

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**“PREPARACIÓN ELECTROQUÍMICA DE DEPÓSITOS DE ÓXIDO DE
COBRE(II) SOBRE ELECTRODOS DE CARBONO VÍTREO Y SU
APLICACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN
MIEL”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
DENIS ALDAIR HERNÁNDEZ COREAS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**“PREPARACIÓN ELECTROQUÍMICA DE DEPÓSITOS DE ÓXIDO DE
COBRE(II) SOBRE ELECTRODOS DE CARBONO VÍTREO Y SU
APLICACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN
MIEL”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
DENIS ALDAIR HERNÁNDEZ COREAS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ASESORES:
M. Sc. JORGE ALBERTO VELÁSQUEZ REALES
Dr. ULRICH BRIONES GUERASH SILVA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA



**“PREPARACIÓN ELECTROQUÍMICA DE DEPÓSITOS DE ÓXIDO DE
COBRE(II) SOBRE ELECTRODOS DE CARBONO VÍTREO Y SU
APLICACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN
MIEL”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
DENIS ALDAIR HERNÁNDEZ COREAS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**TRIBUNAL EVALUADOR:
Dr. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO
Dra. VELIA RUTH SOSA GÓMEZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

M.SC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIA GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

FISCAL GENERAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

LIC. ERNESTO AMERICO HIDALGO CASTELLANOS

SECRETARIO

LIC. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUIMICA

LIC. NELSON MAURICIO COTO MENDOZA

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a Dios por su constante guía, fortaleza y bendiciones durante todo el proceso de realización de mi trabajo de grado. Su amor incondicional y su sabiduría han sido pilares fundamentales en mi camino académico y personal.

A mi querida madre, Carolina Hernández, le debo un agradecimiento especial. Gracias por tu amor incondicional, tu apoyo constante y por ser mi fuente de inspiración. Tus palabras de aliento y tu presencia han sido fundamentales en cada etapa de este proyecto. Sin tu amor y sacrificio, no estaría aquí celebrando este logro.

A mi amada abuela, Teresa Hernández, quiero expresar mi gratitud por su sabiduría, paciencia y amor incondicional. Tus consejos y tus historias de vida han sido una fuente de inspiración constante. Tu presencia ha sido un faro en momentos de duda y tu cariño ha sido el impulso para alcanzar mis metas.

Agradezco a mi hermano, Ronald Hernández, por su apoyo y su aliento constante. Tus palabras de ánimo y tu confianza en mí me han motivado a superar obstáculos y a creer en mis capacidades. Tu presencia como hermano ha sido un regalo invaluable en este viaje.

A mi amada novia, Tatiana Contreras, quiero agradecerte por tu amor, paciencia y comprensión. Tu apoyo emocional y tu inquebrantable confianza en mí han sido un motor de motivación en los momentos más desafiantes. Tu presencia a mi lado ha sido un pilar fundamental y un motivo adicional para alcanzar mis metas académicas.

A mis queridos amigos, Bladimir Bonilla, Andrea Carranza, Guadalupe Pineda, Mirella Bautista, Valeria López, Katherine Quinteros, Gabriela Flores y Antonio Martínez, les agradezco por su amistad sincera y su apoyo constante. Sus palabras de aliento, sus discusiones enriquecedoras y su compañía durante este proceso han sido invaluableles. Gracias por creer en mí y por estar ahí en cada paso del camino.

Quiero reconocer y agradecer a mis asesores, Jorge Velásquez y Ulrich Silva, por su dedicación, orientación y experiencia durante el desarrollo de mi trabajo de grado. Sus valiosos aportes, comentarios y sugerencias han enriquecido enormemente este proyecto y han contribuido a su calidad y rigor académico.

Agradezco a la Dra. Velia Sosa y al Dr. Néstor Orellana por su paciencia y dedicación al revisar y comentar mis borradores de tesis. Sus observaciones perspicaces y sus sugerencias para mejorar la estructura y el contenido han sido invaluable para perfeccionar este trabajo.

Me gustaría destacar el papel clave que la Licda. Jennifer Zamora ha desempeñado en el avance y conclusión de mi tesis y horas sociales. Su habilidad para resolver problemas y su compromiso con el servicio me han permitido sortear obstáculos y cumplir con los requisitos en tiempo récord.

Por último, agradezco a toda mi familia, amigos y demás profesores por su amor, comprensión y apoyo incondicional. Su presencia en mi vida ha sido fundamental para alcanzar este logro académico. A mis queridos familiares, tanto cercanos como lejanos, les doy las gracias por su constante respaldo y por ser mi red de contención en cada etapa de mi vida.

A todas las personas mencionadas anteriormente y a aquellas que, de alguna manera, han sido parte de mi trayecto académico, les expreso mi más sincero agradecimiento. Sin su apoyo y amor, este logro no habría sido posible.

¡Gracias!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	6
2.1 GENERALIDADES DE LA MIEL	6
2.1.1 MIEL DE ABEJA	6
2.1.2 COMPOSICIÓN	6
2.1.3 HUMEDAD	6
2.1.4 CARBOHIDRATOS	6
2.1.5 PROTEÍNAS	7
2.1.6 ENZIMAS	7
2.1.7 AMINOÁCIDOS	7
2.1.8 ÁCIDOS	8
2.2 AZÚCARES REDUCTORES	8
2.2.1 FRUCTOSA	9
2.2.2 GLUCOSA	9
2.3 CONTROL DE CALIDAD	9
2.4 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS	10
2.4.1 GENERALIDADES	10
2.4.1.1 REACCIONES DE ÓXIDO – REDUCCIÓN	11
2.4.2 POTENCIOSTATO.	12
2.4.3 CELDA ELECTROQUÍMICAS.	13
2.4.4 ELECTRODO DE TRABAJO.	14
2.4.5 ELECTRODO DE CARBONO	14
2.4.5.1 ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO	15
2.4.6 ELECTRODOS MODIFICADOS.	15
2.4.7 ELECTRODOS ELECTROCATALÍTICOS MODIFICADOS.	16
2.4.8 ELECTRODEPÓSITOS	16
2.4.9 CONCEPTO GENERAL DEL ELECTRODEPÓSITO	16
2.4.10 CRONOAMPEROMETRIA.	17
2.4.11 VOLTAMPEROMETRÍA.	19

2.4.11.1	VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL.	19
2.4.11.2	VOLTAMPEROMETRIA CÍCLICA.	19
2.5	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	20
2.5.1	CURVA DE CALIBRACIÓN	20
2.5.2	PARAMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	21
2.6	GENERALIDADES DEL COBRE	23
3.	PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1	MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO.	24
3.1.1	MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO.	24
3.1.2	REACTIVOS	24
3.2	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	25
3.2.1	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR TITULACIÓN.	25
3.2.1.1	ESTANDARIZACIÓN DEL EDTA Y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.	25
3.2.1.2	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES EN LA MUESTRA DE MIEL.	25
3.2.2	OBTENCIÓN DEL ELECTRODEPOSITO DE ÓXIDO DE COBRE(II) SOBRE EL ELECTRODO DE CARBONO VÍTRIO (GC-CuO).	26
3.2.2.1	LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO	26
3.2.2.2	PREPARACIÓN DE REACTIVOS.	26
3.2.2.3	ELECTRODEPÓSITO DE ÓXIDO DE COBRE(II) EN UN ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO (GC-CuO).	27
3.2.3	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL	27
3.2.3.1	OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.	27
3.2.4	DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS DE VALIDACIÓN.	28
3.2.4.1	DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LA TÉCNICA	28
3.2.4.2	DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE LA TÉCNICA	30
3.2.4.3	DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LA TÉCNICA	30
3.2.4.4	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DEL LÍMITE DE DETECCIÓN	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1	OBTENCIÓN DEL ELECTRODEPOSITO DE ÓXIDO DE COBRE(II) SOBRE ELECTRODO DE CARBONO VÍTRIO.	31

4.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL	35
4.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN MIEL POR TITULACIÓN.	38
4.4 DETERMINACIÓN DE PARAMETROS DE VALIDACIÓN	41
4.4.1 LINEALIDAD	41
4.4.2 EXACTITUD	45
4.3.3 PRECISIÓN	48
4.3.4 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN	51
5. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	53
6. CONCLUSIONES	55
7. RECOMENDACIONES	56
8. BIBLIOGRAFÍA	57
9. ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción redox entre el Cu^{2+} y el azúcar reductor.	8
Figura 2. Esquemización del potenciostato.	12
Figura 3. Potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT101, utilizado en este trabajo.	13
Figura 4. Celda electroquímica de tres electrodos.	13
Figura 5. Rango de utilidad del electrodo de carbono, con respecto al potencial.	14
Figura 6. Esquema de una celda electroquímica para el electro-depósito de cobre.	17
Figura 7. Experimento cronoamperométrico: a) forma de onda de tiempo potencial; b) cambio de perfiles de concentración con el tiempo; c) variación de la corriente en función del tiempo.	18
Figura 8. Curva de calibración.	21
Figura 9. E vs. pH diagrama de Cu(II)/Cu(I)/Cu sistema a un total de concentración de Cu de 0.025 M en $0.5 \text{ M NH}_3/\text{NH}_4$.	23
Figura 10. Voltamperograma de barrido lineal a 5 mVs^{-1} en un medio de $\text{Cu(NO}_3)_2$ 0.025 mol.L^{-1} y $\text{NH}_4\text{Cl/NH}_3$ 0.5 mol.L^{-1} a $\text{pH}=8.6$ en el intervalo de potencial de 0.2 a 2.0 V	32
Figura 11. Cronoamperogramas de 300 s para la formación del electrodepósito de CuO en el intervalo de potenciales de 1.05V a 1.25V .	33
Figura 12. Respuesta amperométrica a 0.6 V para glucosa 1 mmol. L^{-1} con los electrodos de CuO-GC preparados a diferentes potenciales en el intervalo de 1.05 a 1.25 V .	33
Figura 13. Respuesta amperométrica a 0.6 V para glucosa 1 mmol. L^{-1} con los electrodos de CuO-GC preparados a diferentes potenciales en el intervalo de 1.15 a 1.20V .	34
Figura 14. Curva de calibración de glucosa. Medio: $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$. Técnica: Amperometría a 0.6 V vs ref. Electrodo de trabajo: GC-CuO fabricado a 1.18 V .	34
Figura 15. Curva de calibración de glucosa. Medio: $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$. Técnica: Amperometría a 0.6 V vs ref. Electrodo de trabajo: GC-CuO fabricado a 1.18 V .	36
Figura 16. Voltamperometría de barrido lineal para disoluciones de glucosa a diferentes concentraciones ($1 - 5 \text{ mmol. L}^{-1}$). $V=100 \text{ mV s}^{-1}$. Medio: $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$. Electrodo de trabajo: CuO-GC fabricado a 1.18 V .	36
Figura 17. Voltamperometría de barrido lineal para disoluciones de glucosa a diferentes concentraciones ($1 - 5 \text{ mmol. L}^{-1}$). $V=100 \text{ mV s}^{-1}$. Medio: $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$. Electrodo de trabajo: sin depósito de CuO	37
Figura 18. Gráfico de regresión lineal para el promedio de mediciones de las 3 curvas realizadas.	42

Figura 19. Tabla de dispersión de residuales de los mínimos cuadrados promedios recabados de las mediciones de 3 curvas.	43
Figura 20. Tabla de dispersión de residuales de mínimos cuadrados de tres mediciones.	44
Figura 21. Gráfico lineal de mínimos cuadrados de las mediciones de exactitud.	45
Figura 22. Gráfico lineal de mínimos cuadrados de las mediciones de precisión.	48
Figura 23. Gráfico lineal de mínimos cuadrados de las mediciones de blancos.	52
Figura 24. Cronoamperograma a $E=1.18$ V para la formación del depósito de Oxido de cobre (II).	60
Figura 25. Voltamperograma de medición de glucosa en potencial de 1.18V y su respectiva medición de blanco y suero al 5% (curva 1).	60
Figura 26. Voltamperograma de medición de glucosa en potencial de 1.18V y su respectiva medición de blanco y suero al 5% (curva 2).	61
Figura 27. Voltamperograma de medición de glucosa en potencial de 1.18V y su respectiva medición de blanco y suero al 5% (curva 3).	61
Figura 28. Deposito de Oxido de Cobre (II) sobre la superficie del electrodo de carbono vitreo.	62
Figura 29. Sistema de celda y 3 electrodos utilizado para las mediciones.	62
Figura 30. Sistema de celda y electrodo montado sobre el sistema de agitacion.	63
Figura 31. Sistema de celda y electrodos en la formacion del deposito.	63
Figura 32. Equipo utilizado para la medición.	64
Figura 33. Precipitado de la solucion de cobre antes de formar el complejo con el amoniaco.	64
Figura 34. Diferencia en el aspecto de la disolución de cobre con respecto al pH.	65
Figura 35. Deposito de Oxido de Cobre (II) sin interaccion con la muestra.	66
Figura 36. Sistema de 3 electrodos con deposito de Oxido de cobre (II).	66
Figura 37. Zinc presipitado en forma de $Zn(OH)_2$.	67
Figura 38. Preparación del NET.	67
Figura 39. Punto inicial de la reacción.	68
Figura 40. Punto de la reaccion en que se torna verde claro la disolución.	68
Figura 41. Punto en la reaccion donde la disolucion se torna verde oscuro.	69
Figura 42. Punto final de la titulacion de cobre con EDTA.	69
Figura 43. Disolucion de Fehling A + B.	70
Figura 44. Adicion del indicador a la muestra.	70
Figura 45. Punto final de la titulacion.	71
Figura 46. Comparativa entre el punto inicial y el punto final de la titulación de la muestra de miel.	71
Figura 47. Muestra de suero utilizada.	72
Figura 48. Componentes del suero.	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados obtenidos en la determinación de porcentaje de azúcar reductor en la muestra de miel para seis mediciones.	38
Tabla 2. Porcentajes de azúcar reductores obtenidos por titulación redox.	40
Tabla 3. Corrientes obtenidas en las mediciones de las diferentes curvas realizadas.	41
Tabla 4. Ecuaciones de regresión lineal para cada curva y su respectivo valor de R.	41
Tabla 5. Corriente promedio de las mediciones para las 3 curvas realizadas.	42
Tabla 6. Valores de residuo obtenido para el promedio de curvas.	43
1. Tabla 7. Nivel de concentración bajo (1 mmol.L^{-1}).	45
2. Tabla 8. Nivel de concentración medio (3 mmol.L^{-1}).	46
3. Tabla 9. Nivel de concentración alto (5 mmol.L^{-1}).	46
Tabla 10. Porcentaje de recuperación aparente obtenido para los diferentes niveles de concentración en la prueba de exactitud.	47
Tabla 11. Criterios de aceptación para porcentajes de recobro.	47
1. Tabla 12. Nivel de concentración bajo (1 mmol.L^{-1}).	48
2. Tabla 13. Nivel de concentración bajo (3 mmol.L^{-1}).	49
3. Tabla 14. Nivel de concentración bajo (5 mmol.L^{-1}).	49
Tabla 15. Coeficiente de variación para cada nivel de concentración en la prueba de precisión.	50
Tabla 16. Coeficiente de variación del analito a distintas concentraciones.	50
Tabla 17. Datos obtenidos de la medición de blancos para la determinación de LD y LC.	51
Tabla 18. Datos comparativos entre mediciones instrumentales y mediciones clásicas.	53
Tabla 19. Datos estadísticos de la prueba F	53
Tabla 20. Datos estadísticos de la prueba t-student comparativos entre el método tradicional y el método clásico.	54

RESUMEN

Existen diversos métodos para la determinación de azúcares reductores; sin embargo, el método tradicional para muestras de miel consiste en la titulación con el reactivo de Fehling (Método de Lane-Eynon). En esta investigación, se ha desarrollado una nueva metodología para la cuantificación de azúcares reductores en miel, dejando de lado el método tradicional por titulación y los problemas que este conlleva. La metodología desarrollada se basa en la oxidación anódica de glucosa en medio básico, utilizando como técnica de medición la amperometría y como electrodo de trabajo una superficie de carbono vítreo modificado con óxido de cobre (II) depositado electroquímicamente. De esta manera, y con la ayuda de una curva de calibración, se determinó el porcentaje de azúcares reductores contenido en una muestra real de miel comercializada en El Salvador. Para la muestra de miel analizada, no se cumplió con el requisito mínimo establecido en la norma salvadoreña (NSO 67.19.01:08) para el contenido de azúcares reductores. Al comparar la metodología convencional por titulación y la electroanalítica, se puede observar que para ambas mediciones existen diferencias significativas en los promedios de los resultados obtenidos, pero al no sobrepasar el 1.8 % de diferencia, podemos considerar que no hay una gran variación entre los resultados de ambas mediciones. No obstante, el método electroanalítico posee ventajas importantes en comparación con el método clásico, por ejemplo, requiere menos tiempo y reactivos, además de simplificar notablemente la metodología para obtener un resultado muy similar.

Adicionalmente, se obtuvieron los parámetros de validación mínimos necesarios establecidos en la guía de validación de los métodos analíticos fisicoquímicos; para cada uno de los parámetros, se cumplió con los criterios establecidos en la guía, es decir, se validó el método analítico.

1. INTRODUCCIÓN

Existen a nivel mundial muchos países productores de miel, así como países consumidores de este producto. El Salvador es un país que ha tenido un incremento en su actividad productora de miel; en el año 2000 se produjeron 1070 toneladas, mientras que para el año 2010 se produjeron 2200 ⁽¹⁾ y en el año 2018 se produjeron 2361 toneladas. En fechas recientes, la producción de miel se ha visto mermada por factores climáticos en el país y también debido a la falta de mayor demanda de los países importadores.⁽²⁾

El control de calidad de la miel es importante para determinar el valor potencial de dicho producto y poder así ofrecer un producto que cumpla con los estándares de calidad nacional e internacional. Uno de los principales problemas del país respecto a su exportación es que no se realiza un control de calidad acreditado de la miel previo a su envío al extranjero ⁽³⁾ (aunque existe una norma establecida en el país), sino que este es llevado a cabo por los países compradores. Como consecuencia se han dado casos en los que el producto no pasa el control de calidad de los países importadores, y el lote completo es rechazado, obligando así al comerciante a vender en el mercado nacional. En este sentido, la ausencia de un control de calidad adecuado de la miel salvadoreña representa no solo un riesgo para las exportaciones y la economía, sino también para la salud de los consumidores nacionales.⁽⁴⁾

En esta investigación se propone una metodología diferente a la que actualmente se utiliza para la determinación de azúcares reductores en miel en el país (Método de titulación con disolución de Fehling), obteniéndose con ello ventajas sustanciales, por ejemplo, evitar el calentamiento de la muestra, así como una reducción significativa en la cantidad de reactivos utilizados. Estas ventajas incluyen un cambio del método tradicional (método clásico volumétrico) por un método instrumental de mayor precisión. En este sentido, se optó por la aplicación de técnicas electroanalíticas debido a que su facilidad de operación y portabilidad las suele hacer mucho más precisas y de menor costo en comparación con otras técnicas instrumentales. Así también por ser una propuesta de metodología nueva en El Salvador, Además, se determinaron los parámetros de validación del método: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. Finalmente se comparó el método de Lane-Eynon modificado con el método de preparación electroquímica de depósitos de óxido de cobre(II) sobre electrodos de carbono vítreo.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE LA MIEL

2.1.1 MIEL DE ABEJA

Según la Norma Salvadoreña para la Miel de Abejas (NSO 67.19.01:08) se define a la miel como “el producto alimenticio creado por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas, que las abejas recogen, transforman, almacenan y dejan madurar en los panales de colmena”.⁽⁵⁾

2.1.2 COMPOSICIÓN

La composición de la miel varía dependiendo de la flora de origen y la zona de pecoreo de las abejas. Esta puede considerarse como una disolución acuosa concentrada en azúcares, conteniendo además una mezcla compleja de diversas enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, ceras y granos de polen.⁽⁶⁾

2.1.3 HUMEDAD

El porcentaje promedio de humedad en mieles ronda entre el 17% y 18%. Es una de las características más importantes pues influye en la viscosidad, peso específico y color, condicionando así la conservación y cualidades organolépticas de la miel. Se ha estudiado la tendencia a la granulación de la miel y su relación con el contenido de azúcares y agua. Dicho factor es importante con relación a la fermentación, pues la granulación aumenta el contenido de agua libre, haciendo a la miel más susceptible al ataque microbiano. De hecho, el excesivo contenido de agua favorece la multiplicación de levaduras osmoflicas.⁽⁶⁾

2.1.4 CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos (o azúcares) son los componentes mayoritarios en la miel, variando su contenido entre el 60 y 80%, siendo los principales la fructosa (38%), glucosa (31%) y sacarosa (5%), contenidos que varían considerablemente entre una miel y otra. Por otro lado, se han identificado más de 20 oligosacáridos como la maltosa. El contenido de sacarosa está relacionado con el grado de maduración de la miel, por lo que su valor debe ser menor al 5%; debido a que altos contenidos en sacarosa pueden ser debido a una falta

de maduración, siendo el contenido máximo permitido por la mayoría de los países. Miel con valores superior al 8% se consideran adulteradas por adición de azúcar de mesa (sacarosa) lo cual es penalizado por la ley. Sin embargo, la presencia de sacarosa en miel no proviene únicamente de la adulteración, sino también puede deberse a las características de cada miel o a la falta de un adecuado tiempo de maduración en la cosecha.⁽⁷⁾

La fracción glúcida está determinada por las plantas de las que se elaboró la miel al igual que de las influencias regionales y estacionales. En la miel recién extraída de los panales, aún existen transformaciones que continúan mientras las enzimas permanecen activas. A mayor tiempo de almacenamiento, la proporción de monosacáridos irá aumentando debido a la actividad enzimática y a la inversión ácida de los disacáridos, por lo que las proporciones de azúcares no serán constantes.⁽⁷⁾

2.1.5 PROTEÍNAS

Existen pequeñas cantidades de proteínas en la miel, que varían entre cada muestra. Estas provienen de materia vegetal y de las abejas. Las mieles de prensado (actualmente poco comunes) son más ricas en sustancias nitrogenadas. El contenido de proteínas en mieles centrifugadas es de casi el 0.04% al 2%.⁽⁷⁾

2.1.6 ENZIMAS

Son agregadas casi totalmente por las abejas. Las principales son la glucosa-oxidasa, la invertasa, y otras enzimas como las amilasas y catalasas; de estas últimas aún se sabe poco en cuanto a su efecto y contenido en las mieles.

La invertasa es producida por las glándulas faríngeas de la abeja melífera, añadiéndose al néctar recolectado por las abejas. Esta enzima permite detectar daños causados en la miel por calentamiento (inactivación o desnaturalización). Su función es transformar la sacarosa en fructosa y glucosa. La glucosa-oxidasa también es agregada por las abejas al néctar, oxidando la glucosa en pequeñas cantidades a gluconolactona.⁽⁷⁾

2.1.7 AMINOÁCIDOS

El contenido de aminoácidos en la miel es relativamente bajo, cerca de 100 mg/100 g de extracto seco. La lisina se encuentra en mayor proporción, seguida por la prolina, arginina, glicina, cistina, entre otros.⁽⁷⁾

2.1.8 ÁCIDOS

El principal es el glucónico, producido por la fermentación aeróbica de la glucosa por enzimas de ciertas bacterias (*Acetobacter*) y mohos (*Aspergillus*). Otros ácidos presentes en pequeñas cantidades son el acético, cítrico, succínico, fórmico, málico, maléico y oxálico. Una miel de *Apis* con acidez elevada pudo haber fermentado en un momento dado y el alcohol producido convertido a ácido acético por acción bacteriana (*Acetobacterias*).⁽⁷⁾

2.2 AZÚCARES REDUCTORES

La Norma Salvadoreña para Miel de Abeja (NSO 67.19.01:08), establece un porcentaje mínimo de azúcares reductores del 60% para miel de flores y del 45% para miel de mielato y su mezcla con miel de flores.⁽⁵⁾

Según la norma (NSO 67.19.01:08), para la determinación de azúcares reductores se utiliza el método de Lane-Eynon, mismo que se basa en la reacción de Fehling. Para tal fin, inicialmente y a modo de calibración, se titula una disolución de azúcar reductor de concentración conocida (glucosa al 1% p/v) con una disolución estándar de Cu^{2+} , lo que posteriormente permite determinar el contenido de azúcares reductores al titular una muestra de concentración desconocida.⁽⁸⁾ Como cualquier aldehído, las aldosas son fácilmente oxidadas. Existen varios reactivos para identificar a los azúcares reductores, como Tollens (Ag^+ en NH_3), Benedict (Cu^{2+} en citrato de sodio acuoso) y Fehling (Cu^{2+} en tartrato de sodio acuoso). Se les llama azúcares reductores ya que reducen al catión metálico del agente oxidante. En el caso del reactivo de Fehling el Cu^{2+} se reduce a $\text{Cu}(\text{I})$ y produce en el medio Cu_2O , un precipitado color rojo.⁽⁹⁾

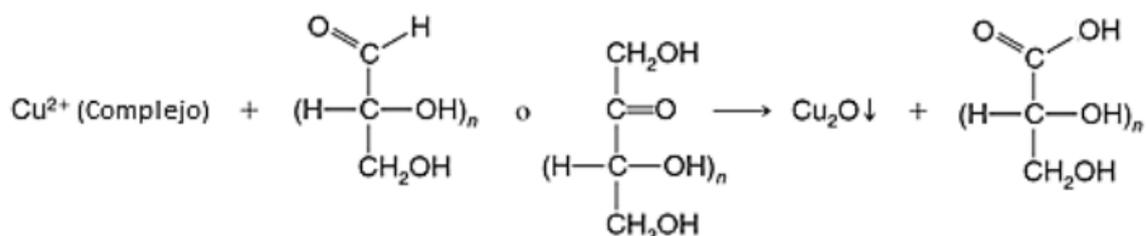


Figura 1. Reacción redox entre el Cu^{2+} y el azúcar reductor.⁽⁹⁾

2.2.1 FRUCTOSA

La fructosa, también conocida como levulosa o azúcar de frutas, es un carbohidrato de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ con una masa molar de $180.19 \text{ g mol}^{-1}$. Este azúcar puede encontrarse como cristales o polvo blanco, se descompone a temperaturas entre $103\text{-}105^\circ\text{C}$ y posee una elevada solubilidad en agua. Se trata de la cetosa más abundante y el azúcar más dulce conocido. En la molécula de sacarosa, una unidad de fructosa se encuentra enlazada a la glucosa.⁽¹⁰⁾

2.2.2 GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído). Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. Su rendimiento energético es de $3,75 \text{ kcal g}^{-1}$ en condiciones estándar. Es un isómero de la galactosa, con diferente posición relativa de los grupos $-\text{OH}$ y $=\text{O}$.

La glucosa posee dos enantiómeros D-glucosa y L-glucosa, siendo la D-glucosa la forma predominante en la naturaleza. En la terminología de la industria alimentaria suele denominarse dextrosa a este compuesto.⁽¹¹⁾

2.3 CONTROL DE CALIDAD

La Norma Salvadoreña para la Miel de Abejas, contempla ciertos parámetros de calidad⁽¹²⁾, los cuales se dividen en cinco grupos:

1. Características Organolépticas: Color, sabor, olor y consistencia.
2. Parámetros fisicoquímicos: Madurez: Azúcares reductores, humedad, sacarosa aparente y relación fructosa/glucosa. Deterioro: Acidez libre, actividad diastásica e hidroximetilfurfural (HMF).
3. Aditivos y adulterantes.
4. Higiene.

5. Parámetros microbiológicos: Recuento de colonias aerobias mesófilas, salmonella, coliformes totales y fecales, hongos y levaduras.⁽¹²⁾

2.4 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

2.4.1 GENERALIDADES

La electroquímica es una rama de la química que estudia la relación entre la transformación química y la electricidad; se enfoca en el estudio de los procesos que ocurren en la interfase de un conductor eléctrico (electrodo) con especies en disolución, las cuales se conocen como reacciones electroquímicas.⁽¹³⁾

El dispositivo experimental que se utiliza en electroquímica está constituido por un sistema electrónico que consiste fundamentalmente en dos electrodos dispuestos en una celda y conectados a un circuito eléctrico externo. Debido al paso de corriente por la disolución se presenta una caída óhmica de potencial, la cual se compensa introduciendo un electrolito soporte; para conocer el potencial del electrodo de trabajo se agrega al circuito un tercer electrodo. Por lo tanto, se tiene un sistema de tres electrodos: electrodo indicador o de trabajo, electrodo auxiliar o contra electrodo y electrodo de referencia.⁽¹³⁾

El electrodo de trabajo es el electrodo en el que tiene lugar la reacción de interés; el electrodo auxiliar es el electrodo que junto con el de trabajo constituye el puente por donde pasa la corriente; el electrodo de referencia se usa para medir el potencial del electrodo de trabajo. La diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia se regula mediante un aparato electrónico llamado potencióstato.⁽¹³⁾

Al utilizar este dispositivo se impone de manera controlada un potencial al electrodo de trabajo, lo que permite inducir reacciones de oxidación o reducción sobre las especies presentes en disolución; este proceso se conoce como electrólisis y da origen al paso de corriente en la interface electrodo-disolución; ya sea bajo un régimen estacionario o bien con agitación constante y en presencia de un electrolito inerte en gran concentración, la corriente implicada en la reacción al electrodo es proporcional al número de electrones intercambiados y a la concentración de la especie electro activa.⁽¹³⁾

El transporte masivo de materia de la especie electroactiva desde el seno de la disolución hacia la superficie del electrodo ocurre de tres formas diferentes:

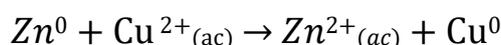
Difusión: el movimiento espontáneo bajo la influencia del gradiente de la concentración (es decir, de regiones de alta concentración a regiones de menor concentración), destinadas a minimizar las diferencias de concentración.⁽¹⁴⁾

Convección: transporte al electrodo por un movimiento físico grueso; el flujo de fluido ocurre con la agitación o el flujo de la solución y con la rotación o vibración del electrodo (es decir, convección forzada) o debido a gradientes de densidad (es decir, convección natural).⁽¹⁴⁾

Migración: movimiento de partículas cargadas a lo largo de un campo eléctrico (es decir, la carga es transportada a través de la solución por iones de acuerdo con su número de transferencia).⁽¹⁴⁾

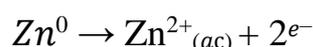
2.4.1.1 REACCIONES DE ÓXIDO – REDUCCIÓN

Una reacción de óxido-reducción se puede dividir en dos semirreacciones: una en la cual la especie reactiva se oxida, y otra en la cual la especie reactiva se reduce. Se presenta el siguiente caso:

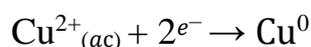


Ecuación 1. Reacción de oxidación del cinc y reducción del cobre

En donde el Zn^0 se oxida y el Cu^{2+} se reduce, de acuerdo con las siguientes semirreacciones:



Ecuación 2. Semireacción de oxidación del cinc



Ecuación 3. Semireacción de reducción del cobre

El desplazamiento neto del equilibrio dependerá de la posición relativa de los valores de potencial condicional (E°) de los pares redox involucrados y de la imposición, o no, de un estímulo externo.⁽¹⁵⁾

2.4.2 POTENCIOSTATO

Es un instrumento electrónico que permite imponer a un material conductor colocado en una solución electrolítica, un potencial constante o variable, positivo o negativo, con respecto a un electrodo de referencia. El potenciostato implementa este control mediante la inyección de corriente dentro de la celda a través de un tercer electrodo (EA).⁽¹³⁾

El potenciostato tiene dos tareas: medir la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia sin polarización de este último, y comparar la diferencia de potencial a un voltaje preestablecido y forzar una corriente a través del contra electrodo hacia el electrodo de trabajo a fin de contrarrestar la diferencia entre el voltaje preestablecido y el potencial existente del electrodo de trabajo. En casi todas las aplicaciones, el potenciostato mide el flujo de corriente entre el electrodo de trabajo y el auxiliar. La variable controlada en un potenciostato es el potencial de celda y la variable medida es la corriente de celda.⁽¹³⁾

En los experimentos electroquímicos, los electrodos son el componente del equipo que está en contacto directo con el analito. Por esta razón, los electrodos son muy importantes para la determinación del resultado experimental. La superficie del electrodo puede o no catalizar las reacciones electroquímicas. El tamaño de los electrodos influye también en la magnitud de las corrientes que fluyen por el sistema y que pueden afectar la relación señal-ruido; sin embargo, los electrodos no son el único factor determinante para los experimentos electroquímicos, el potenciostato también tiene un rango de operación limitado. A continuación, se muestran los componentes electrónicos más importantes de un potenciostato.⁽¹³⁾

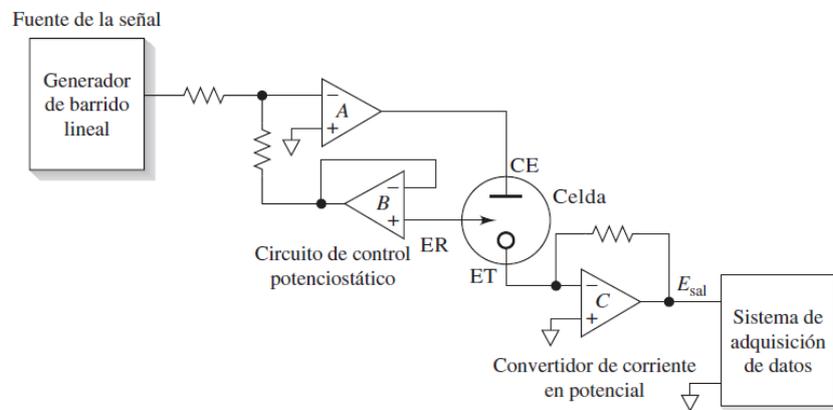


Figura 2. Esquematización del potenciostato.⁽¹³⁾



Figura 3. Potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT101, utilizado en este trabajo.

2.4.3 CELDA ELECTROQUÍMICAS.

La celda suele ser un recipiente cubierto de 5 a 50 mL de capacidad que contiene tres electrodos (de trabajo, de referencia y auxiliar), sumergidos en la disolución con la muestra. Mientras que el electrodo de trabajo es el electrodo en el que ocurre la reacción electroquímica de interés, el electrodo de referencia proporciona un potencial estable y reproducible (independiente de la composición de la muestra), contra el cual se compara el potencial del electrodo de trabajo. Este "amortiguamiento" contra los cambios de potencial se logra mediante una composición constante de ambas formas de su par redox, por ejemplo, Ag / AgCl o Hg / Hg₂Cl₂ como ocurre con los electrodos de referencia de plata-cloruro de plata y de calomelanos saturados, respectivamente. Para minimizar la contaminación de la disolución de muestra, el electrodo de referencia puede aislarse de la muestra.⁽¹⁶⁾

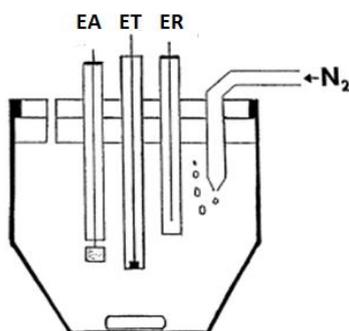


Figura 4. Celda electroquímica de tres electrodos.⁽¹⁶⁾

2.4.4 ELECTRODO DE TRABAJO.

El electrodo de trabajo es el electrodo en un sistema electroquímico en el que está ocurriendo la reacción de interés. El electrodo de trabajo se utiliza a menudo en combinación con un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia en un sistema de tres electrodos. Dependiendo de si la reacción en el electrodo es una reducción o una oxidación, al electrodo de trabajo se le puede considerar como catódico si en él ocurre una reacción de reducción o anódico si en él ocurre una reacción de oxidación. La mayoría de los electrodos de trabajo consisten en materiales conductores relativamente inertes, como algunos metales nobles (oro, plata o platino) además de los electrodos de gota de mercurio, carbono vítreo, grafito, entre otros. La selección del material del electrodo de trabajo se realiza por lo general en función del intervalo de potencial en el que se desea trabajar.⁽¹³⁾

2.4.5 ELECTRODO DE CARBONO.

Los electrodos sólidos basados en carbono se utilizan actualmente en el electroanálisis, principalmente debido a su amplia ventana de potencial, baja corriente de fondo, amplia química de superficie, bajo costo, a su carácter químicamente inerte e idoneidad para diversas aplicaciones de detección. Por otra parte, las velocidades de transferencia de electrones observadas en las superficies de carbono suelen ser más lentas que las observadas en los electrodos metálicos. Así también la rapidez de transferencia de electrones se ve fuertemente afectada por el origen e historia de la superficie del carbono.⁽¹³⁾

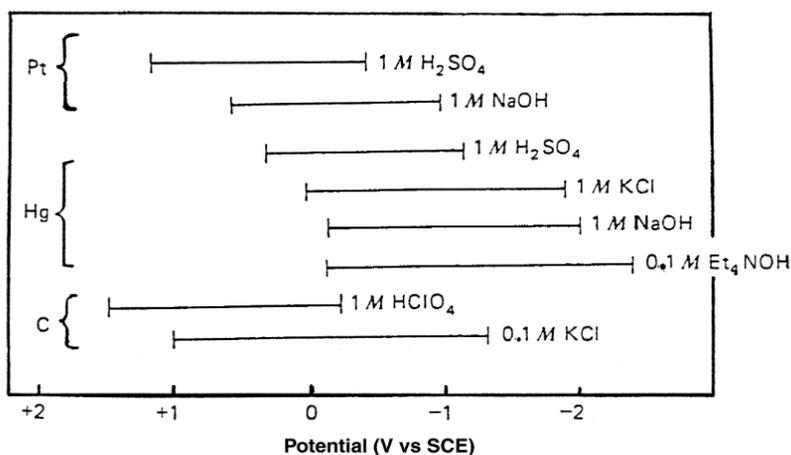


Figura 5. Rango de potencial de trabajo del electrodo de carbono.⁽¹³⁾

Hasta la fecha, se han propuesto una gran variedad de procedimientos de pretratamiento con el fin de mejorar la reproducibilidad de las mediciones realizadas con los electrodos de carbono. El tipo de carbón, así como el método de pretratamiento, tienen por lo tanto un profundo efecto sobre el desempeño analítico.⁽¹³⁾

2.4.5.1 ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO

El carbono vítreo se prepara mediante un programa de calentamiento cuidadosamente controlado de un cuerpo de resina polimérica (fenol-formaldehído) premoldeada en una atmósfera inerte. El proceso de carbonización se lleva a cabo muy lentamente en el rango de temperatura de 300-1200 °C para asegurar la eliminación de oxígeno, nitrógeno e hidrógeno. La estructura del carbono vítreo incluye cintas delgadas y enredadas de láminas reticuladas similares al grafito. Debido a su alta densidad y pequeño tamaño de poro generalmente se emplea un pretratamiento de la superficie para crear electrodos de carbono vítreo activo y reproducible, lo que permite mejorar su desempeño analítico. Dicho pretratamiento se consigue normalmente puliendo con partículas de alúmina sucesivamente más pequeñas (hasta 0,05 μm) sobre un paño de pulido. Luego, el electrodo debe enjuagarse con agua desionizada antes de su uso. También se han utilizado pasos de activación adicionales, como tratamientos electroquímicos, químicos, térmicos o con láser, para mejorar el rendimiento. La reactividad mejorada de transferencia de electrones se ha atribuido a la eliminación de contaminantes de la superficie, la exposición de bordes de carbono y un aumento en la densidad de los grupos de oxígeno de la superficie.⁽¹⁷⁾

2.4.6 ELECTRODOS MODIFICADOS.

Los electrodos químicamente modificados (CME, por sus siglas en inglés) representan un enfoque moderno para los sistemas de electrodos. Éstos se basan en la colocación de un reactivo sobre la superficie del electrodo, para impartir el comportamiento de ese reactivo a la superficie modificada. Tal alteración deliberada de las superficies de los electrodos puede satisfacer las necesidades de muchos problemas electroanalíticos y puede constituir la base para nuevas aplicaciones analíticas y diferentes dispositivos de detección.⁽¹⁷⁾

Hay varias formas en las que los CME pueden beneficiar a las aplicaciones analíticas. Estas incluyen un incremento en la rapidez de las reacciones de transferencia de

electrones (efecto electrocatalítico), la acumulación preferencial o la permeación selectiva de los analitos. Dichas modificaciones pueden impartir mayor selectividad, sensibilidad o estabilidad a los dispositivos electroquímicos. Muchas otras aplicaciones importantes, entre las que se encuentran los dispositivos de visualización electrocrómicos, la liberación controlada de fármacos, la electrosíntesis y la protección contra la corrosión, también pueden beneficiarse del diseño racional de las superficies de los electrodos.⁽¹⁷⁾

2.4.7 ELECTRODOS ELECTROCATALÍTICOS MODIFICADOS.

A menudo, la reacción redox deseada en el electrodo descubierto implica una cinética de transferencia de electrones lenta y, por lo tanto, se produce a una rapidez apreciable sólo a potenciales sustancialmente más altos que su potencial redox termodinámico. Tales reacciones pueden catalizarse uniendo a la superficie un mediador de transferencia de electrones adecuado. El conocimiento de la cinética de la solución homogénea se utiliza a menudo para seleccionar el catalizador unido a la superficie. La función del mediador es facilitar la transferencia de carga entre el analito y el electrodo.⁽¹⁸⁾

2.4.8 ELECTRODEPÓSITOS

Los recubrimientos metálicos han sido producidos por diversas técnicas como: deposición física de vapor, deposición química, deposición térmica y electrodeposición con corriente directa o pulsante. La ventaja de la técnica de electrodeposición respecto a las otras mencionadas, es que puede ser usada para revestir piezas de grandes dimensiones y que posee bajos costos de producción.⁽¹⁸⁾

El objetivo de un proceso de electrodeposición es preparar un recubrimiento metálico que sea adherente y que tenga excelentes propiedades físicas, químicas y metálicas, por ejemplo, los recubrimientos de cobre/Níquel/Cromo que se aplican generalmente sobre el acero.⁽¹⁸⁾

2.4.9 CONCEPTO GENERAL DEL ELECTRODEPÓSITO

El electrodeposición es un proceso por el cual un recubrimiento metálico, de óxido metálico o de polímeros es aplicado sobre una superficie a través de un potencial o una corriente eléctrica constante o variable. Existen entonces métodos de electrodeposición

potenciostático, potenciodinámico y galvanostático. Los principales componentes del proceso de electrodeposición de un metal se describen a continuación:

- Electrolito: solución que contiene los iones de metal que se desea depositar.
- Cátodo: superficie donde se presenta la reacción de reducción, también conocido como electrodo de trabajo.
- Ánodo: superficie donde se produce la reacción de oxidación, el ánodo puede ser activo o inerte. Cuando el ánodo es activo, generalmente, es el mismo metal que se desea depositar, mientras que cuando es inerte, este no sufre ningún cambio durante el proceso.
- Corriente eléctrica: puede ser directa o pulsante.

En este trabajo se utilizará un electrodeposito anódico para poder generar un recubrimiento de óxido de cobre(II) sobre un electrodo de carbono vítreo como electrodo de trabajo.⁽¹⁸⁾ Es decir, que en este caso el electrodo de trabajo será el ánodo y el electrodo auxiliar el cátodo.

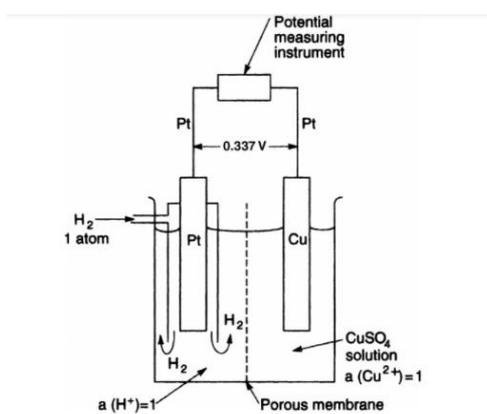


Figura 6. Esquema de una celda electroquímica para el electro-depósito de cobre.⁽¹⁸⁾

2.4.10 CRONOAMPEROMETRIA.

Como su nombre lo indica, la corriente que fluye por el electrodo utilizado en función del tiempo, es la respuesta que se registra en esta técnica, tras llevar a cabo un salto de potencial. Es decir, la cronoamperometría implica escalonar el potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una disolución sin agitar, desde un valor en el que no se produce

una reacción faradaica, hasta un potencial en el que la concentración superficial de las especies electro activas es efectivamente cero.⁽¹⁹⁾

Como el transporte de masa en estas condiciones es únicamente por difusión, la transición de corriente vs. tiempo refleja el cambio en el gradiente de concentración en la proximidad de la superficie del electrodo. Esto implica una expansión gradual de la capa de difusión asociada con el agotamiento del reactivo y, por lo tanto, una disminución de la pendiente del perfil de concentración a medida que avanza el tiempo. En consecuencia, la corriente (en un electrodo plano) decae con el tiempo.⁽¹⁹⁾

En este trabajo, la cronoamperometría se utilizará para generar los pulsos de potencial y al mismo tiempo monitorear el proceso de electrodeposición de óxido de cobre(II).

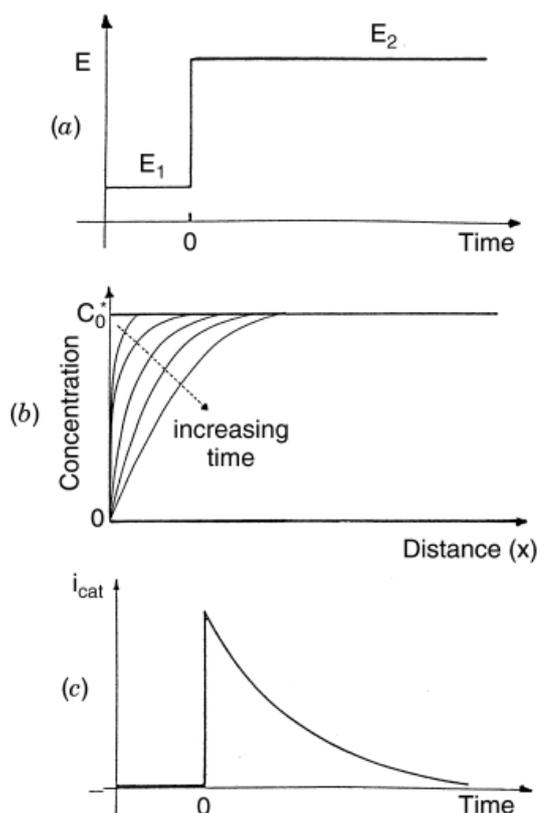


Figura 7. Experimento cronoamperométrico: a) forma de onda de tiempo potencial; b) cambio de perfiles de concentración con el tiempo; c) variación de la corriente en función del tiempo.⁽¹⁴⁾

2.4.11 VOLTAMPEROMETRÍA.

Los métodos voltamperométricos se basan en la medida de la corriente eléctrica que circula a través de una celda electroquímica bajo la aplicación de una determinada diferencia de potencial (potencial E) variable con el tiempo entre el electrodo en el que tienen lugar los cambios electroquímicos objeto de estudio, denominado electrodo de trabajo, y un electrodo de referencia. Los electrodos de trabajo utilizados ordinariamente en análisis voltamperométrico poseen superficies del orden de $1-10 \text{ mm}^2$.⁽¹⁶⁾ El diseño de la celda electroquímica intencionalmente recurre a electrodos auxiliares de una gran superficie y a electrodos de trabajo de una superficie mucho más pequeña. Esto obedece a que se busca que la corriente que fluye por la celda electroquímica esté limitada por la rapidez de los procesos electroquímicos que ocurren en el electrodo de trabajo. En estas condiciones tiene lugar un consumo muy pequeño de especie electroactiva, a diferencia de técnicas como la coulombimetría, en la que se produce un consumo exhaustivo del mismo.⁽¹⁹⁾

2.4.11.1 VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL.

En la voltamperometría de barrido lineal se aplica un potencial linealmente variable con el tiempo. La velocidad de variación del potencial con el tiempo define la velocidad de barrido (v), que es un parámetro de gran importancia en las medidas voltamperométricas.⁽¹⁶⁾

Esta técnica se utilizará en este trabajo, para el análisis de las muestras y elegir el potencial al cual se harán las mediciones, de todo el voltamperograma obtenido se elegirá un único potencial en el cual se llevarán a cabo las mediciones.

2.4.11.2 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica donde, utilizando un electrodo de trabajo en una disolución sin agitación, se aplica un barrido triangular de potencial. Este tipo de barrido consiste en ciclos conformados por dos segmentos de barridos lineales con una rapidez de barrido con signo opuesto. Cada ciclo inicia con un barrido en sentido catódico o anódico que va desde un determinado potencial inicial (E_0) hasta otro valor de potencial ($E_{\lambda,1}$), denominado potencial de inversión 1, donde cambia el signo de la rapidez de barrido y como consecuencia el sentido del barrido se invierte hasta alcanzar un potencial

denominado potencial de inversión 2 ($E_{\lambda,2}$), donde la rapidez de barrido nuevamente cambia de signo. Cada vez que se alcanza el valor de E_0 , se cumple un ciclo de barrido, sin embargo, el experimento puede continuar cuantos ciclos sea necesario. Esta técnica es quizás la más versátil para el estudio de especies electroactivas, de ahí que su uso se haya extendido a diferentes campos. Actualmente esta técnica se utiliza para investigaciones en química inorgánica, orgánica, bioquímica, entre otros. Esta técnica también es conocida como "espectroscopia electroquímica" debido a que los voltamperogramas que se obtienen son característicos y dan información inequívoca de las propiedades electroquímicas individuales de los sistemas redox.⁽¹³⁾

Mediante la voltamperometría cíclica podemos tener información cualitativa de los procesos de transferencia de electrones. También se puede estudiar el comportamiento reversible o irreversible de un par redox, así como determinar el número de electrones transferidos en una oxidación o reducción, y el mecanismo de la reacción, etc.⁽¹³⁾

En este trabajo, la voltamperometría cíclica se aplicó para identificar los potenciales a los cuales se debían aplicar los pulsos de potencial para obtener el electrodepósito, además de proporcionar información del par redox involucrado en la reacción.

2.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

2.5.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. La calibración incluye la selección de un modelo para estimar los parámetros que permitan determinar la linealidad de la curva y, en consecuencia, la capacidad de un método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra, dentro de un determinado intervalo de trabajo. En el procedimiento se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida del mismo analito (o de algún otro con propiedades muy similares a éste). Para realizar la comparación se requiere utilizar métodos y equipos apropiados para la resolución del problema de acuerdo con el analito que se desee determinar.⁽²⁰⁾

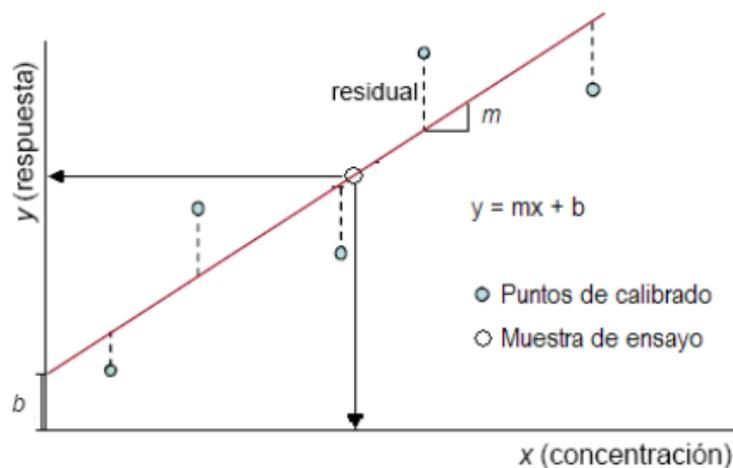


Figura 8. Curva de calibración.⁽²⁰⁾

La linealidad de la curva de calibración es un requerimiento fundamental en la práctica del análisis químico cuando se realizan curvas de calibración. Cabe mencionar que el intervalo lineal puede ser distinto para matrices diferentes de acuerdo con el efecto de las interferencias procedentes de la matriz. Como ya se mencionó con anterioridad, para demostrar la linealidad se requieren cumplir ciertos criterios de aceptación en la que estadísticamente se puede justificar esa linealidad; para ello es necesario calcular:

- La pendiente (m)
- La ordenada al origen (b)
- El coeficiente de determinación (r^2)

2.5.2 PARAMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación ha sido objeto de atención por ser requerida en Normas sobre Sistemas de Gestión de la calidad, particularmente la Norma ISO/IEC 17025:2012 sobre requisitos generales para laboratorios de calibración y ensayo.⁽²¹⁾

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos o parámetros definidos y para el propósito requerido.⁽²²⁾

Validación: “Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. El proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular”.⁽²³⁾

A continuación se presenta la definición de los conceptos básicos en la validación de métodos analíticos a realizar en este trabajo:

Linealidad: “Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito”.⁽²³⁾

Precisión: “Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de la prueba”.⁽²³⁾

Límite de detección: “La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba”.⁽²³⁾

Límite de cuantificación: “La menor concentración de un analito que puede determinarse con precisión (repetibilidad) y exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba”.⁽²³⁾

Exactitud de una medición: “Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado”.⁽²³⁾

2.6 GENERALIDADES DEL COBRE

El cobre es un elemento abundante en la corteza terrestre, y sus óxidos no solo son bien conocidos por ser estables sino también por sus múltiples propiedades eléctricas y ópticas. Específicamente el CuO y Cu₂O se puede obtener utilizando métodos de electrodeposición catódica y anódica. En el primer caso, un pulso con un potencial suficientemente alto se aplica para producir la oxidación de agua o iones hidroxilo en la superficie del electrodo, logrando así una disminución del pH local, lo que resulta en la precipitación de CuO. Por otro lado, en la electrodeposición catódica, un pulso con un potencial suficientemente negativo o bajo se aplica para reducir Cu(II) a Cu(I), que precipita en forma de Cu₂O en la superficie del electrodo. Muchos estudios⁽²⁴⁻²⁵⁾ exhiben la versatilidad de ambos métodos, mostrando que la composición, la morfología y el tamaño de las partículas están muy influenciados por los parámetros y condiciones del proceso de electrodeposito, aunque la relación entre ambos y el desempeño de los electrodos fabricados también depende del campo específico de aplicación.⁽²⁵⁾

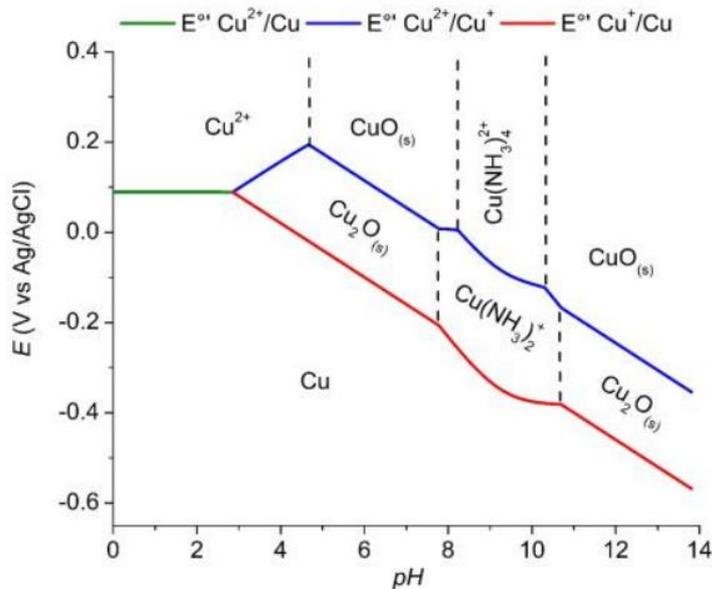


Figura 9. E vs. pH diagrama de Cu(II)/Cu(I)/Cu sistema a un total de concentración de Cu de 0.025 M en 0.5 M NH₃/NH₄.⁽²⁶⁾

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO.

3.1.1 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO.

- Agitadores de vidrio y magnéticos
- Balones volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 500 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 125 y 250 mL.
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L.
- pH metro.
- Pipetas volumétrica de 5.0 mL.
- Pizeta
- Vasos de precipitado de 10, 30, 50 y 100 mL.
- Probeta 50 mL.
- Balanza analítica Mettler AE240.
- Buretas de 50 y 25 mL.
- Parrilla de agitación y calentamiento.
- Electrodos: De trabajo: Carbono Vitreo (3mm). De referencia: Plata/cloruro de plata. Auxiliar: Barra de grafito.
- Pinzas para bureta, de sostén y de extensión.
- Potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT101
- Termómetro digital de -10°C a 110°C

3.1.2 REACTIVOS

- Agua destilada y des ionizada.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Sulfato de cobre pentahidratado, grado reactivo analítico.
- Solución buffer pH=10 (amoníaco/cloruro de amonio), grado reactivo analítico.
- Indicadores: Murexida, Negro de Eriocromo T (NET), Azul de metileno
- Amoniaco al 28%
- Tartrato de sodio y potasio
- Etanol al 90%
- Nitrato de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Ácido Clorhídrico, grado reactivo analítico.
- Glucosa, grado reactivo.
- Tartrato de sodio y potasio, grado reactivo analítico.
- Solución buffer pH=8.6 (amoníaco/cloruro de amonio), grado reactivo analítico
- Cloruro de amonio
- Ácido Nítrico, grado reactivo
- Cinc metálico
- Hidróxido de Sodio, grado reactivo

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

3.2.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR TITULACIÓN.

3.2.1.1 ESTANDARIZACIÓN DEL EDTA Y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.⁽²⁷⁾

1. Inicialmente se pesaron 0.13 g de cinc metálico (el cinc debe de limpiarse con anterioridad), y se disolvió con unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, se adicionaron 80 mL de agua desionizada y se neutralizó con unas gotas de NaOH al 10 %, en caso de la aparición de un precipitado color blanco, se adicionó HCl concentrado hasta su desaparición; el cinc fue utilizado para estandarizar EDTA usando NET como indicador, el cual dio una concentración de 0.099 mol.L^{-1} y se realizó por triplicado.
2. El EDTA estandarizado fue utilizado como patrón secundario para estandarizar $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por triplicado, utilizando indicador de murexida; para ello se titularon 5.00 mL de sulfato de cobre, obteniendo una concentración de $0.298 \text{ mol. L}^{-1}$.

3.2.1.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN LA MUESTRA DE MIEL.⁽²⁷⁾

1. Inicialmente, se preparó una disolución de miel pesando 0.5009 g de la muestra en 100 mL de agua desionizada.
2. Se preparó la disolución de Fehling a titular, mezclando 5.00 mL de la disolución Fehling A ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.298 mol.L^{-1}) y 5.00 mL de la disolución Fehling B (tartrato de sodio y potasio 1.170 mol.L^{-1} e hidróxido de sodio 2.5 mol.L^{-1}) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL.
3. Una vez preparada la disolución de Fehling, se colocó el vaso de precipitados en una parrilla de calentamiento con agitación, llevando un control de la temperatura (por arriba de los 87°C). Posteriormente, la disolución de Fehling se tituló con la disolución de miel preparada, por sextuplicado.

3.2.2 OBTENCIÓN DEL ELECTRODEPOSITO DE ÓXIDO DE COBRE(II) SOBRE EL ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO (GC-CuO).⁽²⁶⁾

3.2.2.1 LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO

1. Se pulió el electrodo de carbono vítreo con una suspensión de alúmina de 0.063 a 0.2 mm, sobre un paño haciendo movimientos circulares y en forma de ocho, con el objetivo de limpiar el electrodo y eliminar cualquier residuo e impureza sobre la superficie del electrodo.
2. Se realizó la activación electroquímica, la cual consistió en 5 ciclos de barrido de potencial en H_2SO_4 1 mol. L^{-1} en el intervalo de 0 a 1.0 V a una velocidad de 100 mV s^{-1} .
3. En el caso de no observar una limpieza total sobre la superficie del electrodo, se introdujo brevemente la superficie del electrodo en ácido nítrico concentrado por alrededor de 20 segundos y luego se enjuagó bien con agua desionizada la superficie del electrodo, para repetir nuevamente los pasos 1 y 2, los pasos anteriores se realizaron a modo de pretratamiento cada vez que se procedía a formar el depósito de óxido de cobre (II) sobre la superficie del electrodo.

3.2.2.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.^(17, 25, 26)

1. Se preparó un buffer de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ a una concentración total de 0.5 mol. L^{-1} con la finalidad de mantener el pH en 8.6. Posteriormente el buffer fue utilizado como disolvente del nitrato de cobre (II) para así formar el complejo de tetraamin cobre(II), para lo cual se pesaron 0.604 g de nitrato de cobre pentahidratado y se llevaron a un volumen final de 25.0 mL.
2. Los estándares de glucosa se prepararon a un intervalo de concentración comprendido de 1 al 5 mmol. L^{-1} a partir de una disolución madre de glucosa al 0.05 mol. L^{-1} , haciendo adiciones de 100 μL para así aumentar el nivel de la concentración y posteriormente corregir con un factor de dilución.

3.2.2.3 ELECTRODEPÓSITO DE ÓXIDO DE COBRE(II) EN UN ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO (GC-CuO).^(17, 25, 26)

1. Con el electrodo de carbono vítreo, se realizó un estudio preliminar por voltamperometría de barrido lineal a 5 mVs^{-1} en un medio de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.025 mol.L^{-1} y $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 0.5 mol.L^{-1} a $\text{pH}=8.6$ en el intervalo de potencial de 0.2 a 2.0 V. A partir del voltamperograma obtenido, se eligió un intervalo de potencial donde se observó la mayor señal de oxidación para realizar las pruebas de electrodepósito respectivas.
2. Para las pruebas de electrodepósito se aplicó un pulso de potencial durante 300 s en los potenciales seleccionados a partir del numeral anterior, en un medio de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.5 mol.L^{-1} y $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 0.5 mol.L^{-1} a $\text{pH}=8.6$.
3. Con los electrodos modificados de GC-CuO, se realizó el estudio por voltamperometría de barrido lineal a 100 mVs^{-1} en un medio de NaOH 0.1 mol. L^{-1} , en ausencia y presencia de glucosa 1 mmol. L^{-1} . Se realizaron 3 repeticiones de cada medición como mínimo; previa agitación de la disolución para asegurar la reproducibilidad de estas.
4. A partir de los resultados obtenidos, se eligió un valor de 1.18 V como potencial óptimo para la obtención del electrodo modificado GC-CuO, en función del electrodepósito que brindó una mayor respuesta para la determinación de glucosa.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL

3.2.3.1 OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.⁽²⁶⁾

1. Con el electrodo de carbono vítreo modificado con el óxido de cobre(II) GC-CuO se preparó una curva de calibración de glucosa considerando un intervalo de concentración 1 a 5 mmol. L^{-1} en NaOH 0.1 mol. L^{-1} . La señal o respuesta medida en función de la concentración de glucosa fue la corriente de oxidación de dicho compuesto a un valor de potencial dado.
2. Se realizó voltamperometrías de barrido lineal a cada una de las disoluciones, posteriormente se eligió un valor de potencial de 0.60 V para efectuar la medición de las corrientes que permitieron obtener la mayor sensibilidad para trazar la curva de calibración.

3. Se trazó la curva de calibración con el siguiente intervalo de concentración 1.0, a 5.0 mmol. L⁻¹ obteniéndose un buen coeficiente de determinación por arriba del 0.99; previo al análisis de una muestra de miel de contenido de azúcares reductores desconocido se decidió poner a prueba el método determinando el contenido de azúcares reductores en una muestra de suero al 5 % m/v de glucosa, obteniéndose resultados válidos.
4. Se determinó la concentración de azúcares reductores en la muestra real de miel, la cual se preparó pesando 0.015 g de miel y llevando a un volumen final de 25.0 mL con NaOH 0.1 mol.L⁻¹, esto con el fin de que la concentración de la muestra se encuentre dentro del intervalo lineal de la curva, es decir, en 2.33 mmol.L⁻¹, considerando un porcentaje de alrededor del 70 % de azúcares reductores en la miel estudiada.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.⁽²¹⁾

A continuación, se describe la metodología y criterios utilizados para la obtención de los diferentes parámetros de validación del método analítico desarrollado en este trabajo.

3.2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LA TÉCNICA

1. Se realizaron mediciones por triplicado en una disolución de blanco sin y con adiciones de estándar de referencia en 5 niveles distribuidos uniformemente en el intervalo de concentraciones de 1 a 5 mmol. L⁻¹.
2. Se graficó la respuesta en el eje Y en función de la concentración en el eje X, y se calcularon los estadísticos de regresión lineal apropiados. También se calcularon los residuales y se construyó el gráfico correspondiente.

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b * \bar{x}$$

Ecuación 4. Parámetros de la recta de regresión por mínimos cuadrados.⁽²²⁾

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) * (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2 * \sum(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Ecuación 5. Cálculo del coeficiente de correlación lineal.⁽²²⁾

Donde:

x_i es cada valor de concentración

\bar{x} es el valor promedio de las concentraciones

y_i es cada valor de corriente

\bar{y} es el valor promedio de las corrientes

r es el coeficiente de correlación lineal

En función de la norma también se exige determinados intervalos de confianza para intercepto y pendiente, los cuales se calculan de la siguiente manera:

$$b \pm (t_{(0,05;n-2)}) * Sb$$

Ecuación 6. Cálculo de intervalo de confianza de la pendiente.⁽³³⁾

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

Ecuación 7. Desviación estándar de la pendiente.⁽³³⁾

$$a \pm (t_{(0,05;n-2)}) * Sa$$

Ecuación 8. Cálculo de intervalo de confianza del intercepto.⁽³³⁾

$$Sa = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum(x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 9. Desviación estándar del intercepto.⁽³³⁾

3.2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE LA TÉCNICA

1. Se utilizó como muestra el blanco adicionado.
2. Se trabajó con 3 niveles de concentración: 1 mmol. L⁻¹, 3 mmol. L⁻¹ y 5 mmol. L⁻¹. Los ensayos para los niveles bajo y alto se realizaron por triplicado, mientras que para el nivel medio se realizaron por sextuplicado
3. Se determinó el valor de los siguientes parámetros: sesgo, error porcentual y porcentaje de recuperación aparente. Las ecuaciones necesarias para el cálculo de cada uno de estos parámetros se muestran a continuación.

$$b = \bar{X} - X_{ref}$$

Ecuacion 10. Ecuación para cálculo de sesgo.⁽²¹⁾

$$R(\%) = \frac{\bar{X}}{X_{ref}} * 100$$

Ecuacion 11. Ecuación para cálculo de recuperación aparente.⁽²¹⁾

$$b(\%) = \frac{\bar{X} - X_{ref}}{X_{ref}} * 100$$

Ecuación 12. Ecuación para cálculo de error relativo porcentual.⁽²¹⁾

3.2.4.3 DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LA TÉCNICA

1. Se utilizó como muestra el blanco adicionado.
2. Se realizaron ensayos a 3 niveles de concentración: 1 mmol. L⁻¹, 3 mmol. L⁻¹ y 5 mmol. L⁻¹. Para cada caso, se efectuaron 6 repeticiones. Para poder evaluar la repetibilidad, cada ensayo o repetición consideró la totalidad del proceso analítico.
3. Se determinó el coeficiente de variación porcentual de los resultados.

$$\%C_v = 100 * \frac{S}{\bar{x}}$$

Ecuación 13. Coeficiente de variación (o desviación estándar relativa) porcentual.⁽²²⁾

3.2.4.4 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DEL LÍMITE DE DETECCIÓN

1. Se tomaron 10 muestras de blancos como muestras independientes, medidos una vez cada uno.
2. Se calculó la desviación estándar de los blancos.
3. Se expresó el límite de detección (LD) como la concentración del analito correspondiente al valor promedio de los blancos de la muestra más tres veces su desviación estándar.
4. Se expresó el límite de cuantificación (LC) como el valor promedio de las lecturas de los blancos más diez veces su desviación estándar. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de LD y LC son las siguientes:

$$LD = Y_b + 3S_b$$

Ecuación 14. Límite de detección.⁽²²⁾

$$LC = Y_b + 10S_b$$

Ecuación 15. Límite de cuantificación.⁽²²⁾

y_b es el valor promedio de los datos

S_b es la desviación estándar de los datos

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DEL ELECTRODEPÓSITO DE ÓXIDO DE COBRE(II) SOBRE ELECTRODO DE CARBONO VÍTREO

Inicialmente con el electrodo de carbono vítreo, se realizó un estudio preliminar por voltamperometría de barrido lineal a 5 mVs^{-1} en un medio de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.025 mol.L^{-1} y $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 0.5 mol.L^{-1} a $\text{pH}=8.6$ en el intervalo de potencial de 0.2 a 2.0 V. Con el voltamperograma obtenido (figura 10) se definió el intervalo de estudio que fue de 1 a 1.2 V.

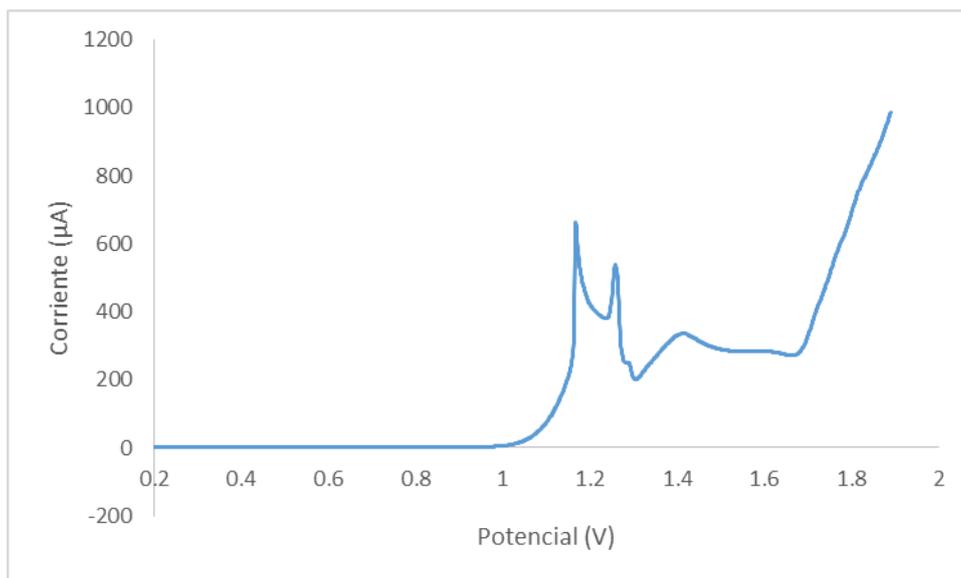


Figura 10. Voltamperograma de barrido lineal a 5 mVs^{-1} en un medio de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.025 mol.L^{-1} y $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ 0.5 mol.L^{-1} a $\text{pH}=8.6$ en el intervalo de potencial de 0.2 a 2.0 V

Posteriormente se realizó el electrodeposición anódica de CuO con pulsos de una duración de 300 s y potencial con una magnitud en el intervalo de 1.05 a 1.25 V. La figura 11 muestra las curvas de I vs t correspondiente a dicho proceso, donde es posible observar que para los experimentos realizados a potenciales mayores o iguales a 1.25 V se obtiene un máximo de corriente para valores de $t < 5$ s. El máximo de corriente antes mencionado es una característica distintiva del proceso de nucleación y crecimiento de una nueva fase sobre el electrodo, correspondiente en este caso a $\text{CuO}(\text{s})$. Después, se determinó la respuesta de glucosa 1 mmol. L^{-1} con los electrodos de GC-CuO fabricados y la técnica de voltamperometría de barrido lineal. Como respuesta se tomó el valor de corriente de oxidación a 0.6 V respecto a la referencia empleada. En la figura 12 se muestra la respuesta amperométrica de glucosa, siendo posible identificar que la mejor respuesta se obtiene con los electrodos de GC-CuO fabricados con un pulso de potencial de 1.15 y 1.20V.

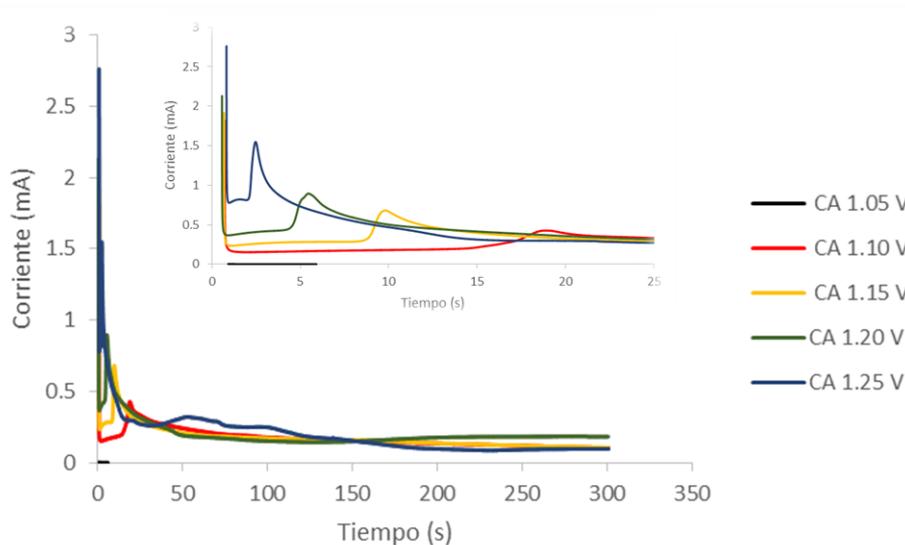


Figura 11. Cronoamperogramas de 300 s para la formación del electrodeposición de CuO en el intervalo de potenciales de 1.05V a 1.25V.

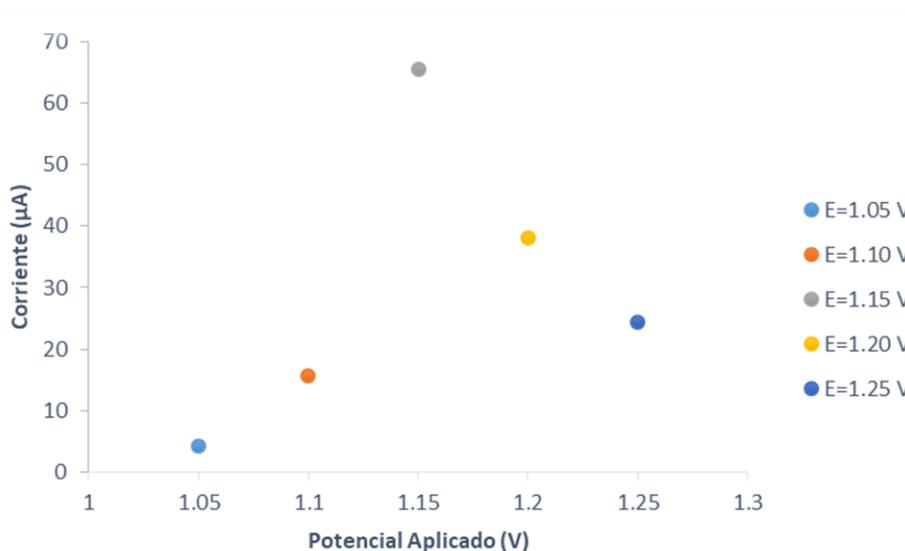


Figura 12. Respuesta amperométrica a 0.6 V para glucosa 1 mmol. L⁻¹ con los electrodos de CuO-GC preparados a diferentes potenciales en el intervalo de 1.05 a 1.25 V.

En vista de los resultados obtenidos, se decidió ampliar el estudio en el intervalo de 1.15V a 1.20V para los valores de magnitud del pulso de potencial anódico aplicado. En la figura 13 es posible observar que la mejor respuesta para la oxidación de glucosa a 0.6 V se obtiene con el electrodo de GC-CuO fabricado con un pulso anódico de 1.18 V.

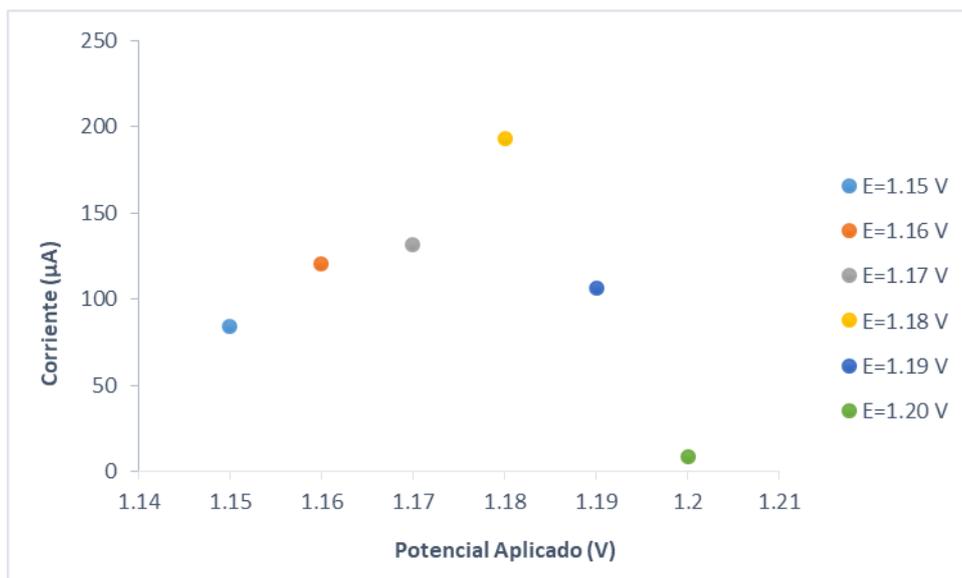


Figura 13. Respuesta amperométrica a 0.6 V para glucosa 1 mmol. L⁻¹ con los electrodos de CuO-GC preparados a diferentes potenciales en el intervalo de 1.15 a 1.20V.

Considerando los resultados logrados anteriormente se trazó una curva de calibración en el potencial de máxima respuesta del analito, el cual fue 1.18 V y se midieron 5 niveles de concentración, desde 1 a 5 mmol. L⁻¹, para lo cual se obtuvo la gráfica y la ecuación de regresión de la figura 14.

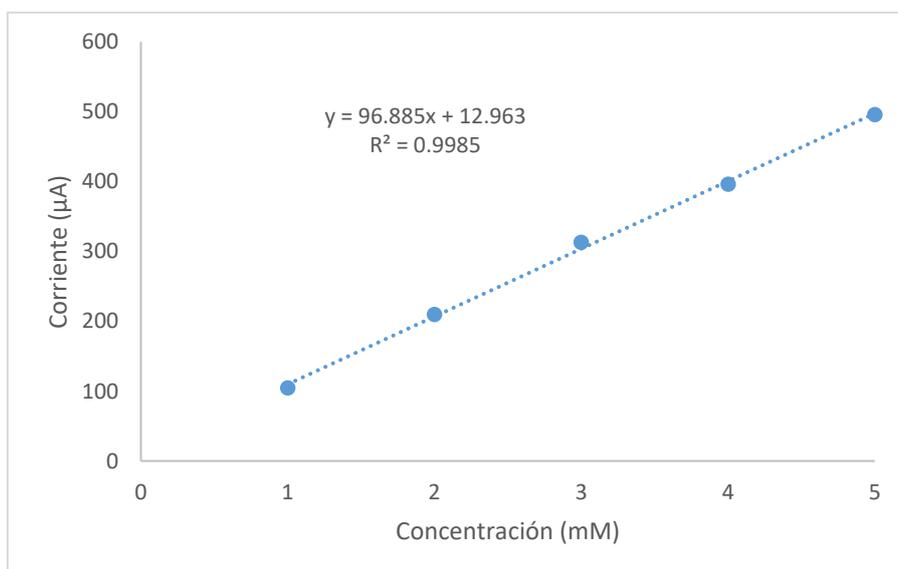


Figura 14. Curva de calibración de glucosa. Medio: NaOH 0.1 mol. L⁻¹. Técnica: Amperometría a 0.6 V vs ref. Electrodo de trabajo: GC-CuO fabricado a 1.18 V.

Con el fin de garantizar el correcto funcionamiento del método, se procedió al análisis de una muestra de concentración conocida utilizando un suero de glucosa al 5% m/v. Posteriormente, utilizando la curva de calibración de la figura 14 y conociendo el volumen de muestra de 0.1 mL y el volumen final de aforo de 10.0 mL se determinó la concentración de glucosa o azúcares reductores presentes en la muestra de suero.

$$\left(\frac{269.38 - 12.96}{96.88}\right) \left(\frac{10.0 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}}\right) \left(\frac{0.001 \text{ M}}{1 \text{ mM}}\right) = 0.269 \text{ mol. L}^{-1}$$

Obteniendo la concentración molar es posible calcular el porcentaje m/v de la muestra y así poder compararla con el valor verdadero que viene dado en la etiqueta del suero de glucosa (5% m/v) y poder estimar el error porcentual dado en la medición.

$$0.269 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}\right) \left(180.156 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times 100 = 4.85 \%$$

$$\left(\frac{5 - 4.85}{5}\right) \times 100 = 2.95 \%$$

De esta manera se obtiene un resultado de 4.85% en relación masa sobre volumen del suero contra el 5% que reporta la etiqueta y dentro de un error aceptable en la medición, el cual fue del 2.95% en valor absoluto, de igual forma se calcula el porcentaje de glucosa para todas las curvas de calibración.

4.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL

Posterior a varios experimentos, en los que se realizaron curvas de calibración y se obtuvieron resultados congruentes en la determinación de la concentración de glucosa en el suero, se procedió a determinar el contenido de azúcares reductores desconocidos en una muestra de miel. La curva de calibración de patrones externos utilizada se presenta en la figura 15.

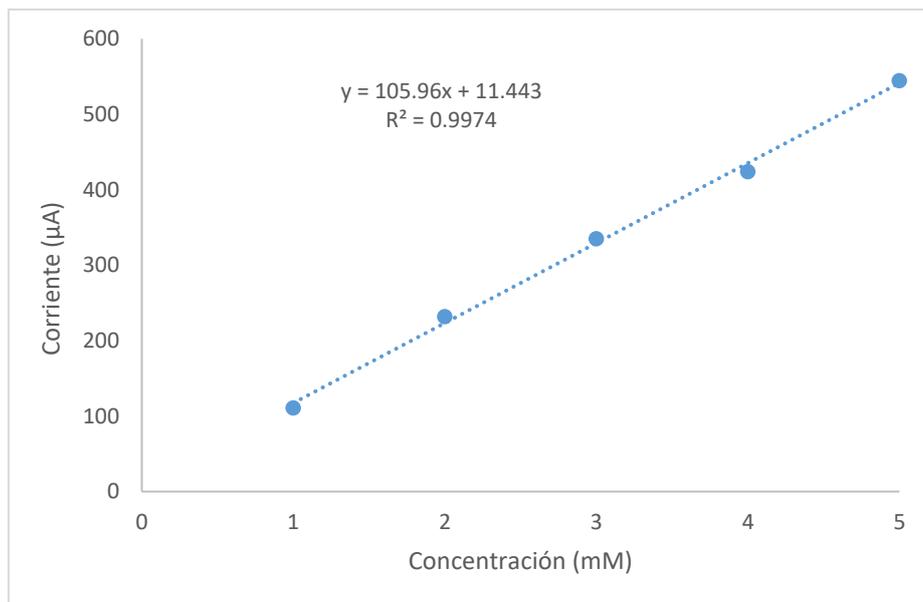


Figura 15. Curva de calibración de glucosa. Medio: NaOH 0.1 mol. L⁻¹. Técnica: Amperometría a 0.6 V vs ref. Electrodo de trabajo: GC-CuO fabricado a 1.18 V.

Conociendo la ecuación y gráfico de regresión se midió la respuesta de la muestra de miel y se graficaron los voltamperogramas de todos los niveles de concentración los cuales se muestran en la figura 16.

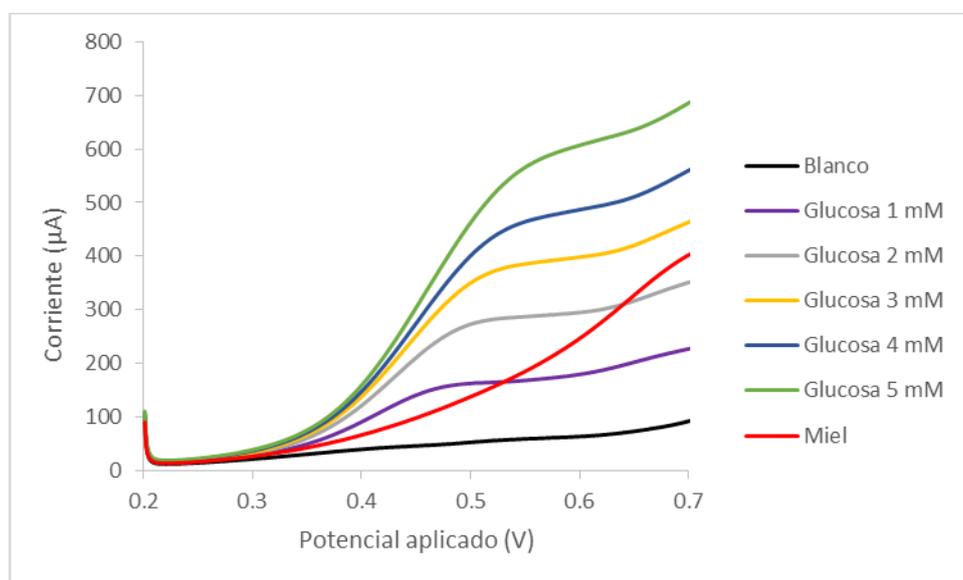


Figura 16. Voltamperometría de barrido lineal para disoluciones de glucosa a diferentes concentraciones (1 - 5 mmol. L⁻¹). V=100 mV s⁻¹. Medio: NaOH 0.1 mol. L⁻¹. Electrodo de trabajo: CuO-GC fabricado a 1.18 V.

De igual forma se realizaron 5 mediciones de glucosa en los niveles de concentración de 0 a 5 mmol.L⁻¹ sobre el electrodo de carbono vítreo sin depósito. Los voltamperogramas de la figura 17 muestran que sobre dicha superficie no se observa una señal atribuible a la oxidación de glucosa.

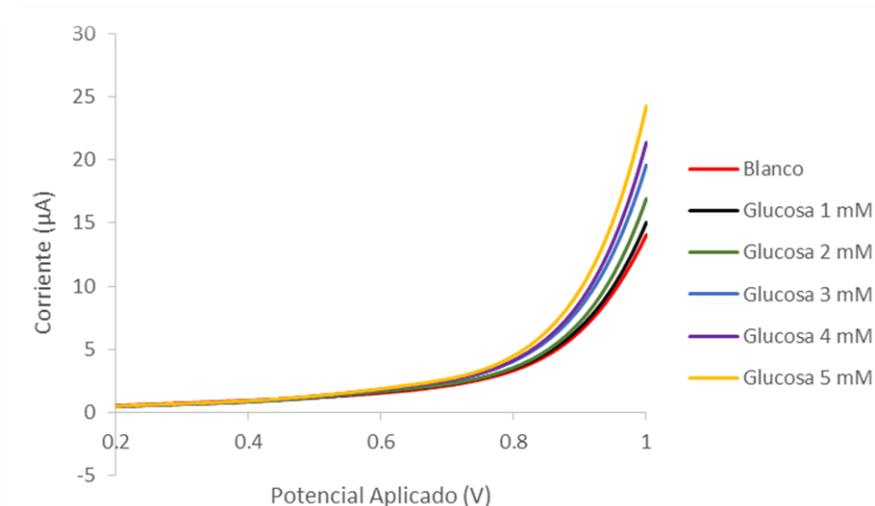


Figura 17. Voltamperometría de barrido lineal para disoluciones de glucosa con un intervalo de concentraciones (1 - 5 mmol. L⁻¹). V=100 mV s⁻¹. Medio: NaOH 0.1 mol. L⁻¹. Electrodo de trabajo: sin depósito de CuO

Para la determinación del porcentaje de azúcares reductores en la muestra de miel, se utilizó el valor promedio de corriente obtenido a través de 6 mediciones independientes. El cálculo con la ecuación de regresión de la figura 15 se realizó de la siguiente manera:

$$\left(\frac{184.21 - 11.443}{105.96}\right) = 1.846508 \text{ mmol. L}^{-1}$$

Considerando la concentración y el volumen de la muestra se pueden conocer los moles de azúcares reductores

$$\left(1.846508 \frac{\text{mmoles}}{\text{L}}\right) * (0.025 \text{ L}) * \left(\frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmoles}}\right) = 4.61 \times 10^{-5} \text{ moles}$$

Posteriormente, con la masa molar se obtienen los gramos de los azúcares reductores se y se calcula la relación que existe entre la masa de azúcares reductores y la masa de la muestra pesada al inicio en términos de porcentaje:

$$(4.61 \times 10^{-5} \text{ moles}) * \left(180.156 \frac{\text{g}}{\text{moles}}\right) = 0.008316 \text{ g}$$

$$\frac{0.008316 \text{ g}}{0.0157 \text{ g}} * 100 = 52.97 \%$$

De la misma manera se hicieron los cálculos para las siguientes 5 mediciones de la muestra y se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la determinación de porcentaje de azúcar reductor en la muestra de miel para seis mediciones.

Medición muestra de Miel por sextuplicado	Masa de miel pesada (g)	Corriente de la muestra de miel corregida (μA)	Concentración (mmol.L⁻¹) de azúcares reductores	Porcentaje de azúcar Reductor (%)
1	0.0157	184.21	1.856	52.97
2	0.0149	171.20	1.723	52.10
3	0.0156	182.44	1.829	52.82
4	0.0155	180.40	1.810	52.60
5	0.0151	172.68	1.737	51.82
6	0.0153	176.83	1.776	52.30
\bar{x}	0.0153	177.96	1.787	52.44

4.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN MIEL POR TITULACIÓN.

Para fines de comparación, la misma muestra de miel se analizó por medio del método oficial de Lane-Eynon. Los resultados correspondientes se describen a continuación:

Como primer paso, se estandarizó una disolución de EDTA con cinc como patrón primario, a través de una volumetría por formación de complejos, utilizando NET como indicador. Para tal fin, se preparó una disolución de Zn(II) a partir de 0.1308 g de cinc y

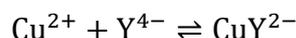
se tituló con 20.2 mL de EDTA, para alcanzar el punto final de la titulación. Considerando una estequiometría 1:1 para Zn(II): EDTA en la reacción de titulación, se obtuvo la concentración para la disolución de EDTA de 0.099 mol. L⁻¹:

$$\left(\frac{0.1308 \text{ g cinc}}{65.38 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ cinc}} \right) = 0.0020 \text{ mol cinc}$$

$$0.0020 \text{ mol cinc} \left(\frac{1 \text{ mol de EDTA}}{1 \text{ mol de cinc}} \right) = 0.0020 \text{ mol de EDTA}$$

$$\left(\frac{0.0020 \text{ mol de EDTA}}{0.0202 \text{ L de EDTA}} \right) = 0.099 \text{ mol. L}^{-1} \text{ EDTA}$$

Conociendo la concentración de EDTA en esta disolución puede emplearse ahora como patrón secundario para determinar la concentración exacta de CuSO₄·5H₂O en la disolución de Fehling A, también mediante una volumetría por formación de complejos, pero utilizando para este caso murexida como indicador. Dado que se obtuvo un gasto promedio de 15.1 mL de titulante, se obtuvo una concentración de 0.2298 mmol. L⁻¹ de CuSO₄.



Ecuación 16. Reacción entre el EDTA y el cobre en estado de oxidación +2

$$15.1 \text{ mL} \left(\frac{0.099 \text{ mmol EDTA}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mmol EDTA}} \right) \\ = 1.4949 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

$$[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = \frac{1.4949 \text{ mmol}}{5.0 \text{ mL}} = 0.298 \text{ mmol. L}^{-1}$$

Finalmente, la disolución estandarizada de Cu(II) se utilizó como patrón secundario para determinar la concentración de azúcares reductores en la muestra de miel, esto por medio de una volumetría redox y empleando como indicador azul de metileno. Para este caso, estudios previos⁽³⁴⁾ demuestran que la estequiometría Az. Red:Cu(II) de la reacción redox en cuestión es 1:5, donde Az. Red representa a los azúcares reductores, principalmente

glucosa y fructosa en la miel. Ahora bien, considerando el volumen de disolución de miel gastado en cada ensayo, se obtienen los siguientes resultados para el porcentaje de Az. Red en la muestra de miel:

$$1.4949 \text{ mmol Cu}^{2+} \left(\frac{1 \text{ mmol Az Red}}{5 \text{ mmol de Cu}^{2+}} \right) \left(\frac{180.16 \text{ mg de Az Red}}{1 \text{ mmol de Az Red}} \right) = 53.86 \text{ mg Az. Red}$$

Conociendo los volúmenes gastados de miel para las 6 mediciones (20.7, 20.6, 21.0, 21.1, 21.1, 21.0) podemos determinar el porcentaje de Azúcar reductor presente en la muestra.

$$53.68 \text{ mg Az Red} \left(\frac{100 \text{ mL Az. Red}}{20.7 \text{ mL Az. Red}} \right) \left(\frac{260.21 \text{ mg}}{500.9 \text{ mg de muestra}} \right) \times 100 = 51.94 \%$$

El cálculo ejemplifica el porcentaje de azúcares reductores de la primera medición de 6 efectuadas, debido a que todo se calcula de la misma forma, cada uno de los volúmenes debe efectuarse individualmente, dando los siguientes resultados.

Tabla 2. Porcentajes de azúcar reductores obtenidos por titulación redox.

Muestra	Dilución de miel (mg miel/ mL de disolución)	V(mL) del punto de equivalencia	Porcentaje (%) de Azucares reductores
1	500.9/100	20.7	51.94
2	500.9/100	20.6	52.20
3	499.8/100	21.0	51.31
4	499.8/100	21.1	51.07
5	499.8/100	21.1	51.07
6	499.8/100	21.0	51.31
\bar{x}	500.16/100	20.9	51.48

4.4 DETERMINACIÓN DE PARAMETROS DE VALIDACIÓN

A continuación, se describen los resultados para la evaluación de los diferentes parámetros de validación del método instrumental desarrollado en este trabajo.

4.4.1 LINEALIDAD

Se obtuvieron las respuestas del método instrumental para cada medida de concentración en las 3 curvas ya corregidas por el blanco, es decir restar el valor de corriente obtenido en el blanco a cada uno de las corrientes en cada punto de concentración y corregidas por la dilución, que consiste en multiplicar el valor de corriente en cada punto por el factor de dilución aplicado, las cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Corrientes obtenidas en las mediciones de las diferentes curvas realizadas.

Concentración mM	Corriente corregida μA curva 1	Corriente corregida μA curva 2	Corriente corregida μA curva 3
1	104.50	110.80	104.28
2	196.7	220.12	209.69
3	285.09	309.14	312.61
4	376.46	386.83	395.89
5	454.35	481.61	495.61
Muestra de suero	269.38	277.63	273.92

Al realizar los cálculos de regresión lineal por mínimos cuadrados se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

Tabla 4. Ecuaciones de regresión lineal para cada curva y su respectivo valor de R.

	Ecuación de regresión	R²
Curva 1	$y = 87.945x + 19.587$	$R^2 = 0.9992$
Curva 2	$y = 90.832x + 29.207$	$R^2 = 0.9968$
Curva 3	$y = 96.885x + 12.963$	$R^2 = 0.9985$

El principal objetivo de la determinación de 3 curvas es obtener una curva promedio de las mediciones, como se muestra a continuación.

Tabla 5. Corriente promedio de las mediciones para las 3 curvas realizadas.

Concentración (mM)	Corriente curva 1 (μA)	Corriente curva 2 (μA)	Corriente curva 3 (μA)	Corriente promedio (μA)
1	104.50	110.80	104.28	106.53
2	196.70	220.12	209.69	208.84
3	285.09	309.14	312.61	302.28
4	376.46	386.82	395.89	386.39
5	454.34	481.61	495.61	477.19

Una vez que se tienen las corrientes promedio se lleva a cabo la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se obtiene la curva de calibración que se observa en la figura 18, la cual es necesaria para calcular los valores de corriente teórica a partir del modelo lineal, y_{teo} , que resulta de sustituir el valor de la concentración de cada punto en la ecuación de regresión.

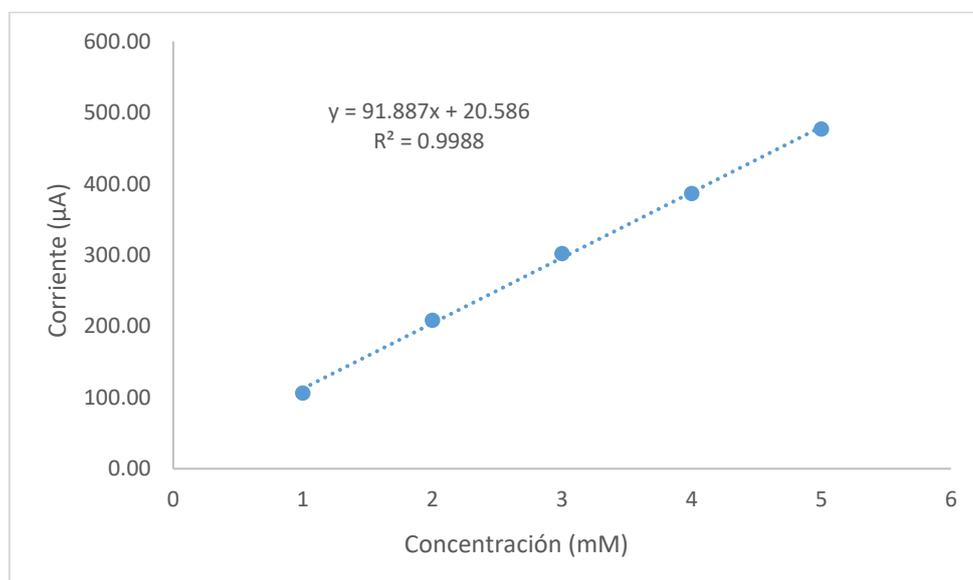


Figura 18. Gráfico de regresión lineal para el promedio de mediciones de las 3 curvas realizadas.

Por ejemplo, una concentración de glucosa 1 mmol. L⁻¹ se obtiene una corriente teórica igual a:

$$(91.887 * 1) + 20.586 = 112.443 \mu\text{A}$$

Teniendo en cuenta lo anterior, el residuo se calcula como la diferencia entre el valor promedio de la corriente experimental, y_{exp} , y el valor calculado de la corriente con la ecuación de regresión, y_{teo} . De este modo se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 6. Valores de residuo obtenido para el promedio de curvas.

Concentración (mmol. L ⁻¹)	Corriente promedio experimental, y_{exp} (μA)	Corriente teórica, y_{teo} (μA)	Residuo
1	106.53	112.47	-5.942
2	208.84	204.36	4.480
3	302.28	296.24	6.036
4	386.39	388.13	-1.739
5	477.19	480.02	-2.830

Al graficar los residuales se obtiene una dispersión aleatoria y sin tendencias en el gráfico, lo que nos indica que no existe un patrón de error calculado sobre la medición del promedio de las curvas.

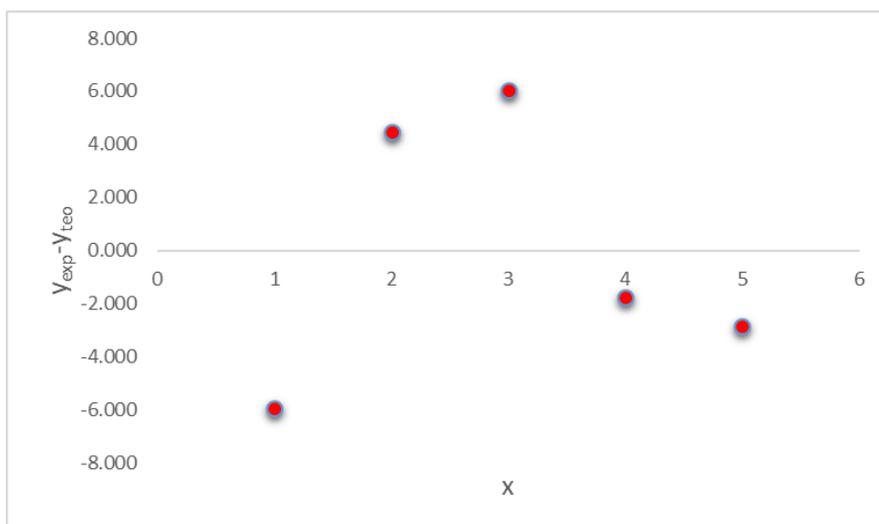


Figura 19. Tabla de dispersión de residuales de los mínimos cuadrados promedios recabados de las mediciones de 3 curvas.

La figura 20 contiene el gráfico de residuales para cada una de las 3 series de datos que se utilizaron para la construcción de la curva de calibración, mostrando así que existe una dispersión aleatoria en las 3 series de datos, ya que ninguna curva tiene el mismo patrón ni se registran 2 puntos similares entre las 3 curvas.

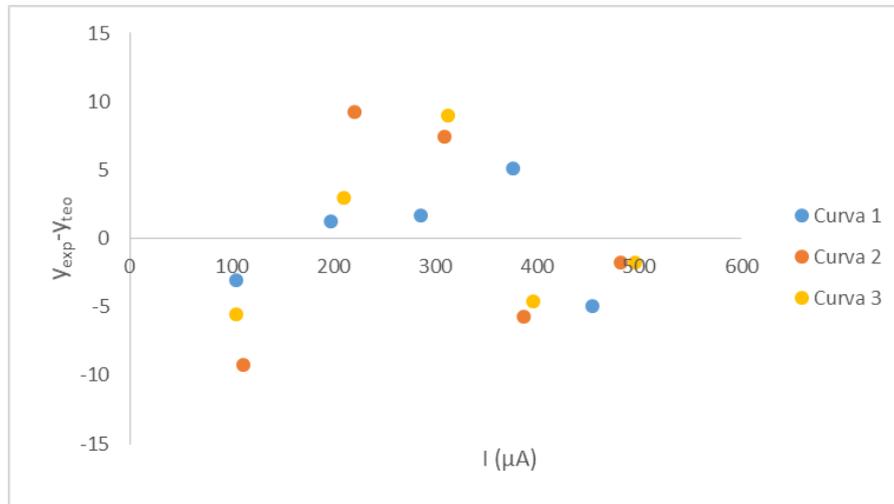


Figura 20. Tabla de dispersión de residuales de mínimos cuadrados de tres mediciones. Los parámetros de la ecuación de regresión e incertidumbre asociada son los siguientes:

Intervalo de confianza del intercepto: 20.5857 ± 19.5398

Intervalo de confianza de la pendiente: 91.88 ± 5.89

En función de todo lo anterior podemos someter nuestros resultados a los criterios de aceptación definidos para la linealidad por la norma, los cuales son los siguientes:

1. Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.
2. Datos aleatorios en el gráfico de residuales.
3. El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva.
4. $R \geq 0.98$

La linealidad obtenida cumple con todos los criterios de aceptación de la norma ISO/IEC 17025:2005 en el intervalo de concentraciones de glucosa de 1 a 5 mmol. L⁻¹, pues el valor de R obtenido es de 0.9993, al igual que se observa una aleatoriedad en el gráfico de residuales, es decir la dispersión de los datos observados no sigue una tendencia

definida e igual entre las 3 curvas. Por otra parte, aunque el intervalo de confianza del intercepto en este caso no incluye al cero, se debe de tener en cuenta que las concentraciones a las que se trabajó no son bajas de acuerdo con lo indicado en la norma, por lo que este criterio no debería tener incidencia en la validez de este parámetro en esta metodología.

4.4.2 EXACTITUD

A continuación, se presenta la curva de calibración obtenida y las mediciones para los niveles de concentración, bajo, medio y alto de concentración.

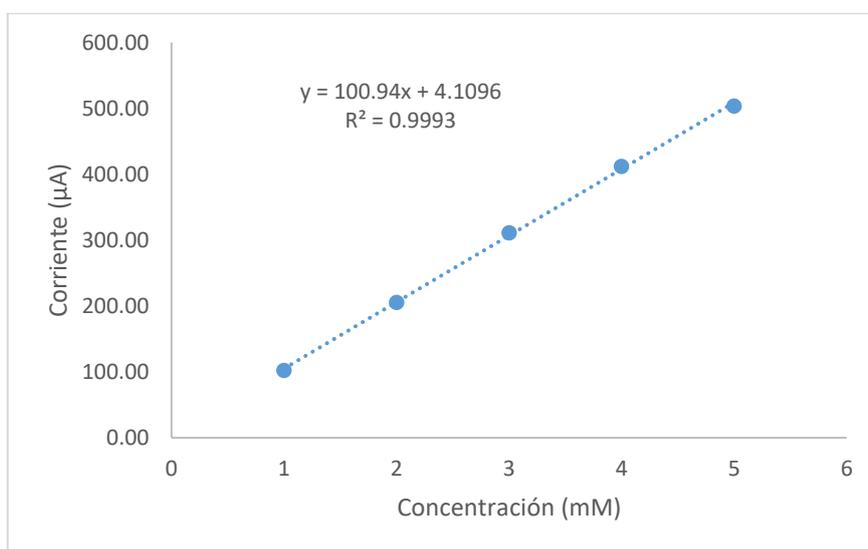


Figura 21. Gráfico lineal de mínimos cuadrados de las mediciones de exactitud.

1. Tabla 7. Nivel de concentración bajo (1 mmol. L⁻¹).

Medición	Corriente (µA) experimental	Concentración estimada (mmol. L ⁻¹)
1	117.155	1.119
2	108.243	1.031
3	106.138	1.010
\bar{x}	110.512	1.05

2. Tabla 8. Nivel de concentración medio (3 mmol. L⁻¹).

Medición	Corriente (μA) experimental	Concentración estimada (mmol. L⁻¹)
1	300.321	2.934
2	311.521	3.045
3	303.953	2.970
4	297.819	2.909
5	299.894	2.930
6	306.272	2.993
\bar{x}	303.296	2.963

3. Tabla 9. Nivel de concentración alto (5 mmol. L⁻¹).

Medición	Corriente (μA) experimental	Concentración estimada (mmol. L⁻¹)
1	490.14	4.815
2	504.514	4.957
3	496.335	4.876
\bar{x}	496.99	4.882

Tomando como ejemplo la primera medición el valor del error relativo porcentual se calcula utilizando la ecuación 12, la siguiente forma:

$$b(\%) = \frac{(1.05 - 1)}{1} * 100 = 5.4 \%$$

Y finalmente el valor de la recuperación aparente se calcula de acuerdo a la ecuación 11.

$$R(\%) = \frac{1.05 * 100}{1} = 105.4 \%$$

Haciendo el mismo tratamiento aritmético para los demás niveles de concentración se obtienen los siguientes datos de recuperación aparente:

Tabla 10. Porcentaje de recuperación aparente obtenido para los diferentes niveles de concentración en la prueba de exactitud.

Nivel de concentración	Error relativo porcentual b (%)	Recuperación aparente R(%)
1	5.4	105.4
3	-1.2	98.8
5	-2.3	97.7

El nivel de concentración del analito determinado en este trabajo es de 0.01%, por lo cual para que el criterio de exactitud se cumpla se requiere de una recuperación (R%) de 85% - 110 %. Para los niveles de concentración escogidos (1 mmol. L⁻¹, 3 mmol. L⁻¹ y 5 mmol. L⁻¹) todas las mediciones cumplen con lo establecido en la norma, por lo tanto existe exactitud en las mediciones de cada punto y en general para las mediciones del método, ya que la variación entre el valor promedio y el valor de referencia se encuentra dentro de los límites establecidos por la guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos.

Tabla 11. Criterios de aceptación para porcentajes de recobro.⁽²¹⁾

Concentración del analito	Intervalo
100%	98% - 101%
10%	95% - 102%
1%	92% - 105%
0.1%	90% - 108%
0.01%	85% - 110%

4.3.3 PRECISIÓN

A continuación, se presenta la curva de calibración obtenida y las mediciones para los niveles de concentración, bajo, medio y alto de concentración.

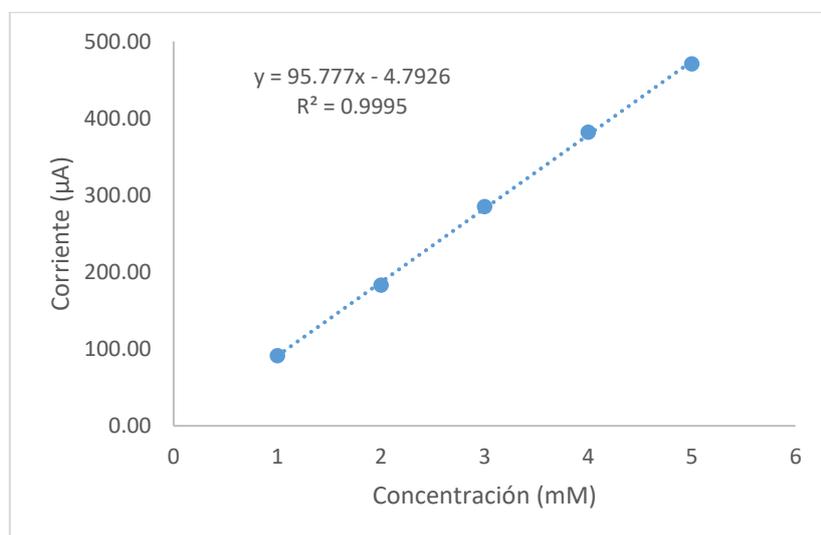


Figura 22. Gráfico lineal de mínimos cuadrados de las mediciones de precisión.

1. Tabla 12. Nivel de concentración bajo (1 mmol. L⁻¹).

Medición	Corriente µA experimental	Concentración (mmol. L ⁻¹) estimada
1	100.195	1.096
2	101.356	1.108
3	95.323	1.045
4	106.718	1.164
5	102.911	1.124
6	104.071	1.136
	\bar{X}	1.112
	S	0.04

2. Tabla 13. Nivel de concentración bajo (3 mmol. L⁻¹).

Medición	Corriente μA experimental	Concentración (mmol. L ⁻¹) estimada
1	291.937	3.098
2	288.763	3.064
3	278.357	2.956
4	285.132	3.027
5	291.174	3.090
6	299.322	3.175
	\bar{x}	3.073
	S	0.07

3. Tabla 14. Nivel de concentración bajo (5 mmol. L⁻¹).

Medición	Corriente μA experimental	Concentración (mmol. L ⁻¹) estimada
1	476.996	5.030
2	476.141	5.021
3	489.538	5.161
4	481.451	5.076
5	480.322	5.065
6	490.79	5.174
	\bar{x}	5.091
	S	0.07

En primer lugar, se calcula la desviación estándar de la media de los datos para cada uno de los puntos en su respectivo nivel, posteriormente este dato se utiliza para calcular el coeficiente de variación porcentual del analito. Por ejemplo, para el nivel de concentración bajo (1 mmol. L⁻¹) se obtiene lo siguiente:

$$CV\% = \frac{0.04}{1.11} * 100 = 3.6\%$$

Este cálculo es la representación o ejemplificación del primer nivel de concentración, y de igual manera se efectúan los cálculos para los niveles restantes, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 15. Coeficiente de variación porcentual para cada nivel de concentración en la prueba de precisión.

Nivel de medición (mmol. L⁻¹)	CV %
1	3.6
3	2.4
5	1.3

Para un nivel de concentración del analito del 0.01%, es decir 100 ppm, el máximo valor del coeficiente de variación permitido es de 5.3%, como lo indica la tabla 16. Para los niveles de concentración escogidos (1, 3 y 5 mmol. L⁻¹) se puede apreciar en la tabla 15 que todos cumplen con el criterio establecido, por lo que es veraz concluir que existe precisión en las mediciones realizadas y que en las 6 réplicas efectuadas los valores no se alejan significativamente unos de los otros.

Tabla 16. Coeficiente de variación porcentual del analito a distintas concentraciones.⁽²¹⁾

Analito %	Proporción del analito	Unidades	CV%
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1%	2.7
0.1	10-3	0.1%	3.7
0.01	10-4	100 ppm	5.3
0.001	10-5	10 ppm	7.3
0.0001	10-6	1 ppm	11
0.00001	10-7	100 ppb	15
0.000001	10-8	10 ppb	21
0.0000001	10-9	1 ppb	30

4.3.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

En primer lugar, se calculó el promedio de las “concentraciones”, producto de sustituir la corriente en la ecuación de regresión y posteriormente se calculó la desviación estándar de la media de los datos tomados, para poder obtener el límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla 17. Datos obtenidos de la medición de blancos para la determinación de LD y LC.

Medición	Corriente experimental (μA)	Concentración estimada (mmol. L⁻¹)
1.0	62.53	0.488
2.0	61.64	0.478
3.0	62.04	0.482
4.0	62.13	0.483
5.0	61.88	0.480
6.0	61.95	0.481
7.0	61.92	0.481
8.0	60.69	0.467
9.0	61.24	0.473
10.0	61.06	0.471
\bar{x}		0.478
S		0.00631

Con base en las ecuaciones 14 y 15 se calcula los siguientes datos:

Límite de Detección

$$0.4789 + 3 * 0.0063 = 0.0498 \text{ mmol. L}^{-1}$$

Límite de Cuantificación

$$0.4789 + 10 * 0.0063 = 0.0542 \text{ mmol. L}^{-1}$$

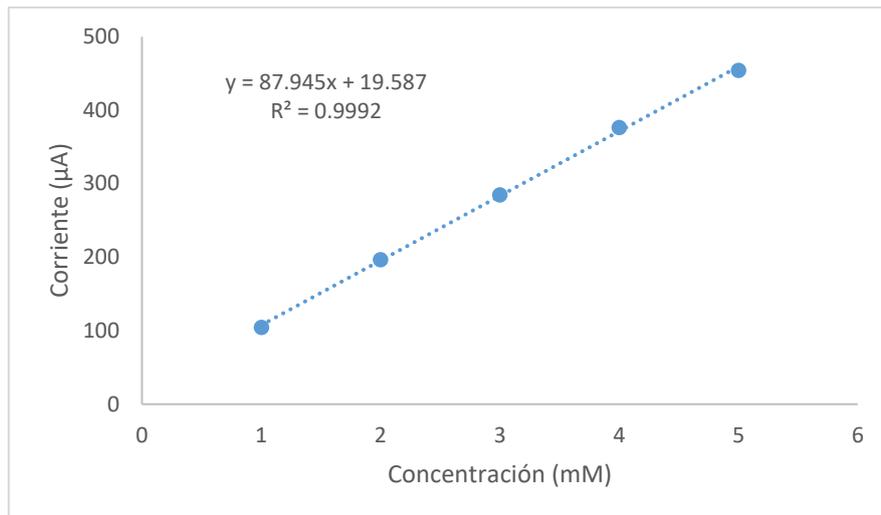


Figura 23. Gráfico lineal de mínimos cuadrados de las mediciones de blancos.

Finalmente, se obtuvo que la concentración mínima a la que se pueden detectar azúcares reductores (LD) con suficiente certeza es igual a $0.4978 \text{ mmol. L}^{-1}$, mientras que la concentración mínima a la que se pueden cuantificar azúcares reductores con suficiente certeza por este método es de $0.5421 \text{ mmol. L}^{-1}$. Con base en estos resultados podemos decir que la determinación del contenido de azúcares reductores en miel es factible con el método propuesto, ya que el contenido promedio de azúcares reductores en miel se encuentra por encima de los valores del límite de detección y cuantificación.

Los valores obtenidos de límite de detección y límite de cuantificación también pueden ser traducidos a porcentaje de azúcar reductor mínimo que se puede detectar y cuantificar por este método, los cuales son:

Límite de detección $0.4978 \text{ mmol. L}^{-1} = 14.94\%$ de Azúcares reductores

Límite de cuantificación $0.5421 \text{ mmol. L}^{-1} = 16.22\%$ de Azúcares reductores

5. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

La comparación entre la determinación de los azúcares reductores por el método clásico y el método instrumental nos permite concluir que la muestra no contiene el nivel que es requerido de azúcares reductores según la norma (NSO 67.19.01:08), ya que ambos métodos muestran que el nivel está entre 50 a 53%, es decir por debajo de lo establecido en la norma el cual es del 60 % de azúcares reductores. Por otra parte, también es importante saber si en la comparación entre método oficial de Lane-Eynon y la medición voltamperométrica de barrido lineal existe una diferencia significativa en los resultados, y para esto se realizó una prueba F, para la comparación de ambas varianzas y para ellos se utilizó las 6 mediciones del porcentaje de azúcares reductores en la miel tanto por el método instrumental como el método de titulación clásica utilizado.

Tabla 18. Datos comparativos entre mediciones instrumentales y mediciones clásicas.

i	Datos método instrumental	Datos método clásico
1	52.97	51.94
2	52.10	52.20
3	52.82	51.31
4	52.60	51.07
5	51.82	51.07
6	52.30	51.31
\bar{x}	52.44	51.48

Tabla 19. Datos estadísticos de la prueba F

Promedio	52.44	51.48
Desv Est	0.44	0.47
CV	0.84	0.92
S²	0.194	0.225
Grado de libertad 1	5	
Grado de libertad 2	5	
NC	95.00	%
α	0.05	
F calculado	1.1583	
F tabulado	5.0503	

Al determinar que el valor tabulado es mayor que el valor calculado, se observa que no existen diferencias significativas entre las varianzas de los datos medidos y podemos

concluir que ambas mediciones son confiables, además que existe precisión en las mediciones y pueden ser comparadas entre sí.

Posteriormente, se realizó la prueba t-student, para comparar los resultados obtenidos con ambos métodos analíticos y determinar si entre estos existen o no diferencias significativas. En este caso tomaremos como hipótesis nula que el promedio de las mediciones realizadas con el instrumental no difiere significativamente de las realizadas con el método clásico y asumiendo un coeficiente de variación entre promedios del 5%.

Tabla 20. Datos estadísticos de la prueba t-student comparativos entre el método tradicional y el método clásico.

Promedio	52.44	51.48
Desv Est	0.4405	0.4741
CV	0.8402	0.9209
Sx	0.17985	0.19356
Grados de libertad	10	
NC	95	%
α	0.05	
t tabulado	2.228139	
t calculado	3.601868	
Diferencia porcentual entre promedios	1.83	%

En este caso el t calculado es ligeramente superior al t tabulado por lo que se descarta la hipótesis nula, y debido a ello si existen diferencias significativas entre los promedios de los resultados de ambas mediciones, sin embargo, la diferencia entre ambos porcentajes es pequeña y menor al 5 %, se pueden aceptar esas diferencias. Uno de los principales factores para tomar como valido este resultado es que posiblemente la diferencia en los resultados se deba a que las mediciones instrumentales siempre son más precisas que las mediciones tradicionales, ya que se disminuye el factor de error humano.⁽²⁸⁾

6. CONCLUSIONES

- 1) El electrodo modificado de carbono vítreo con un electrodepósito de óxido de cobre(II) GC-CuO fue preparado con éxito por cronoamperometría.
- 2) La metodología instrumental desarrollada para determinar azúcares reductores por voltamperometría presenta bajos límites de detección y cuantificación cuando se han determinado los parámetros más adecuados para realizar el electrodepósito de óxido de cobre(II). Esto permite simplificar el proceso de análisis de la miel y utilizar una cantidad mucho menor de muestra.
- 3) Se evaluaron con éxito los parámetros de validación del método analítico propuesto en este trabajo, demostrando así su confiabilidad para la determinación de azúcares reductores. También, se comprobó que el método desarrollado proporciona resultados estadísticamente muy similares a los obtenidos con el método de titulación con disolución de Fehling, aunque existan diferencias significativas.
- 4) La metodología con los depósitos electroquímicos de óxido de cobre(II) sobre electrodos de carbono vítreo para la determinación de azúcares reductores en miel se presenta entonces como una alternativa atractiva, pues permite ahorrar significativamente tiempo y reactivos con respecto a la técnica tradicional de titulación con disolución de Fehling.
- 5) Tomando en cuenta los criterios de aceptación de la guía de validación de métodos analíticos fisicoquímicos para el parámetro de exactitud, los valores de recuperación aparente cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto el método presenta exactitud en sus mediciones.
- 6) Según la Norma Salvadoreña para Miel de Abeja (NSO 67.19.01:08), la muestra de miel estudiada **NO CUMPLE** con el requisito mínimo de contenido en azúcares reductores (60%) ya que la obtenida en promedio ronda el 52.44% en la medición por voltamperometría y un 51.48% en la medición por titulación.

7. RECOMENDACIONES

- 1) Se recomienda estudiar con detenimiento la obtención de los parámetros del proceso de electrodeposición, ya que este es un paso fundamental para mejorar la sensibilidad de la medición de los azúcares reductores en la muestra.
- 2) Trabajar siempre a una temperatura constante, debido a que los métodos analíticos dependen de la temperatura.
- 3) De igual forma trabajar con un regulador de voltaje conectado sobre el equipo, ya que la variación de la corriente puede llegar a afectar las mediciones por más mínimas que sean.
- 4) Hacer siempre una limpieza adecuada del electrodo, ya que un factor clave para la obtención de un depósito uniforme y reproducible es que la superficie del electrodo se encuentre pulida, activada y lo más limpia posible. En este sentido, es recomendable pulir varias veces con alúmina, hacer la activación por voltamperometría cíclica en ácido sulfúrico al 0.1 mol.L^{-1} y también hacer baños a la superficie del electrodo con ácido nítrico concentrado.
- 5) En tanto no se estudie la estabilidad del electrodo (en términos de cuánto tiempo se obtienen mediciones similares con el mismo electrodo), se recomienda preparar un electrodo modificado cada vez que se desee construir una curva de calibración. Se recomienda también realizar el análisis de la muestra con el electrodo con el que se construyó la curva de calibración.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mayorga Cerón, J.H. (2012). Caracterización de la Cadena Productiva de Miel en El Salvador. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) – Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), El Salvador.
2. Deforestación amenaza producción de miel en El Salvador | Prensa Gráfica <https://www.laprensagrafica.com/economia/Deforestacion-amenaza-produccion-de-miel-en-El-Salvador-20190915-0372.html> (consultado 11-07-2021).
3. Según: David Alfredo Servellón Castro (2023), Investigador del MINED-ucyt (ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología) “Los análisis de perfil de azúcares se realizan en los laboratorios del centro de educación e investigación en ciencias aplicadas del Ministerio de Educación, pero no se cuenta con la acreditación de los ensayos y estos son más como un valor de referencia ya que no son válidos para documentos oficiales para la exportación, y por lo general los compradores exigen tener los análisis en laboratorios acreditados en Europa”.
4. Velásquez Reales, J. A. (2014). Aplicación de técnicas electroquímicas en el control de calidad de miel. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.
5. de Vela, M. G.; Guevara, R. A. L.; Vides, G.; Perdomo, R.; Corvera, R.; Fuentes, M.; de Alarcón, Z. I.; Quevedo, N. E. P.; de Valiente, E.; Sosa, C.; Hernández, R.; de Huevo, R.; Alfaro, C. V.; Guerrero, R. M.; Díaz, J.; Castillo, E. X. Norma Salvadoreña NSO 67.19.01:08 Miel de Abejas. Especificaciones (Segunda Actualización).
6. Sanz Cervera, S., Sanz Cervera, M. M. (1994). Humedad, cenizas y conductividad eléctrica de mieles de La Rioja. Consejería de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de La Rioja. España.
7. Díaz Roldán, A. T. (2012). Aporte analítico al conocimiento de la calidad de la miel. Comparación entre algunas mieles mexicanas y extranjeras. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
8. Preza de la Vega, J. (2007). Estudio electroquímico aplicando a la cuantificación de azúcares en mieles. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
9. McMurry, J. (2008). Organic Chemistry (7th ed.). USA. Thomson.

10. International Programme on Chemical Safety (2004). Fichas Internacionales de Seguridad Química: Fructosa. Tomado de <http://goo.gl/cH12r>
11. DeMan, J.M. (1999). Principles of Food Chemistry. USA. Aspen Publishers.
12. Caballero Puente, H.D. (2009). Nuevos criterios de calidad para miel basados en procedimientos electroquímicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Joseph Wang, Analytical Electrochemistry, segunda edición, A John Wiley and Sons Inc, New York, 2000.
14. Scholz, F. and Meyer, B., Electroanalytical Chemistry, A Series of Advances, ed. M. Dekker. Vol. 20. 1998, New York: A.J. Bard & I. Rubinstein.
15. Charlot, G., Badoz-Lambling, J. y Trémillon, B. Las reacciones electroquímicas. [trad.] J. Alonso López. España : Toray-Masson, 1969. págs. 347-352.
16. Skoog, D.A., West, D. M., Holler, F.J. (2001). Fundamentos de Química Analítica (4ª. Ed). Barcelona: Editorial Reverté.
17. Hanchun Y., Xiaoying Z., Daojun Z., Lin L., Baiqing Y., (2013). Shape-controlled Synthesis of Cu₂O Microstructures at Glassy Carbon Electrode by Electrochemical Method for Non-enzymatic Glucose Sensor, Internal Journal of Electrochemical Science, Hena, China.
18. Modern Electroplating, 5th ed.; Schlesinger, M., Paunovic, M., Eds.; The electrochemical society series; Wiley: Hoboken, NJ, 2010.
19. José M. P, Pedro S. B, (2003). Química Electroanalítica, Fundamentos y aplicaciones, Madrid, España, Editorial Síntesis.
20. Daniel C. Harris, (2007) Análisis Químico Cuantitativo, 3 edición, editorial Reverte, Barcelona España.
21. Organismo Salvadoreño de Acreditación | G9.6 validación de métodos analíticos fisicoquímicos <http://www.osa.gob.sv/descarga/validacion-de-metodos-analiticos-fisicoquimicos/> (consultado 11-07-2021).
22. Moreno, Ramirez, M-V, Carmen Hidalgo, (2009). Calidad y Seguridad en el Laboratorio, editorial Síntesis, S. A, Madrid, España.
23. “B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. www.eurachem.org.
24. Y. Yang, Y. Li, M. Pritzker, Electrochim. Acta, 213 (2016) 225.

25. P. Poizot, C.J. Hung, M.P. Nikiforov, E.W. Bohannan, J.A. Switzer, *Electrochem. Solid-State Lett.*, 6 (2003) 2.
26. Gueras Silva. U. B, Velasquez Relares. J. A, Tgle Chavez, P. G, Aguilar Cordero, J. C. (2022), Glucose, Fructose and H₂O₂ Detection by Microstructured Copper and Cobalt Oxides Electrodeposited onto Glassy Carbon Electrodes using Potentiostatic or Potentiodynamic Methods, *International Journal of Electrochemical science*, 17, Ciudad de México, México, 30.
27. Rodríguez Jacinto Guiteras, Rovira, R.R. and Baldajos, G.F.i (2011) *Curso experimental en química analítica*. Madrid: Síntesis.
28. Skoog, D.A., Nieman, T.A., Holler, F.J. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (5ª. Ed). Madrid, España: Editorial Concepción Fernández Madrid.
29. José T. C. Barragan, Sergio Kogikoski, Jr., Everson T. S. G. da Silva, and Lauro T. Kubota. (2018), Insight into the Electro-Oxidation Mechanism of Glucose and Other Carbohydrates by CuO-Based Electrodes, *Analytical Chemistry*, Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil.
30. Bader, Morris (1980). "A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis". *Journal of Chemical Education* 57.
31. Comité Internacional de Normalización | requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, Norma ISO-IEC-17025, <http://ISO-IEC-17025-2005.pdf> (cimav.edu.mx). (consultado 2005-05-15).
32. Velásquez Reales, J. A.; Chicas, Baños; D. F.; Aquino Campos, M. A.; Reyes Salas, O.; Herrera Nosthas, J. G. (2018). Proyecto de Investigación N°16.27: Técnicas Electroanalíticas en la determinación de actividad antioxidante y residuos de oxitetraciclina y propóleos de *Apis mellifera* (Apidae). Secretaría de Investigaciones Científicas de la Universidad de El Salvador.
33. Miller, J. N., Miller, J. C., & Miller, R. D. (2018). *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education Limited.
34. Preza de la Vega. Joaquin, (2007) Estudio Electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en miel, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

9. ANEXOS

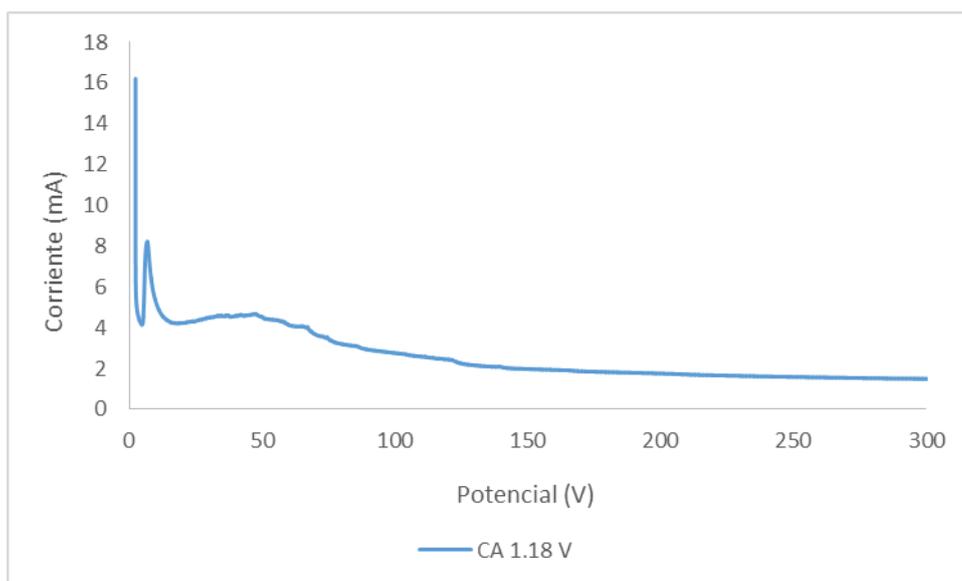


Figura 24. Cronoamperograma a $E=1.18$ V para la formación del depósito de óxido de cobre (II).

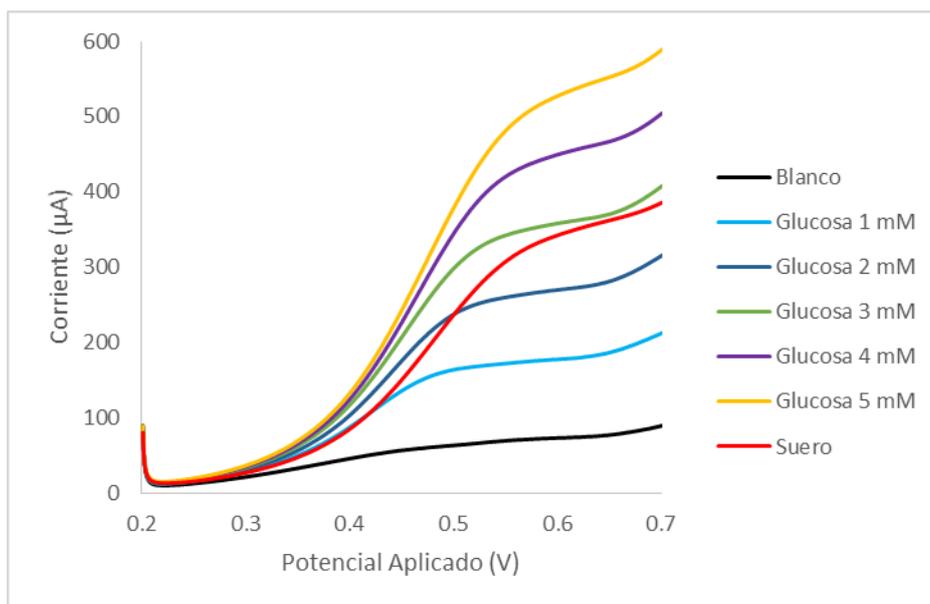


Figura 25. Voltamperograma de medición de glucosa en potencial de 1.18V y su respectiva medición de blanco y suero al 5% (curva 1).

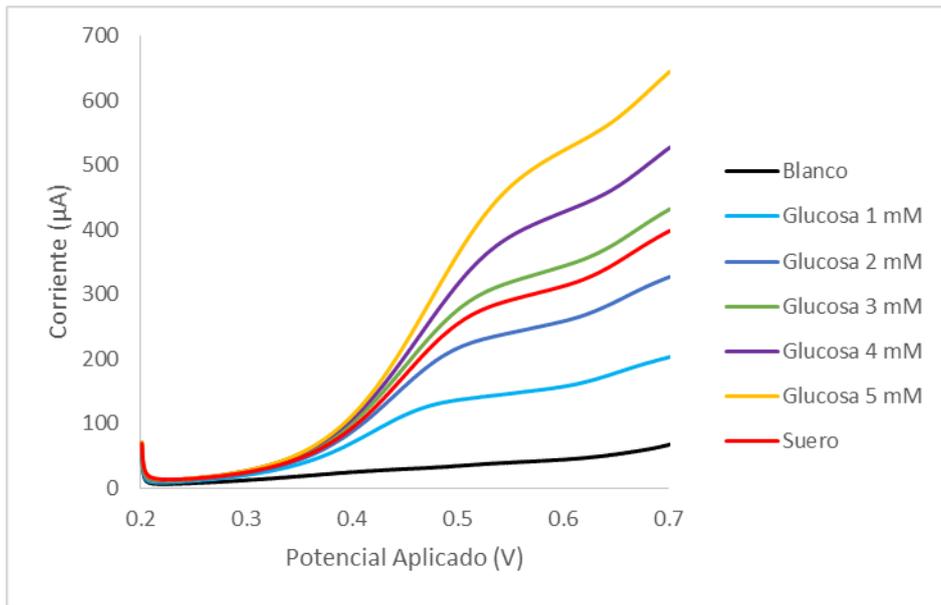


Figura 26. Voltamperograma de medición de glucosa en potencial de 1.18V y su respectiva medición de blanco y suero al 5% (curva 2).

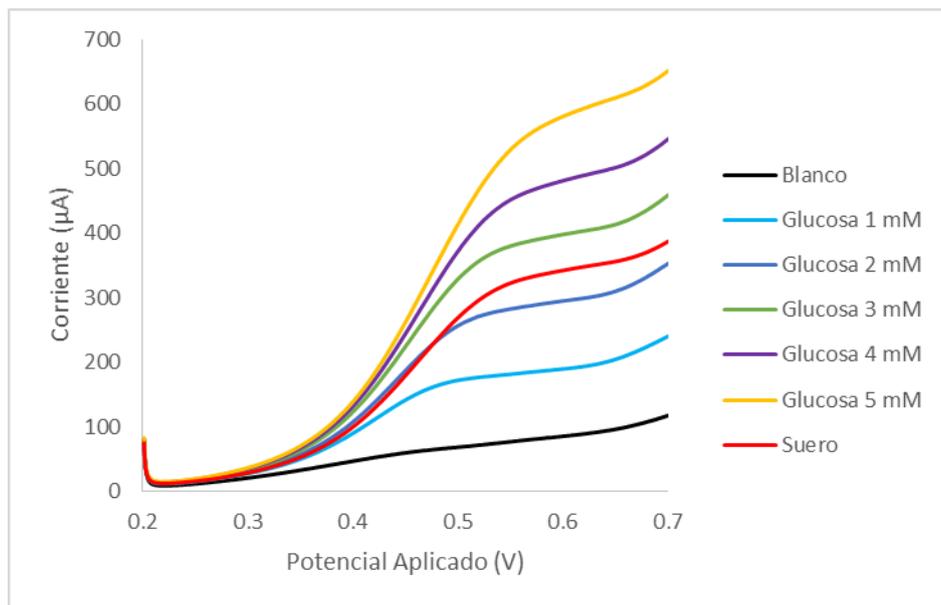


Figura 27. Voltamperograma de medición de glucosa en potencial de 1.18V y su respectiva medición de blanco y suero al 5% (curva 3).



Figura 28. Deposito de Oxido de Cobre (II) sobre la superficie del electrodo de carbono vitreo.



Figura 29. Sistema de celda y 3 electrodos utilizado para las mediciones.

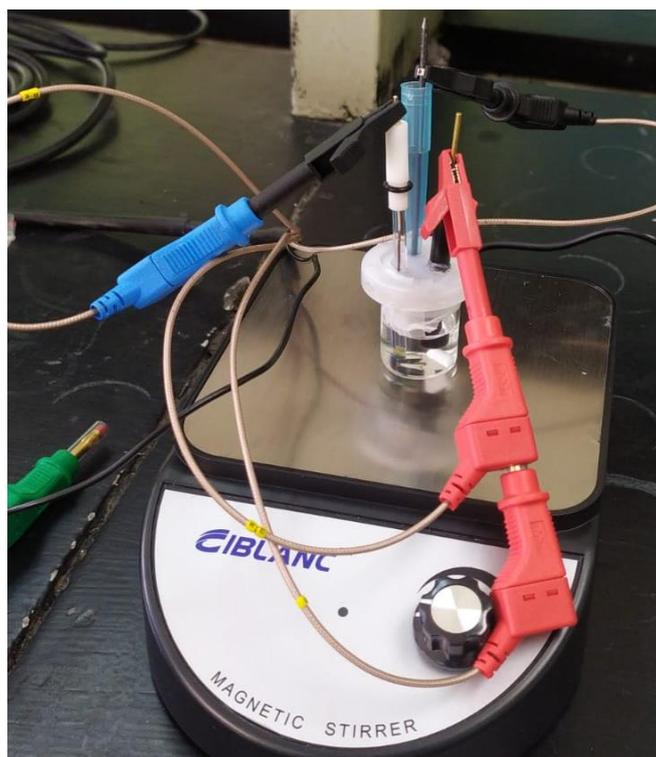


Figura 30. Sistema de celda y electrodo montado sobre el sistema de agitacion.

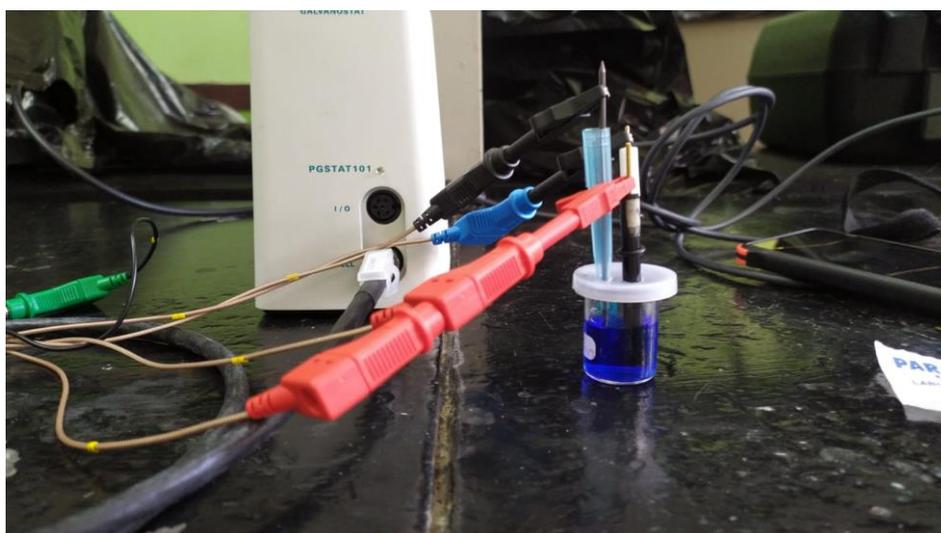


Figura 31. Sistema de celda y electrodos en la formacion del deposito.



Figura 32. Equipo utilizado para la medición.



Figura 33. Precipitado de la solución de cobre antes de formar el complejo con el amoníaco.

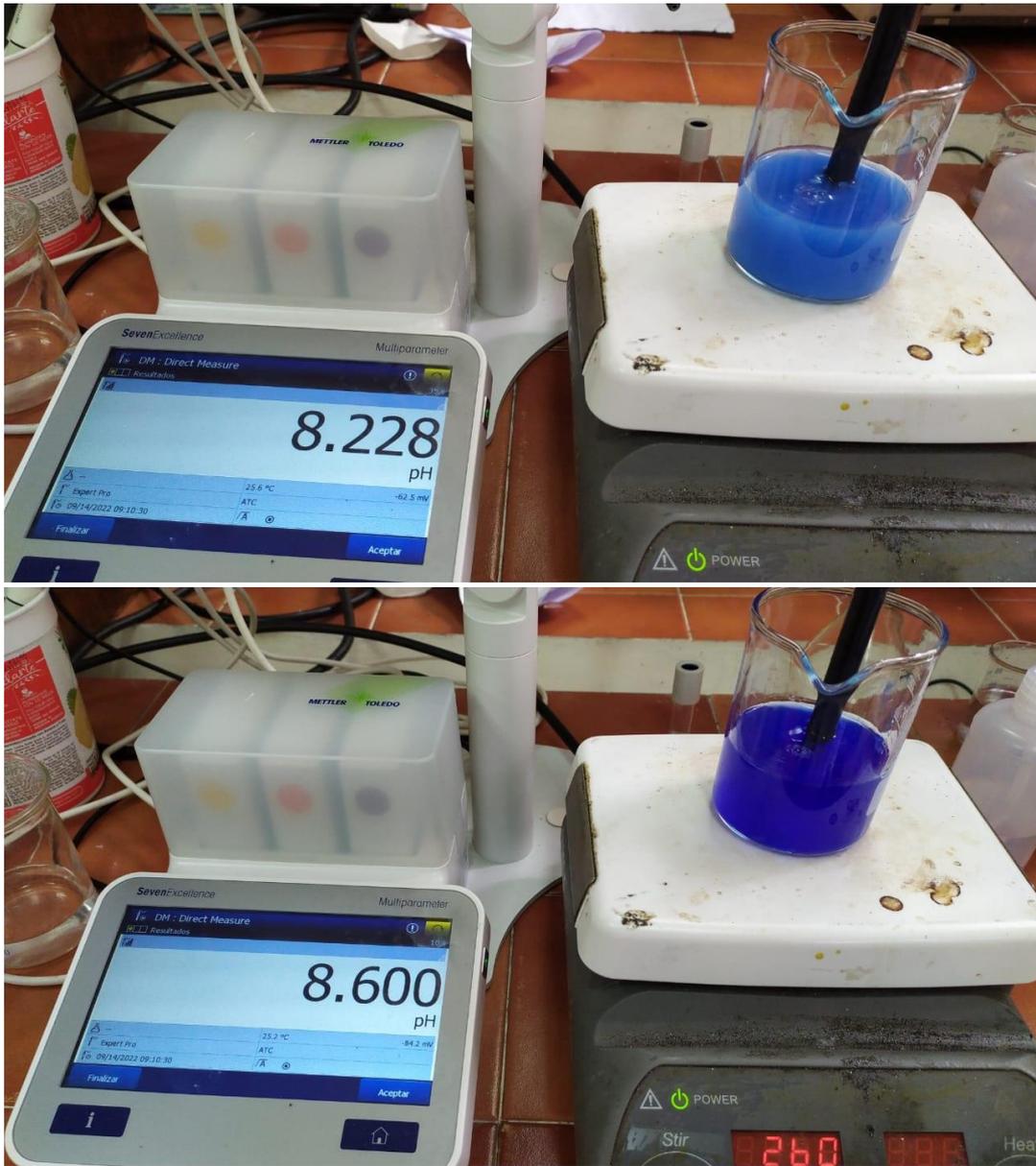


Figura 34. Diferencia en el aspecto de la disolución de cobre con respecto al pH.



Figura 35. Deposito de Oxido de Cobre (II) sin interaccion con la muestra.



Figura 36. Sistema de 3 electrodos con deposito de Oxido de cobre (II).

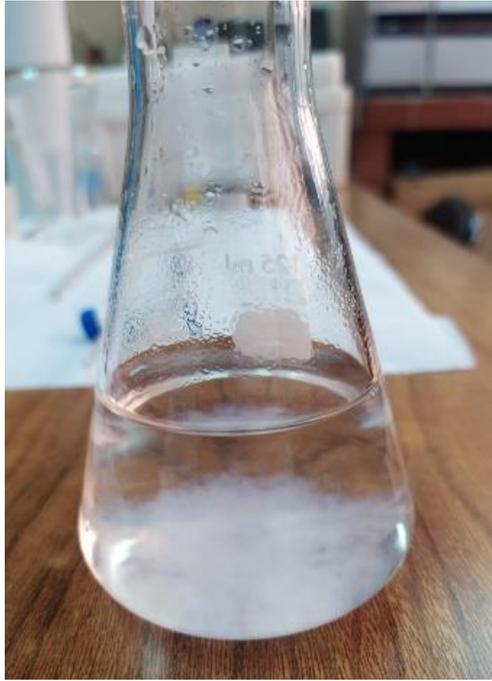


Figura 37. Zinc precipitado en forma de $\text{Zn}(\text{OH})_2$.



Figura 38. Preparación del NET.

Procedimiento para la estandarización del Cobre con EDTA.

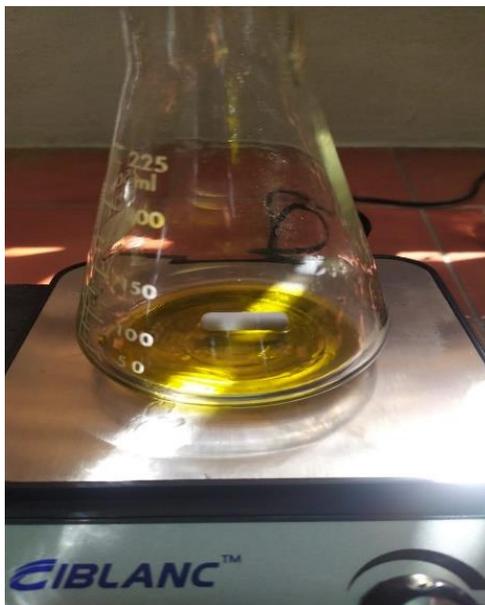


Figura 39. Punto inicial de la reacción.



Figura 40. Punto de la reacción en que se torna verde claro la disolución.

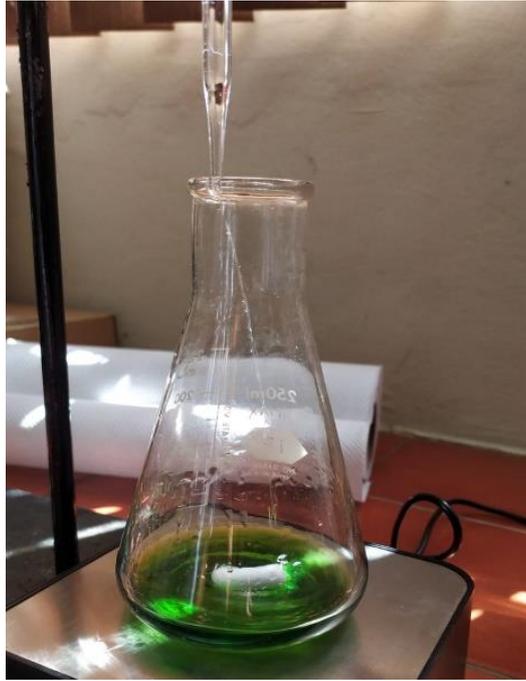


Figura 41. Punto en la reaccion donde la disolucion se torna verde oscuro.



Figura 42. Punto final de la titulacion de cobre con EDTA.

Prodecimineto para la titulacion de la muestra con Fehling



Figura 43. Disolucion de Fehling A + B.



Figura 44. Adicion del indicador a la muestra.



Figura 45. Punto final de la titulación.



Figura 46. Comparativa entre el punto inicial y el punto final de la titulación de la muestra de miel.

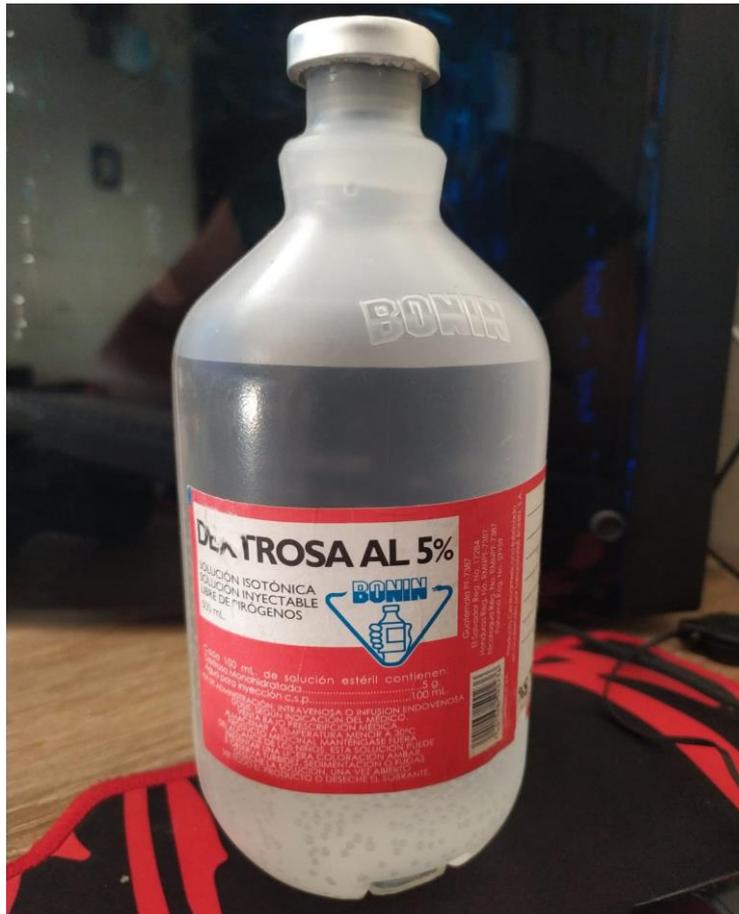


Figura 47. Muestra de suero utilizada.



Figura 48. Componentes del suero.