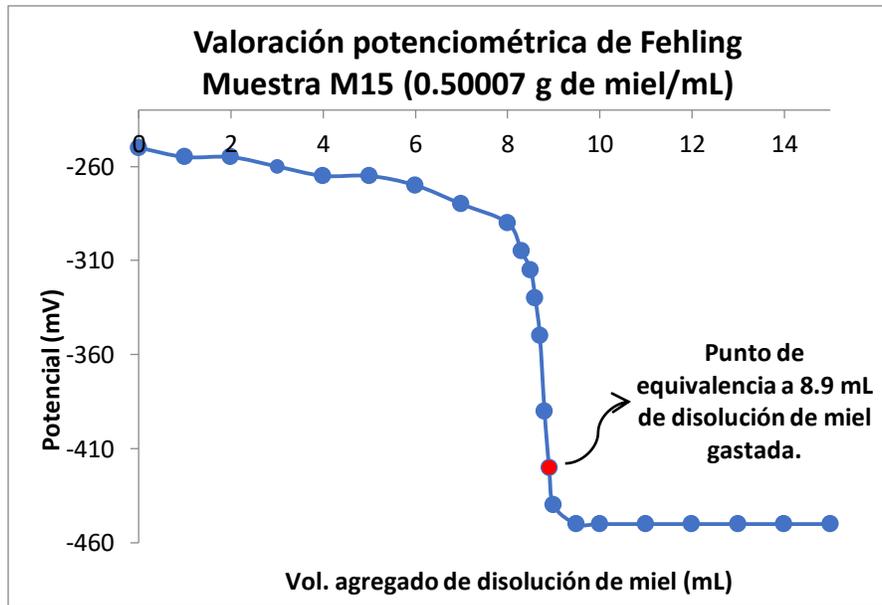


Figura 19. Curva potenciométrica para 3.0 mL de licor de Fehling (Disolución A y B) con una disolución de miel de la muestra M15 (250  $\mu$ L de disolución madre aforados a 25.0 mL).

Con base en la gráfica anterior se determinó el punto a la equivalencia, el cual se encuentra a  $5/6 \Delta E$  que corresponde con 9.0 mL de disolución de miel empleada. Entonces, el contenido de azúcares reductores presente en la muestra de miel será el siguiente:

*Ejemplo de cálculo del contenido de azúcares reductores: Muestra M15.*

$$Cu(II)(mmol) = (3.0 \text{ mL}) \left( \frac{0.2783 \text{ mmol}}{\text{mL}} \right) = 0.8349 \text{ mmol}$$

$$Az. \text{ reductor (mmol)} = (0.8349 \text{ mmol Cu(II)}) \left( \frac{1}{5} \right) = 0.1669 \text{ mmol}$$

$$Az. \text{ reductor (g)} = (0.1669 \text{ mmol}) \left( \frac{180.16 \text{ mg}}{\text{mmol}} \right) = 30.07 \text{ mg} = 0.03007 \text{ g}$$

$$Muestra \text{ (g)} = \left( \frac{0.50007 \text{ g}}{\text{mL}} \right) \left( \frac{0.25 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right) (8.9 \text{ mL}) = 0.04450 \text{ g}$$

$$\% \text{ Az. reductor} = \left( \frac{\text{masa de Az. reductor}}{\text{masa de muestra}} \right) (100)$$

$$\% \text{ Az. reductor} = \left( \frac{0.03007 \text{ g}}{0.04450 \text{ g}} \right) (100) = 67.57 \%$$

Tabla 15. Resultados globales del contenido de azúcares reductores en las muestras de miel.

Muestra	% Azúcares reductores	$U_{95\%}$ (% Azúcares)
M1 (Japón)	67.95	$\pm 2.17$
M2 (Azerbaiyán)	63.24	$\pm 2.01$
M3 (Alemania)	71.55	$\pm 2.29$
M4 (Japón)	71.69	$\pm 2.29$
M5 (Cuba)	72.68	$\pm 2.33$
M6 (Alemania)	65.89	$\pm 2.10$
M7 (México)	77.95	$\pm 2.50$
M8 (México)	73.77	$\pm 2.36$
M9 (El Salvador)	73.85	$\pm 2.36$
M10 (E.U.A.)	80.18	$\pm 2.58$
M11 (México)	79.46	$\pm 2.55$
M12 (Canadá)	72.37	$\pm 2.31$
M13 (Francia)	79.10	$\pm 2.54$
M14 (Canadá)	69.89	$\pm 2.23$
M15 (Alemania)	67.57	$\pm 2.13$
M16 (Guatemala)	69.83	$\pm 2.23$
M17 (Francia)	72.39	$\pm 2.32$
M18 (Tailandia)	74.20	$\pm 2.38$
M19 (Tailandia)	64.67	$\pm 2.06$
M20 (Tailandia)	73.30	$\pm 2.35$
M21 (Tailandia)	68.30	$\pm 2.18$
M22 (Tailandia)	66.78	$\pm 2.13$

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-F-036-2006 se establece que el contenido de azúcares reductores en una muestra de miel debe encontrarse por encima del 63.88 % para mieles producidas por *Apis mellífera*. Con base en este criterio todas las muestras cumplen con el contenido mínimo requerido de azúcares reductores, salvo la muestra M2 que tiene porcentaje de 63.24 %. En efecto, el error de esta muestra con respecto al valor establecido en la norma es ínfimo, quizá, como producto de un error de carácter aleatorio durante el proceso de cuantificación. Finalmente, a pesar de que el valor de M2 cuenta con una incertidumbre de  $\pm 2.01$ , se decide rechazar el producto. De tal modo que, todas las muestras de miel a excepción de M2 cumplen con el contenido de azúcares reductores decretados en la Norma Mexicana (NMX-F-036-2006).

### 5.2.6 Fructosa

Para cuantificar el contenido de fructosa en las muestras se utilizó la Polarografía Diferencial de Impulsos y el método de adiciones estándar.

Por lo tanto, en una celda electrolítica se adicionaron 10.0 mL de  $\text{CaCl}_2$   $1 \text{ molL}^{-1}$  (electrolito soporte), consecutivamente, se llevó a cabo un barrido de potencial desde 73.20 mV a  $-2100 \text{ mV}$  para obtener la señal residual. Entonces, se adicionaron  $25 \mu\text{L}$  de disolución madre y, se efectuaron 5 adiciones de  $30 \mu\text{L}$  de una solución estándar de fructosa  $9.85 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ , obteniendo de esta forma los polarogramas durante cada etapa del proceso. En las condiciones establecidas de trabajo, la fructosa presentó dos señales atribuidas a reducción. Una de las señales se presentó a  $E_{1/2} = -1560 \text{ mV}$  y la otra a  $E_{1/2} = -1720 \text{ mV}$ . Ambas señales presentan diferencias; sin embargo, para efectos cuantitativos se decidió trabajar con la señal a  $E_{1/2} = -1560 \text{ mV}$ , pues al manipular sus datos se obtiene una mejor correlación lineal.

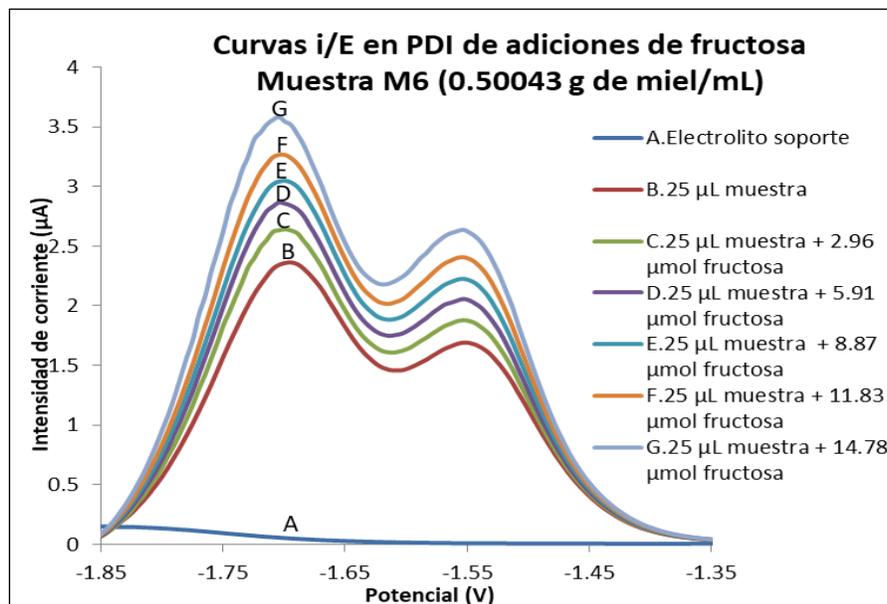


Figura 20. Polarograma diferencial de impulsos. Condiciones: potencial inicial  $-1850 \text{ mV}$ , potencial final  $-1350 \text{ mV}$ , velocidad de barrido (V/s)  $0.005$ , amplitud de impulso (V)  $0.050$ , tiempo de impulso(s)  $0.040$  y tamaño de gota:  $4$ .

Para la elaboración de la recta de adiciones patrón, se graficó la corriente de pico correspondiente a  $E_{1/2} = -1560$  mV contra la cantidad de fructosa añadida a la celda electrolítica. De la muestra de miel M6 se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de solución madre ( $0.50043 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se trazó el correspondiente polarograma; asimismo se obtuvieron los polarogramas para adiciones de 30  $\mu\text{L}$  de solución patrón de fructosa  $9.85 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cada adición contenía:

$$\begin{aligned} & \mu\text{mol de fructosa por cada adición de } 30 \mu\text{L:} \\ (30 \mu\text{L}) & \left( \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} \right) \left( \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{9.85 \times 10^{-2} \text{ mol}}{\text{L}} \right) \left( \frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \right) \\ & = 2.955 \mu\text{mol } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \end{aligned}$$

La cantidad de fructosa presente en la muestra de miel se calcula por medio de la intersección de la recta obtenida sobre el eje de las abscisas.

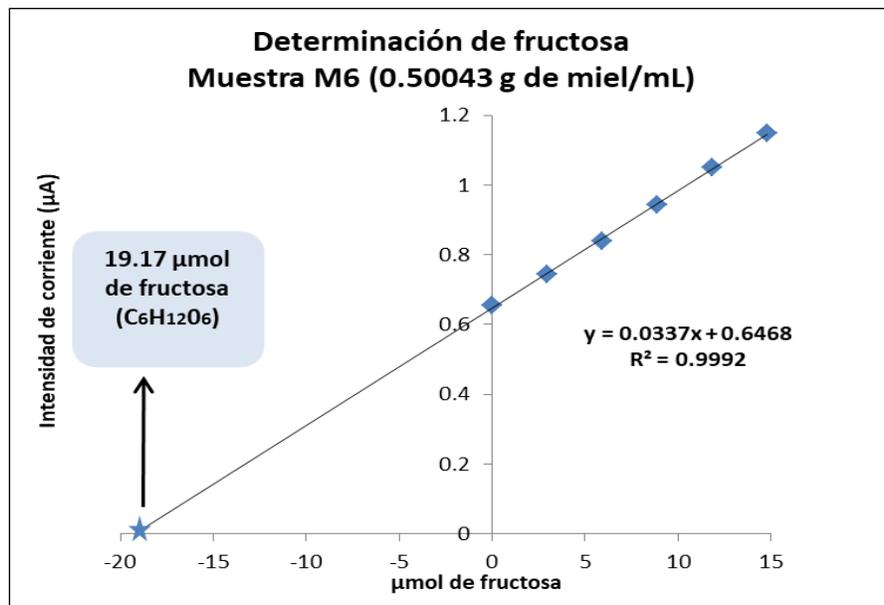


Figura 21. Gráfico lineal obtenido por el método de adiciones patrón de Fructosa.

*Ejemplo de cálculo del contenido de fructosa: Muestra M6.*

$$Y = 0.0337x + 0.6468$$

$$\text{Si } Y = 0$$

$$0 = 0.0337x + 0.6468$$

$$x = 19.17 \mu\text{mol de Fructosa}$$

$$\text{Fructosa (g)} = (19.17 \mu\text{mol}) \left( \frac{180.16 \mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right) \left( \frac{1 \times 10^{-6} \text{g}}{\mu\text{g}} \right) = 3.45 \times 10^{-3} \text{g}$$

$$\text{Miel (g)} = (25 \mu\text{L}) \left( \frac{1 \times 10^{-3} \text{mL}}{\mu\text{L}} \right) \left( \frac{0.5004 \text{g}}{\text{mL}} \right) = 1.25 \times 10^{-2} \text{g}$$

$$\% \text{ Fructosa} = \left( \frac{\text{masa de fructosa}}{\text{masa de muestra}} \right) (100)$$

$$\% \text{ Fructosa} = 27.60 \%$$

Tabla 16. Resultados globales del contenido de Fructosa presente en las muestras de miel.

Muestra	% Fructosa	U <sub>95%</sub> (% Fructosa)
M1 (Japón)	36.40	± 1.22
M2 (Azerbaiyán)	40.61	± 1.52
M3 (Alemania)	38.00	± 1.82
M4 (Japón)	42.43	± 3.81
M5 (Cuba)	39.51	± 6.76
M6 (Alemania)	27.60	± 1.24
M7 (México)	42.15	± 1.85
M8 (México)	38.57	± 2.73
M9 (El Salvador)	33.19	± 4.10
M10 (E.U.A.)	35.80	± 3.18
M11 (México)	36.50	± 0.79
M12 (Canadá)	38.36	± 2.40
M13 (Francia)	37.80	± 2.12
M14 (Canadá)	36.10	± 3.63
M15 (Alemania)	23.39	± 1.71
M16 (Guatemala)	26.47	± 2.43
M17 (Francia)	31.77	± 1.46
M18 (Tailandia)	28.84	± 1.03
M19 (Tailandia)	35.30	± 2.00
M20 (Tailandia)	37.50	± 3.29
M21 (Tailandia)	33.80	± 2.93
M22 (Tailandia)	35.60	± 1.81

La fructosa es uno de los monosacáridos presentes en mayor proporción en las mieles y su variación es debida a la región y floración con la que las abejas han estado en contacto. La norma mexicana no considera este azúcar dentro de los parámetros de calidad; sin embargo, se sabe que una miel puede ser adulterada con jarabe alto en fructosa o incluso con sacarosa o glucosa.

### 5.2.7 Sacarosa

Para esta prueba se transvasaron 250  $\mu$ L de disolución madre de miel a un matraz volumétrico de 25.0 mL, posteriormente se adicionó una pequeña cantidad de agua destilada y 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Este sistema se dejó en reposo por aproximadamente 24 horas y, una vez concluido este tiempo, se adicionó agua destilada hasta aforar la disolución. Finalmente se utilizó el mismo método de Fehling y, mediante un cálculo sencillo se determinó el porcentaje de sacarosa presente en cada muestra de miel.

Tabla 17. Resultados globales del contenido de sacarosa presente en las muestras de miel.

Muestra	% Sacarosa	$U_{95\%}$ (% Sacarosa)
M1 (Japón)	3.71	$\pm 0.50$
M2 (Azerbaiyán)	5.69	$\pm 0.49$
M3 (Alemania)	7.28	$\pm 0.50$
M4 (Japón)	4.92	$\pm 0.50$
M5 (Cuba)	7.58	$\pm 0.50$
M6 (Alemania)	4.87	$\pm 0.50$
M7 (México)	7.98	$\pm 0.60$
M8 (México)	2.83	$\pm 0.55$
M9 (El Salvador)	1.82	$\pm 0.54$
M10 (E.U.A.)	1.17	$\pm 0.59$
M11 (México)	0.00	
M12 (Canadá)	0.00	

Muestra	% Sacarosa	U <sub>95%</sub> (% Sacarosa)
M13 (Francia)	0.00	
M14 (Canadá)	3.09	± 0.50
M15 (Alemania)	9.17	± 0.50
M16 (Guatemala)	12.34	± 0.52
M17 (Francia)	4.97	± 0.50
M18 (Tailandia)	0.84	± 0.50
M19 (Tailandia)	1.32	± 0.51
M20 (Tailandia)	0.00	
M21 (Tailandia)	6.34	± 0.49
M22 (Tailandia)	0.00	

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-F-036-2006 se establece que el contenido de sacarosa en muestras de miel debe ser igual o menor al 5%; por lo tanto, las muestras M2, M3, M5, M7, M15, M16 y M21 no cumplen con la norma. En contraste, el Codex Alimentarius y la Directiva Europea consideran valores por encima del 5 % de sacarosa; por ejemplo, para mieles de alfalfa, citrus spp., falsa acacia, etc. ( $\leq 10$  %) Además, las mieles de espliego y borraja pueden tener un contenido en sacarosa hasta del 15 %.

### 5.2.8 Hidroximetilfurfural (HMF)

La determinación de HMF se realizó mediante electroquímica por el método de Polarografía Diferencial de Impulsos y el de adiciones patrón. Se detectó la señal de reducción del HMF mediante el trazado de los polarogramas de intensidad de corriente contra potencial, utilizando el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo.

La reducción electroquímica se lleva a cabo sobre el grupo formilo del HMF, dando lugar a una señal en la zona de reducción.<sup>[13]</sup> La determinación de HMF es quizá el mejor parámetro que ayuda a determinar el manejo y almacenamiento de la miel.

La norma indica como método oficial al método Winkler<sup>[41]</sup>, el cual emplea reactivos con ácido barbitúrico, que tiene uso restringido en México.

Experimentalmente se emplearon 10 mL de una solución buffer (Boratos a pH=10) como electrolito soporte. Consecutivo a la obtención de la señal residual se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de una solución madre de miel (del orden de 0.5 g/mL) y se efectuó el correspondiente barrido, de tal manera que, si no se observa señal, se adicionan otros 500  $\mu\text{L}$  de muestra. Si en definitiva en la segunda adición no hay señal, no se adiciona más solución de miel, ya que el contenido de HMF se encuentra por debajo del Límite de Detección (LD). No obstante, si se observa señal, se procede a efectuar adiciones de 20  $\mu\text{L}$  de una solución patrón de HMF  $1.18 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ . A continuación se muestra como ejemplo el polarograma resultante de la muestra 13, obtenido por Polarografía Diferencial de Impulsos.

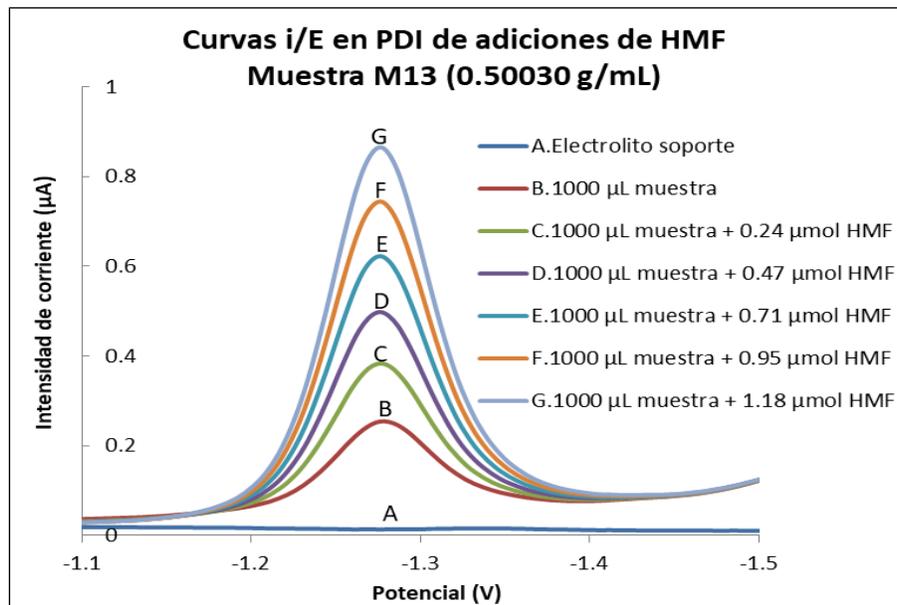


Figura 22. Polarograma diferencial de impulsos. Condiciones: potencial inicial -1100 mV, potencial final -1500 mV, velocidad de barrido (V/s) 0.005, amplitud de impulso (V) 0.050, tiempo de impulso(s) 0.040 y tamaño de gota: 4.

Al considerar la concentración del patrón de HMF que se empleó sobre esta determinación, se calcula que cada adición de 20  $\mu\text{L}$  de solución patrón contiene 0.2367  $\mu\text{mol}$  de HMF. Por lo tanto, estos valores correspondientes a cada adición se graficaron contra el corriente límite de pico medida, obteniéndose así la curva de adiciones patrón, como se muestra en la figura siguiente.

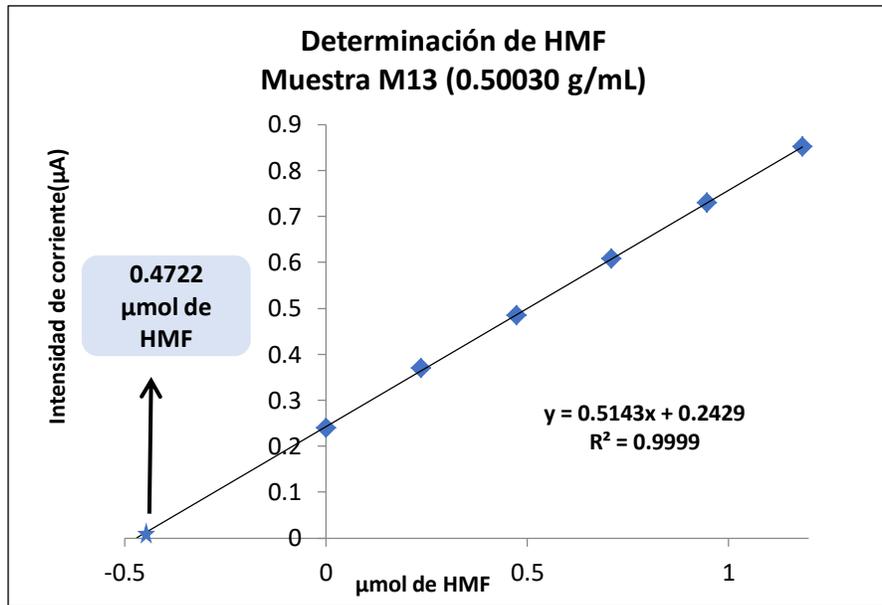


Figura 23. Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón para cuantificar HMF presente en la muestra 13.

La cantidad de HMF presente en la muestra de miel se calcula por la intersección de la recta sobre el eje de las abscisas. Por tanto, del gráfico para M13 se obtiene:

*Contenido de HMF: Muestra M13.*

$$Y = 0.5143x + 0.2429$$

$$\text{Si } Y = 0$$

$$0 = 0.5143x + 0.2429$$

$$x = 0.4722 \text{ } \mu\text{mol de HMF}$$

$$\text{miel} \left( \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = 0.50030 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

$$\text{alícuota} = 1.0 \text{ mL}$$

$$\text{miel (Kg)} = \left( \frac{0.50030 \text{ g}}{\text{mL}} \right) (1 \text{ mL}) \left( \frac{1 \times 10^{-3} \text{ Kg}}{\text{g}} \right) = 5.003 \times 10^{-4} \text{ kg}$$

$$\text{HMF (mg)} = (0.4722 \text{ } \mu\text{mol}) \left( 126.11 \frac{\mu\text{g}}{\text{mmol}} \right) \left( \frac{1 \times 10^{-3} \text{ mg}}{\mu\text{g}} \right) = 0.0595 \text{ mg}$$

$$\text{HMF (ppm)} = \left( \frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right) = \left( \frac{0.0595 \text{ mg}}{5.003 \times 10^{-4} \text{ kg}} \right) = 118.92 \text{ ppm}$$

Tabla 18. Resultados globales del contenido de 5-(hidroximetil)-2-furfuraldehído presente en las muestras de miel.

Muestra	HMF (ppm)	U <sub>95%</sub> (ppm)
M1 (Japón)	184.25	± 7.19
M2 (Azerbaiyán)	<LD	
M3 (Alemania)	131.01	± 6.79
M4 (Japón)	249.20	± 9.53
M5 (Cuba)	50.88	± 1.82
M6 (Alemania)	45.91	± 1.26
M7 (México)	<LD	
M8 (México)	<LD	
M9 (El Salvador)	171.02	± 20.58
M10 (E.U.A.)	56.98	± 1.30
M11 (México)	25.22	± 0.71
M12 (Canadá)	263.20	± 16.53
M13 (Francia)	118.92	± 3.92
M14 (Canadá)	259.83	± 35.40
M15 (Alemania)	301.40	± 16.66
M16 (Guatemala)	88.80	± 4.71
M17 (Francia)	146.35	± 27.23
M18 (Tailandia)	110.89	± 2.91
M19 (Tailandia)	77.43	± 6.78
M20 (Tailandia)	42.64	± 1.00
M21 (Tailandia)	40.22	± 1.70
M22 (Tailandia)	41.52	± 1.35

<LD: Debajo del Límite de Detección.

La norma establece un contenido máximo de 40 ppm de HMF para mieles recién cosechadas y de 80 ppm para aquellas con más de seis meses de envasado. Conforme con esto las muestras M2, M7, M8, M11 y M21 cumplen con la normativa, de las cuales tres de ellas son de origen mexicano y son mieles frescas. Las muestras M5, M6, M10, M19, M20, M21 y M22 también aprueban la norma y probablemente tengan más de seis meses desde su cosecha. Las muestras restantes contienen niveles altos de HMF; si se considera que es uno de los parámetros más importantes, se concluye que estas mieles son de baja calidad y que sus condiciones de almacenamiento no han sido las adecuadas.

### 5.2.9 Resultados globales

Tabla 19. Resultados globales.

Muestras	Azúcares Reductores (%p/p)	Fructosa (%p/p)	Sacarosa (%p/p)	HMF (mg/Kg)	pH	Acidez total (meq*Kg)	Humedad (%p/p)	Sólidos (g/100g miel)
M1 (Japón)	67.95	36.40	3.71	184.25	3.452	9.53	19.41	0.028
M2 (Azerbaiyán)	63.24	40.61	5.69	<LD	4.775	1.00	16.81	0.185
M3 (Alemania)	71.55	38.00	7.28	131.01	3.705	8.72	18.01	0.247
M4 (Japón)	71.69	42.43	4.92	249.20	3.422	14.39	21.01	0.050
M5 (Cuba)	72.68	39.51	7.58	50.88	3.746	25.95	19.41	0.089
M6 (Alemania)	65.89	27.60	4.87	45.91	4.383	33.92	17.21	0.216
M7 (México)	77.95	42.15	7.98	<LD	3.810	8.71	19.21	0.072
M8 (México)	73.77	38.57	2.83	<LD	4.564	29.50	17.61	0.181
M9 (El Salvador)	73.85	33.19	1.82	171.02	3.782	14.47	17.01	0.054
M10 (E.U.A.)	80.18	35.80	1.17	56.98	3.645	14.35	17.01	0.137
M11 (México)	79.46	36.50	0.00	25.22	3.550	22.10	19.61	0.028
M12 (Canadá)	72.37	38.36	0.00	263.20	3.514	13.00	20.61	0.028
M13 (Francia)	79.10	37.80	0.00	118.92	3.589	9.29	16.21	0.013
M14 (Canadá)	69.89	36.10	3.09	259.83	3.580	9.29	19.81	0.061
M15 (Alemania)	66.82	23.39	9.17	301.40	3.616	20.46	19.21	0.085
M16(Guatemala)	69.83	26.47	12.34	88.80	3.436	20.43	20.41	0.043
M17 (Francia)	72.39	31.77	4.97	146.35	3.830	5.57	16.41	0.129
M18 (Tailandia)	74.20	28.84	0.84	110.89	3.250	5.58	18.01	0.020
M19 (Tailandia)	64.67	35.30	1.32	77.43	3.247	9.30	18.21	0.022
M20 (Tailandia)	73.30	37.50	0.00	42.64	3.527	5.58	17.81	0.012
M21 (Tailandia)	68.30	33.80	6.34	40.22	3.562	9.30	18.61	0.006
M22 (Tailandia)	66.78	35.60	0.00	41.52	4.043	5.58	17.61	0.055

<LD: Debajo del Límite de Detección.

Para establecer la calidad de una muestra de miel, basta con determinar su contenido de HMF, azúcares reductores y nivel de acidez. Por lo tanto, muestras como M5, M6, M7, M8, M10, M11, M19, M20, M21 y M22 son consideradas de buena calidad. Las restantes son de baja calidad dado que presentaron un alto contenido de HMF; salvo M2 que se descarta por su bajo contenido de azúcares reductores. El calentamiento y la exposición prolongada a la luz de una muestra eleva los niveles de HMF, producto de degradación de azúcares. Por este motivo, son importantes las condiciones de almacenamiento para conservar una muestra.

## 6. CONCLUSIONES

Se lograron determinar los principales parámetros acordados en la Norma Mexicana (NMX-F-036-NORMEX-2006), dentro de los cuales el HMF es uno de los indicadores más importantes a considerar, pues su presencia se encuentra relacionada a una exposición prolongada a niveles altos de temperatura por exposición al sol o debida a calentamiento. Cabe mencionar que las muestras mexicanas cumplen e inclusive presentan niveles que se encuentran por debajo del LD de la técnica empleada.

El hidróxido de sodio es necesario para efectuar la reacción redox de Fehling; a partir de una concentración de  $1 \text{ molL}^{-1}$  de este reactivo en la disolución B se definen curvas potenciométricas experimentales, las cuales son útiles en la determinación de azúcares reductores.

Fue posible cuantificar el contenido de azúcares reductores por medio de una potencimetría; en general el contenido de estos en mieles se debe principalmente a fructosa y glucosa. Todas las muestras presentaron un contenido en azúcares dentro del 60 y 80%. De acuerdo con lo establecido en la Norma Mexicana este contenido debe ser mayor a 64 %. Por lo que únicamente la muestra M2 no cumplió con lo establecido en esta norma.

Con base en la Norma Mexicana se establece un contenido en sacarosa menor o igual al 5%; en general sólo algunas muestras cumplieron con este parámetro y se encontraron por debajo de ese valor. No obstante, algunas muestras como M15 (9.17%) y M16 (12.34%), presentaron valores anormales en su contenido de sacarosa. Todo parece indicar que durante la hidrólisis ácida hubo rupturas de algún polisacárido que genere una mayor concentración de azúcares reductores o bien que la miel fue cosechada antes de haber llegado a maduración.

En cuanto al nivel de acidez presente en las muestras todas cumplieron con lo acordado en la Norma Mexicana pues su contenido está por debajo de 40 meq / Kg. Además, de acuerdo con las curvas experimentales obtenidas se sabe que la acidez total corresponde a la libre, pues si se hubiera presentado la acidez láctica se habrían observado dos puntos de equivalencia en el gráfico de valoración.

El pH de disoluciones de las muestras es ácido y se encuentra entre 3 y 5; esta acidez se debe principalmente a ácidos débiles presente en las muestras.

Los valores de humedad encontrados fueron los permitidos para mieles de *Apis mellifera*, por lo que su valor en humedad es menor al 20% en la mayoría de los casos, salvo las muestras M4, M12 y M16.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1]Romero, D. (2013). Estudio de la calidad de la miel basado en procedimientos electroquímicos. Posgrado Facultad de Química. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. p.7.
- [2]Martínez, J. D. (2016). Determinación por métodos analíticos de la calidad de la miel de abejas nativas sin aguijón (Apidae: Meliponini) en la cuenca del balsas, Michoacán México. Posgrado Facultad de Química. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. p.13.
- [3]Bolaños Solórzano, K. A., Lemus, M., Gloribel, M., & Pineda Anaya, K. E. (2008). Uso de la miel de chumelo (*Tetragonisca angustula*) como coadyuvante en el proceso de cicatrización de heridas en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de encaste de Neozelandés (Tesis Doctoral, Universidad de El Salvador).
- [4]Dardón, M. J. (2005). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel blanca producida por *Meliponas Becheii* en Guatemala. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. p.13.
- [5]Dardón, M.J. y Enriquez E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (melliponini) de Guatemala. *Interciencia*. 33(12), 916-922.
- [6]Crane, Eva. (1985). *El libro de la miel*. CDMX: Fondo de Cultura Económica.
- [7]Preza de la Vega J. (2007). Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles. D.F. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.pp. 36-42.
- [8]SAGARPA. (2016). 4to. Informe de labores 2015-2016. México: Gobierno de México.
- [9]Producción de miel en 2017. En línea, consultado el 30 de julio de 2017: <https://datos.gob.mx/busca/dataset/produccion-de-miel2017>
- [10]Producción de miel en la República Mexicana 2012-2016. En línea, consultado el 16 de agosto de 2018: <https://novedadesaca.mx/mexico-miel-nivel-mundial/>

- [<sup>11</sup>]Gazcón, N. (2012). Aplicación de la electroquímica analítica al control de la calidad de productos apícolas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional a Distancia. Madrid, España.
- [<sup>12</sup>]Historia de la apicultura. En línea, consultado el 30 de julio de 2017: <https://abejas.org/la-apicultura/historia-apicultura/>
- [<sup>13</sup>]Díaz, A. (2012). Aporte analítico al conocimiento de la calidad de la miel. Comparación entre algunas mieles mexicanas y extranjeras. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [<sup>14</sup>]Norma mexicana, NMF-F-036-NORMEX-2006, Alimentos- miel-especificaciones y métodos de prueba, Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C., México, D.F., 2006.
- [<sup>15</sup>]Xolalpa, A. (2010). Evaluación de las características de inocuidad y calidad en mieles mexicanas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 1-80.
- [<sup>16</sup>] Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., & Sužnjević, D. Ž. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of food composition and analysis*, 30(1), 13-18.
- [<sup>17</sup>]Acquarone, C., Buera, P., & Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 101(2), 695-703.
- [<sup>18</sup>]Chicas, D.F. (2014). Determinación de parámetros fisicoquímicos en mieles y propóleos de distintos géneros de abejas por medio de técnicas electroanalíticas. Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador.
- [<sup>19</sup>]White, J. W., & Doner, L. W. (1980). Honey composition and properties. *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook*, 335, 82-91.
- [<sup>20</sup>]Quisumbing, F. A., & Thomas, A. W. (1921). Conditions affecting the quantitative determination of reducing sugars by Fehling solution. Elimination of certain errors involved current in methods. *Journal of the American Chemical Society*, 43(7), 1503-1526.

- [21]Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental* (No. 543.4/ 5). McGraw-Hill Interamericana de España.
- [22]Reyes García, G. (2016). Control analítico y síntesis de complejos metálicos con curcumina. CDMX. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 18.
- [23]Guerash-Silva, U. B. (2014). Estudio electroquímico de la purpurina. CDMX. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [24]Aviña-Reyes, D. (2018). Estudio Químico Analítico de la composición metálica principal de algunas meteoritas mexicanas. CDMX. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 14.
- [25]Harris, D.C. (2001). Análisis químico cuantitativo. Ed. Reverté. 2da. Edición. España. pp. 461-475.
- [26]Skoog D., West D., Holler F. & Crouch, S. (2005). Fundamentos de Química Analítica (8va Ed). Thomson, México, 675-703.
- [27]González, C. Análisis aplicado a la Ingeniería Química. Métodos Voltamperométricos y Polarografía. En línea, consultado el 25 de agosto de 2018: [http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_9.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_9.pdf)
- [28]Velásquez-Reales, J.A. (2014). Aplicación de técnicas electroquímicas en el control de la calidad de la miel. Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador. pp. 22-23.
- [29]Skoog, D., Holler F., Crouch S. (2001). Principios de Análisis Instrumental. McGrawHill.
- [30]Harris, D. (2012). Análisis Químico Cuantitativo (Sexta edición). Barcelona: Reverté.
- [31]Pingarrón y Sánchez. (2003). Química Electroanalítica, Fundamentos y aplicaciones. Madrid: Síntesis.
- [32]Pingarrón Carrazón, J. M. y Sánchez Batanero, P. (2003). Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones. 1a Edición, Editorial Síntesis. 60-85. *Madrid España*.

- [33] Bagotsky, V.S. "Fundamentals of Electrochemistry". Wiley, Segunda edición, Canadá, 2006.
- [34] Hutchins, R. S., & Bachas, L.G.(1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice- Hall, cap. 38. pp. 727-748, EUA.
- [35] Skoog, D.A.(2005). Fundamentos de Química Analítica. Cengage learning, Octava edición, México.
- [36] Briseño, C.R. (2018). Síntesis de compuestos tipo salfen y su evaluación como iónoforos en electrodos selectivos de iones de estado sólido. CDMX. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 14 - 17.
- [37] Hörner, T. G., & Klüfers, P. (2016). The Species of Fehling's Solution. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016(12), 1798-1807.
- [38] Scherz, H.(1979). Ein Beitrag zur Kenntnis der Fehling'schen Reaktion. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 168(2), 91-98.
- [39] Vorwohl, G. (1964). Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Les Annales de l'Abeille*, 7(4), 301-309.
- [40] Piazza, M. G., Accorti, M., & Persano Oddo, L. (1991). Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura*, 7(5), 1-63.
- [41] Winkler, O.(1955). Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 102(3), 161-167.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Estimación de la incertidumbre

La incertidumbre tipo A ( $U_A$ ) está basada en un análisis estadístico de una serie de mediciones para el experimento, mientras que la incertidumbre tipo B está asociada con los instrumentos con los que se realizaron las mediciones.

Para estimar la incertidumbre tipo A (incertidumbre de repeticiones) se emplea la siguiente ecuación:

$$U_A = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde S es la desviación estándar de las muestras analizadas y n el número de muestras.

La incertidumbre tipo B se estima a partir de un modelo matemático. Si el modelo matemático consiste sólo en sumas y restas, la expresión para estimar la incertidumbre es la siguiente:

$$\text{Si } y = p \pm q$$

$$U_y^2 = U_p^2 + U_q^2$$

$$U_y = \sqrt{U_p^2 + U_q^2}$$

Cuando el modelo matemático consiste solo en multiplicaciones y divisiones, se utilizan incertidumbres relativas tal y como se muestra a continuación:

$$\text{Si } y = \frac{pq}{rt}$$

$$\left(\frac{U_y}{y}\right)^2 = \left(\frac{U_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{U_q}{q}\right)^2 + \left(\frac{U_r}{r}\right)^2 + \left(\frac{U_t}{t}\right)^2$$

$$U_y = y \cdot \sqrt{\left(\frac{U_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{U_q}{q}\right)^2 + \left(\frac{U_r}{r}\right)^2 + \left(\frac{U_t}{t}\right)^2}$$

La incertidumbre combinada total o simplemente incertidumbre combinada se estima combinando la incertidumbre tipo A con el tipo B, tal y como se muestra a continuación:

$$U_c = \sqrt{U_A^2 + U_B^2}$$

Finalmente, la incertidumbre expandida ( $U_{exp.}$ ) se estima multiplicando una constante por la incertidumbre combinada encontrada. La constante igual a 2 se utiliza para una confiabilidad del 95%.

$$U_{exp.} = K \cdot U_c$$

### 8.1.1 Incertidumbre en métodos instrumentales

Para estimar la incertidumbre asociada al método de curva de calibración y adiciones estándar, debe encontrarse la incertidumbre asociada a la recta de regresión lineal. Para ambos métodos, el estadístico  $S_{y/x}$ , estima los errores aleatorios sobre la variable dependiente y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Por lo tanto, en esta ecuación se utilizan los residuos de  $y$ ,  $(y_i - \hat{y}_i)$ , donde los valores de  $\hat{y}_i$  son los valores ajustados a partir de la ecuación de regresión lineal.

Asimismo,  $n-2$  corresponde a los grados de libertad;  $n$  es el número de datos utilizados en la determinación.

Asimismo, mediante el valor de la desviación típica es posible estimar la desviación estándar de la pendiente y la ordenada de la ecuación de regresión lineal mediante las siguientes ecuaciones:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_a = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Finalmente, la ecuación para el error aleatorio de la concentración determinada por el método de curva de calibración es la siguiente:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_i)^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde  $y_0$  corresponde al valor experimental a partir del cual se determina el valor de la concentración  $X_0$ ,  $S_{x_0}$  es la desviación estándar estimada de  $X_0$ ,  $m$  es el número de lecturas,  $n$  es el número de datos y  $b$  es la pendiente de la recta, los parámetros restantes han sido mencionados anteriormente.

Sin embargo, si el método empleado en la cuantificación es el de adiciones estándar, deberá evaluarse la desviación estándar asociada al valor extrapolado con la siguiente ecuación:

$$S_{XE} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Si se aumenta el valor de  $n$ , se mejora la precisión de la cantidad estimada: en general, en un experimento de adiciones estándar deberían usarse al menos 6 puntos.

### 8.1.2 Estimación de la incertidumbre en un estándar

Se preparó un patrón primario de Cu (II) mediante la digestión de 0.1593 g de Cu° ( $M_{Cu} = 63.546 \text{ g mol}^{-1}$ ) de alta pureza (99.99 %) en  $\text{HNO}_3$  (Merck, 65 %). Se llevó a un volumen de 25.0 mL.

Modelo matemático:

$$C_{Cu} = \frac{1000 \cdot m_{Cu} \cdot P_{Cu}}{M_{Cu} \cdot V}$$

Donde:

$C_{Cu}$ : Concentración del patrón ( $\text{molL}^{-1}$ )

1000: Factor de conversión (mL) a (L)

$m_{Cu}$ : Masa del material de alta pureza (g)

$P_{Cu}$ : Pureza del metal dada como fracción en masa

$V$ : Volumen final del estándar (mL)

Con base en el modelo matemático las fuentes de incertidumbre principales son: la masa de cobre, la pureza del cobre, masa molar del cobre y el volumen de aforo de la disolución.

Para la masa pesada de cobre se toma como incertidumbre la resolución de la balanza analítica (0.0001 g); para la pureza del cobre se toma el valor del informe de calibración ( $\pm 0.0001$ ) dividido entre  $\sqrt{3}$  para obtener la incertidumbre estándar; para la masa molar del cobre se toma la incertidumbre reportada en la IUPAC para el cobre ( $\pm 0.003$ ) dividida entre  $\sqrt{3}$  para obtener la incertidumbre estándar; y para el volumen de aforo se tiene como tolerancia 0.04 mL para un matraz volumétrico de 25 mL clase A. Con los datos proporcionados inicialmente se tiene que la concentración de cobre y su incertidumbre al 95% de confianza es la siguiente:

$$C_{Cu} = \frac{1000 \cdot m_{Cu} \cdot P_{Cu}}{M_{Cu} \cdot V} = \frac{(1000 \text{ mL/L})(0.1593 \text{ g})(0.9999)}{(63.546 \text{ g/mol})(25 \text{ mL})} = 0.1003 \text{ molL}^{-1}$$

$$U_c(C_{Cu}) = C_{Cu} \cdot \sqrt{\left(\frac{U_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{U_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{U_M}{M}\right)^2 + \left(\frac{U_V}{V}\right)^2}$$

$$U_c(C_{Cu}) = (0.1003) \cdot \sqrt{\left(\frac{0.0001 \text{ g}}{0.1593 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0.000058}{0.9999}\right)^2 + \left(\frac{0.0017 \text{ g/mol}}{63.546 \text{ g/mol}}\right)^2 + \left(\frac{0.04 \text{ mL}}{25 \text{ mL}}\right)^2}$$

$$U_c(C_{Cu}) = 1.7 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$$

$$U_{exp} = 2 \cdot U_c = 3.4 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$$

$$C_{Cu} = (0.1003 \pm 0.0003) \text{ molL}^{-1}_{95\%}$$

### 8.1.3 Estimación de la incertidumbre relación molar Cu(II)/Fructosa

Tomando como ejemplo de estimación de la incertidumbre sobre un conjunto de datos, se seleccionaron los resultados de la relación molar Cu(II)/Fructosa correspondientes a 5 mL de licor de Fehling (Disolución A y B).

A continuación se muestra una parte de la tabla 9 (Resultados y Análisis) que es empleada para ejemplificar la estimación de la incertidumbre sobre los resultados obtenidos.

Tabla 20. Datos de la relación molar Cu(II)/Fructosa, tomados de la tabla 9 (Resultados y Análisis) para ejemplificar la estimación de su incertidumbre.

Disolución B		Relación molar Cu(II)/Fructosa
No.	NaOH (molL <sup>-1</sup> )	10 mL Fehling
1	0.00	RNE
2	0.38	RNE
3	0.75	RNE y PP
4	1.13	4.99
5	1.47	4.99
6	1.89	5.01
7	2.21	5.01
8	2.58	5.04

Tomando los valores desde el experimento 4 hasta el 8, se calcula el valor promedio de la relación molar (R.M. = 5.01) y la desviación estándar de la muestra ( $S_{n-1} = 0.02$ ). Entonces se evalúa la incertidumbre debida a la repetibilidad o incertidumbre tipo A.

$$U_A = \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

$$U_A = \frac{0.02}{\sqrt{5}} = 9 \times 10^{-3}$$

Para estimar la incertidumbre B, se parte del modelo matemático empleado para determinar la relación molar de Cu(II)/Fructosa.

$$R.M. = \frac{C_{Cu} \cdot V_{Cu}}{C_{AZ} \cdot V_{p.eq.}}$$

Donde:

$R.M.$  : Relación molar

$C_{Cu}$  : Concentración de cobre

$V_{Cu}$  : Volumen de alícuota de cobre

$C_{AZ}$  : Concentración de azúcar reductor

$V_{p.eq.}$  : Volumen al punto de equivalencia

De acuerdo con el modelo matemático, se estima la incertidumbre tipo B en base a la siguiente ecuación:

$$U_{R.M.} = (R.M.) \cdot \sqrt{\left(\frac{U_{Cu}}{C_{Cu}}\right)^2 + \left(\frac{U_{VCu}}{V_{Cu}}\right)^2 + \left(\frac{U_{CAZ}}{C_{AZ}}\right)^2 + \left(\frac{U_{Vp.eq.}}{V_{p.eq.}}\right)^2}$$

Para la concentración de Sulfato de cobre se tiene lo siguiente:  $\text{CuSO}_4 = (0.2783 \pm 5.99 \times 10^{-3}) \text{ molL}^{-1}_{95\%}$ .

En tanto, para la concentración de fructosa empleada en esta serie se tiene: Fructosa =  $(2.95 \times 10^{-2} \pm 3.5 \times 10^{-4}) \text{ molL}^{-1}_{95\%}$ .

Asimismo, se empleó una pipeta clase A de 10 mL con una tolerancia igual a 0.04 mL. La incertidumbre del volumen del punto de equivalencia se estima con la tolerancia de la bureta de 25 mL ( $\pm 0.03 \text{ mL}$ ) con la que se realizó el experimento tomando en cuenta que la medición del volumen se realiza mediante una diferencia; por lo tanto, la incertidumbre en el volumen es:

$$U_{V.p.eq.} = \sqrt{(0.03 \text{ mL})^2 + (0.03 \text{ mL})^2} = 0.042 \text{ mL}$$

Por lo tanto la incertidumbre en la relación molar Cu(II)/Fructosa es:

$$U_{R.M.} = (5.01) \cdot \sqrt{\left(\frac{0.00299 \text{ M}}{0.2783 \text{ M}}\right)^2 + \left(\frac{0.04 \text{ mL}}{10 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{1.75 \times 10^{-4} \text{ M}}{2.95 \times 10^{-2} \text{ M}}\right)^2 + \left(\frac{0.042 \text{ mL}}{18.82 \text{ mL}}\right)^2}$$

$$U_{R.M.} = 0.07$$

Finalmente, se calcula la incertidumbre total de la siguiente manera:

$$U_c = \sqrt{U_A + U_B} = 0.07$$

Considerando la multiplicación de la incertidumbre total por un factor de cobertura igual a 2, el cual corresponde a una probabilidad del 95% para la incertidumbre tenemos:

$$U_{exp.} = 2 \cdot U_c = 0.14$$

Por lo tanto el valor para la relación molar con su respectiva incertidumbre es el siguiente:

$$R.M. = (5.01 \pm 0.14)_{95\%}$$

### 8.2.3 Muestras de miel analizadas y sus incertidumbres

Tabla 21. Disoluciones de miel empleadas en el análisis con sus respectivas incertidumbres.

Muestra	masa (g)	Vol. final (mL)	Concentración (g mL <sup>-1</sup> )	U <sub>95%</sub> (g mL <sup>-1</sup> )
M1 (Japón)	5.0881	10	0.50881	± 0.00407
M2 (Azerbaiyán)	5.0064	10	0.50064	± 0.00401
M3 (Alemania)	5.0045	10	0.50045	± 0.00400
M4 (Japón)	5.0549	10	0.50549	± 0.00404
M5 (Cuba)	5.0465	10	0.50465	± 0.00404
M6 (Alemania)	5.0720	10	0.50720	± 0.00406
M7 (México)	5.0111	10	0.50111	± 0.00401
M8 (México)	5.0966	10	0.50966	± 0.00408
M9 (El Salvador)	5.0279	10	0.50279	± 0.00402
M10 (E.U.A.)	5.0692	10	0.50692	± 0.00406
M11 (México)	5.0469	10	0.50469	± 0.00404
M12 (Canadá)	5.0074	10	0.50074	± 0.00401
M13 (Francia)	5.0030	10	0.5003	± 0.00400
M14 (Canadá)	5.0041	10	0.50041	± 0.00400
M15 (Alemania)	5.0007	10	0.50007	± 0.00400
M16 (Guatemala)	5.0082	10	0.50082	± 0.00401
M17 (Francia)	5.0058	10	0.50058	± 0.00400
M18 (Tailandia)	5.0044	10	0.50044	± 0.00400
M19 (Tailandia)	5.0012	10	0.50012	± 0.00400
M20 (Tailandia)	5.0042	10	0.50042	± 0.00400
M21 (Tailandia)	5.0015	10	0.50015	± 0.00400
M22 (Tailandia)	5.0043	10	0.50043	± 0.00400

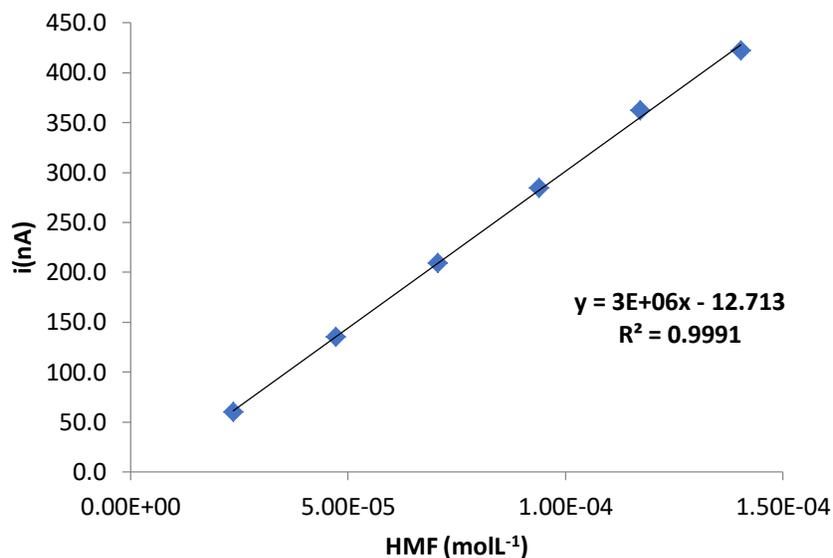
### 8.2 Linealidad, límite de detección(LD) y cuantificación(LDC) del método

Como ejemplo para los cálculos de linealidad y límite de detección se muestran los resultados obtenidos para la curva de calibración de la señal de reducción del HMF a un potencial de pico ( $E_p$ ) de  $-1.27$  V, misma que se obtuvo al graficar la corriente de pico de dicha señal (obtenida por polarografía diferencial de impulsos) contra la respectiva concentración de hidroximetilfurfural en la celda, al realizar adiciones comprendidas entre  $2.36 \times 10^{-5}$  molL<sup>-1</sup> y  $1.40 \times 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup> en una solución buffer de boratos  $0.5$  molL<sup>-1</sup> a pH = 10.

Tabla 22. Valores de intensidad de corriente de pico ( $i_p$ ) de la señal de reducción de HMF en -1.27 V.

Volumen de HMF ( $\mu\text{l}$ )	[HMF] <sub>celda</sub>	$i_{\text{pico}}$ (nA)
0	0.0	0.0
20	$2.36 \times 10^{-5}$	59.9
40	$4.72 \times 10^{-5}$	134.9
60	$7.06 \times 10^{-5}$	208.9
80	$9.40 \times 10^{-5}$	283.9
100	$1.17 \times 10^{-4}$	361.9
120	$1.40 \times 10^{-4}$	421.8

Figura 24. Curva de calibración por PDI para la señal en -1.27 V de HMF en boratos.



A partir de la curva de calibración obtenemos la ecuación de la recta que corresponde a la regresión lineal de los puntos graficados. La linealidad del método está dada por el coeficiente de correlación, de tal forma que se tiene:

$$y = 3 \times 10^6 x - 12.713$$

$$R^2 = 0.9991$$

$$n = 6$$

Donde “y” es la intensidad de corriente experimental ( $i_{exp}$ ), “X” es la concentración de HMF en la celda,  $R^2$  es el coeficiente de correlación de la recta, y “n” es el número de datos experimentales.

De tal forma, la curva presenta un coeficiente de correlación muy cercano a la unidad, lo cual indica que la corriente es directamente proporcional a la concentración, es decir que esta señal de reducción se encuentra regulada por la difusión convectiva, lo que permite su aplicación con fines cuantitativos.

Para calcular el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$S_{i/c} = \left\{ \frac{[\sum(i_{exp} - i_{cal})^2]}{(n - 2)} \right\}^{1/2}$$

$$i_{cal} = (C_{exp} * m) + b$$

$$LDD = \frac{3S_{i/c}}{m}$$

$$LDC = \frac{10S_{i/c}}{m}$$

Donde,  $S_{i/c}$  es la desviación estándar de la recta,  $i_{exp}$  es la intensidad de corriente experimental,  $C_{exp}$  es la concentración del HMF en la celda, “m” es la pendiente de la ecuación de linealidad y “b” es la ordenada de la ecuación de linealidad.

Los resultados que se obtienen al aplicar las ecuaciones anteriores se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 23. Valores para el cálculo del límite de detección y cuantificación para HMF.

$C_{exp}$ (molL <sup>-1</sup> )	$i_{exp}$ (nA)	$i_{cal}$ (nA)	$(i_{exp}-i_{calc})^2$	$S_{i/c}$	LDD	LDC
					molL <sup>-1</sup>	molL <sup>-1</sup>
2.36E-05	59.9	61.47	2.5	4.68	4.47E-06	1.49E-05
4.72E-05	134.9	135.36	0.2		ppm	ppm
7.06E-05	208.9	208.95	0.0		0.56	1.88
9.40E-05	283.9	282.26	2.7			
1.17E-04	361.9	355.27	44.0			
1.40E-04	421.8	427.99	38.3			

Aplicando esta metodología se obtienen para la fructosa los siguientes resultados:

Ecuación de la recta:  $y = 440688x - 11.778$

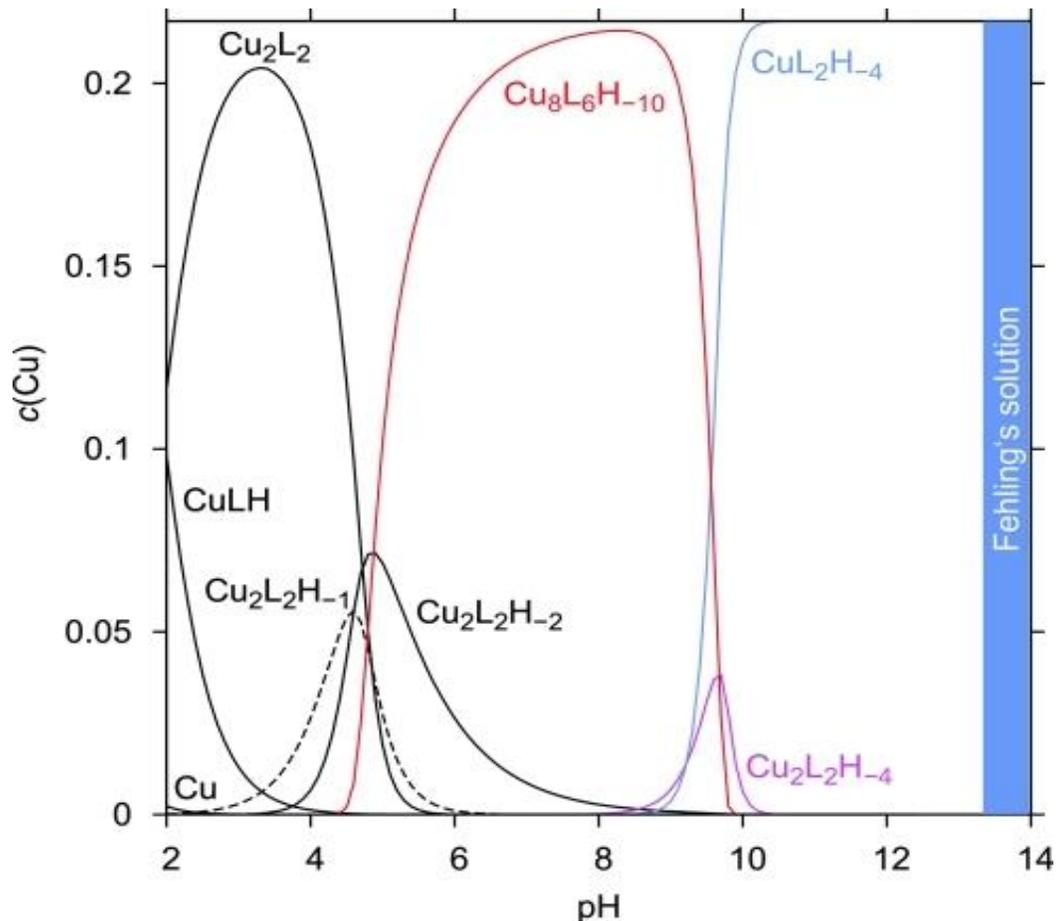
Linealidad del método:  $R^2 = 0.9995$

LDD:  $3.56 \times 10^{-5}$  ó 6.41 ppm

LDC:  $1.19 \times 10^{-4}$  ó 21.38 ppm

### 8.3 Diagrama de distribución de especies de la solución de Fehling

Figura 24. Diagrama de distribución de especies  $c(\text{Cu})$  vs pH ( $c(\text{Cu}), \text{tot} = 0.217 \text{ molL}^{-1}$ ).



Fuente: The Species of Fehling's Solution. European Journal of Inorganic Chemistry, Volume: 2016, Issue: 12, Pages: 1798-1807.