

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



**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN EL CONTROL DE  
CALIDAD DE MIEL”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:  
JORGE ALBERTO VELÁSQUEZ REALES**

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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ENERO DE 2014**

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



**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE MIEL”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**  
**JORGE ALBERTO VELÁSQUEZ REALES**

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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ENERO DE 2014**

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

**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN EL CONTROL DE  
CALIDAD DE MIEL”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**  
**JORGE ALBERTO VELÁSQUEZ REALES**

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

**ASESORES:**

**DR. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS** \_\_\_\_\_  
**DR. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO** \_\_\_\_\_

**CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ENERO DE 2014**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

**ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO**

**SECRETARIA GENERAL**

**DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA**

**FISCAL GENERAL**

**LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**DECANO**

**MSC. MARTÍN ENRIQUE GUERRA CÁCERES**

**SECRETARIO**

**LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO**

## **DEDICATORIA**

Al Dios de Jesús, por tanto bien recibido durante este caminar.

A mis padres Jorge y Rosa, por su amor y apoyo incondicional a través de todas las adversidades para culminar esta etapa de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por mostrarme su providencia durante todo el desarrollo de este trabajo.

A mi familia: mis padres Jorge y Rosa, mis hermanas Margarita e Iris y mi sobrina Jenny. Especialmente a mis padres, porque sin ellos no habría llegado hasta este momento.

Al Dr. Octavio Reyes, por haberme dado la oportunidad de conocer el gran país de México, por permitirme trabajar con él en su laboratorio de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), máxima casa de estudios. Por supuesto, por su tremenda hospitalidad durante los cuatro meses de mi estancia y por último y no menos importante, por haber sido el asesor externo de este trabajo. Mil gracias.

Al Dr. Néstor Orellana, por ser el asesor interno de este trabajo, por su disposición a que las observaciones y correcciones fueran realizadas lo más pronto posible. Gracias por no solo haber sido el asesor de este trabajo, sino mi amigo durante toda la carrera universitaria.

A la MSc. Rosario de Zepeda y Licda. Ana Thelma de González, por ser las observadoras de este trabajo. Gracias por su gran disposición y realización de observaciones, las cuales siempre se dieron a la brevedad posible.

A la Vicerrectoría Académica de la Universidad de El Salvador, especialmente a la Vicerrectora Ana María Glower, por hacer posible este trabajo al financiar la pasantía que me permitió mi estancia en la UNAM.

A Ulrich, por haber sido mi compañero de laboratorio en la UNAM, por su paciencia y disposición a enseñarme y resolver mis dudas, por ser mi amigo y haber sido como el “tercer asesor no oficial” de este trabajo.

A Cristobal, Hiram, Selma, Sarí y Alí, por haberme hecho sentir como en casa y ayudarme en todo lo que estuvo a su alcance mientras estuve en México.

A mis mejores amigos: Ivania, que siempre me acompaña y apoya a pesar de la distancia y Roberto, por ser un amigo incondicional, por apoyarme y aguantarme todos estos años.

A mí querida comunidad CVX: Carito, David, Gaby, Johnny, Tania y Xavi. Por compartir la vida y haberme apoyado siempre en todas las dificultades. Especialmente a David, por tantos años de amistad y apoyarme sin medida cuando lo he necesitado.

A Julita y Osmin, por sus palabras de aliento y señales tan acertadas para volver al camino correcto.

A Diego, Marthita, Nathalie, Luis y Vilma, por su valiosa amistad durante los años que compartimos juntos en la carrera.

A mi otra familia: Adonay, Cecy, Claudia y Jimmy, por su apoyo y tantos momentos buenos compartidos. Especialmente a Claudia, por ser una amiga en un millón.

A Laura, por su amistad, que pesar que decidió entregarle su vida a la carrera de medicina siempre estuvo pendiente de mí.

A mis amigos y compañeros de trabajo del Programa “Jóvenes Talento” de la Universidad de El Salvador, el cual ha sido fundamental en mi vida.

## INDICE

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	2
2.1. HISTORIA DE LA APICULTURA	2
2.2. LA APICULTURA EN EL SALVADOR	4
2.3. LA MIEL DE ABEJA	5
2.3.1. CLASIFICACIÓN	6
2.3.1.1. POR SU ORIGEN BOTÁNICO	6
2.3.1.2. SEGÚN PROCEDIMIENTO DE COSECHA	6
2.3.1.3. SEGÚN SU PRESENTACIÓN	6
2.3.1.4. SEGÚN SU FORMA DE PRODUCCIÓN	7
2.3.1.5. SEGÚN SU DESTINO	7
2.3.1.6. SEGÚN SU PROCESO	7
2.3.2. COMPOSICIÓN	7
2.3.2.1. HUMEDAD	7
2.3.2.2. CARBOHIDRATOS (GLÚCIDOS)	8
2.3.2.3. PROTEÍNAS	8
2.3.2.4. ENZIMAS	8
2.3.2.5. AMINOÁCIDOS	9
2.3.2.6. ÁCIDOS	9
2.3.2.7. MINERALES	9
2.3.2.8. SUSTANCIAS AROMÁTICAS	9
2.3.3. CONTROL DE CALIDAD	10
2.3.3.1. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	10
2.3.3.1.1. AZÚCARES REDUCTORES	10



2.3.3.1.2. CENIZAS	11
2.3.3.1.3. FRUCTOSA	12
2.3.3.1.4. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	13
2.3.3.1.5. HUMEDAD	15
2.3.3.1.6. SACAROSA	15
2.4. TÉCNICAS UTILIZADAS	16
2.4.1. ELECTROQUÍMICA	16
2.4.1.1. POTENCIOMETRÍA Y TITULACIONES POTENCIOMÉTRICAS	17
2.4.1.2. CONDUCTIMETRÍA	20
2.4.1.3. POLAROGRAFÍA	22
2.4.1.3.1. POLAROGRAFÍA CLÁSICA	22
2.4.1.3.2. POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS	23
2.4.1.4. TITULACIÓN AMPEROMÉTRICA A POTENCIAL IMPUESTO	24
2.4.2. REFRACTOMETRÍA	26
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
3.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO	29
3.1.1. MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO	29
3.1.2. REACTIVOS	29
3.2. MUESTRAS	30
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
3.3.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	32
3.3.1.1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR POTENCIOMETRÍA	32
3.3.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS	32
3.3.1.3. DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA	33
3.3.1.4. DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	34

3.3.1.5. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	35
3.3.1.6. DETERMINACIÓN DE pH	35
3.3.1.7. DETERMINACIÓN DE SACAROSA	35
3.3.2. APLICACIÓN DE LA POLAROGRAFÍA EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	35
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
4.1.DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	40
4.1.1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.	40
4.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS	44
4.1.3. DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA	46
4.1.4. DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	49
4.1.5. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	53
4.1.6. DETERMINACIÓN DE PH	54
4.1.7. DETERMINACIÓN DE SACAROSA	55
4.1.8. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS EN LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	58
4.2.APLICACIÓN DE LA POLAROGRAFÍA EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	60
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>72</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	<b>73</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Producción en toneladas de miel de abeja en los países de Guatemala y El Salvador, período: 2002 – 2010.	5
Tabla 2.	Información de muestras de miel utilizadas para análisis de control de calidad.	30
Tabla 3.	Comparación de características organolépticas (sabor y olor) entre las muestras.	31
Tabla 4.	Resultados obtenidos en la determinación de azúcares reductores.	43
Tabla 5.	Resultados obtenidos en la determinación de cenizas.	45
Tabla 6.	Corrientes obtenidas en la reducción de fructosa para la muestra 7.	47
Tabla 7.	Resultados obtenidos en la determinación de fructosa.	49
Tabla 8.	Corrientes obtenidas en la reducción de HMF para la muestra 9.	51
Tabla 9.	Resultados obtenidos en la determinación de HMF.	52
Tabla 10.	Resultados obtenidos en la determinación de humedad.	54
Tabla 11.	Resultados obtenidos en la determinación de pH.	55
Tabla 12.	Resultados obtenidos en la determinación de sacarosa.	58
Tabla 13.	Resumen de resultados de la determinación de parámetros fisicoquímicos.	59
Tabla 14.	Magnitudes de corriente de las señales de Cu (II) a partir de adiciones patrón.	62
Tabla 15.	Resumen de los cálculos realizados en la determinación de glucosa	64
Tabla 16.	Resumen de los cálculos realizados en la determinación de azúcares reductores en una muestra de miel por polarografía.	67
Tabla 17.	Magnitudes de corriente obtenidas en la primera determinación de azúcar reductor (glucosa) por polarografía.	80
Tabla 18.	Corrientes calculadas debidas a la presencia de Cu (II) con adiciones de diferentes volúmenes de disolución de glucosa.	82
Tabla 19.	Resumen de los cálculos realizados en la segunda determinación de azúcares reductores.	85
Tabla 20.	Resumen de los cálculos realizados en la tercera determinación de azúcares reductores.	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Las abejas a través de la historia.	3
Figura 2.	Reacción propuesta entre $\text{Cu}^{2+}$ y un azúcar reductor.	11
Figura 3.	Isomerización de la fructosa a glucosa por tautomería ceto-enólica.	11
Figura 4.	Tautómeros de la fructosa en disolución acuosa a temperatura ambiente.	13
Figura 5.	Mecanismo de formación del HMF	14
Figura 6.	Reacción de hidrólisis de la sacarosa en medio ácido o con enzima invertasa.	16
Figura 7.	Diagrama de un electrodo combinado de vidrio, con un electrodo de referencia de AgCl.	18
Figura 8.	Sistema clásico para realizar una titulación potenciométrica	19
Figura 9.	A) Sistema de electrodos de una celda conductimétrica. B) Celda de inmersión.	20
Figura 10.	Circuito usado para electrólisis a potencial controlado con una celda de tres electrodos.	22
Figura 11.	Señal de excitación para polarografía diferencial de impulsos.	24
Figura 12.	Curva de intensidad de corriente-potencial para polarografía diferencial de impulsos, donde $i_p$ es la corriente de pico y $E_p$ es el potencial de pico.	24
Figura 13.	Titulación Amperométrica a Potencial Impuesto. A) Curvas polarográficas durante la titulación de Cu(II) con disolución de Azúcares Reductores. Cada una de las curvas corresponde a una adición de azúcares reductores. Puede observarse como las diferencias de corriente van disminuyendo a medida que avanza la reacción. B) Curva de Titulación esperada para esta reacción. El punto de equivalencia se encuentra cuando la intensidad de corriente es igual a cero.	26
Figura 14.	Fenómeno de refracción	27
Figura 15.	Instrumentos para medir índices de refracción. A) Refractómetro de Abbe. B) Esquema general para un Refractómetro de sólidos totales el cual mide el índice de refracción y su escala presenta el contenido de sólido disueltos, para este caso, azúcares.	28
Figura 16.	Muestras de miel utilizadas en esta investigación, numeradas para su identificación.	31
Figura 17.	Titulación de 5.0 mL de disolución de Cu (II) con disolución de EDTA $0.0364 \text{ mol. L}^{-1}$	40
Figura 18.	Titulación de 1.3286 mmoles de $\text{Cu}^{2+}$ (5.0 mL de disolución $0.2657 \text{ mol.L}^{-1}$ ) con disolución de la muestra 7, marca "Naturamiel" de Mango Llano (522.0 mg en 100.0 mL)	41
Figura 19.	Polarogramas para la determinación de fructosa	46
Figura 20.	Magnitud de corriente contra cantidad de fructosa añadida para la muestra 7.	47
Figura 21.	Polarogramas para la determinación de HMF.	50
Figura 22.	Magnitud de corriente contra cantidad de HMF añadido para la muestra 7.	51

Figura 23.	Titulación de 1.5845 mmoles de Cu(II) (5.0 mL de disolución 0.3169 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de la muestra 5, marca "Miel del Colmenar" (Disolución de 50.0 mL preparada a partir de una alícuota de 20 mL de disolución de 1.0135g de miel en 100.0 mL)	56
Figura 24.	Polarogramas de determinación de concentración de Cu (II) por adiciones patrón.	62
Figura 25	Intensidad de corriente contra volumen de Cu (II) patrón añadido.	63
Figura 26.	Polarograma obtenido en la determinación de glucosa.	64
Figura 27.	Titulación de 0.9194 mmoles de Cu <sup>2+</sup> (3.0 mL de disolución 0.3038 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de glucosa 0.0200 mol.L <sup>-1</sup> (0.9008 g en 250.0 mL).	65
Figura 28.	Polarogramas de la determinación de azúcares reductores de la muestra 3 de miel.	66
Figura 29.	Titulación de 0.9114 mmoles de Cu <sup>2+</sup> (3.0 mL de disolución 0.3038 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de muestra de miel 3 (0.5252 g en 100.0 mL).	67
Figura 30.	Titulación de 1.519 mmoles de Cu <sup>2+</sup> (5 mL de disolución 0.3038 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de miel (525.2 mg en 100 mL)	68
Figura 31.	Polarograma de la disolución de tartrato de sodio y potasio como electrolito soporte.	76
Figura 32.	Polarogramas para la adición de una alícuota de disolución de Cu (II)	77
Figura 33.	Polarogramas para la adición de dos alícuotas de disolución de Cu (II)	78
Figura 34	Polarogramas de la primera determinación de azúcares reductores.	79
Figura 35.	Titulación de 1.5190 mmoles de Cu <sup>2+</sup> (5.0 mL de disolución 0.3038 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de glucosa 0.0202 mol.L <sup>-1</sup> (0.9102 g en 250.0 mL).	82
Figura 36.	Polarogramas de la segunda determinación de azúcares reductores.	85
Figura 37.	Titulación de 1.5190 mmoles de Cu <sup>2+</sup> (5.0 mL de disolución 0.3038 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de glucosa 0.0202 mol.L <sup>-1</sup> (0.9102 g en 250.0 mL).	86
Figura 38.	Polarogramas obtenido en la tercera determinación de azúcares reductores.	87
Figura 39.	Titulación de 1.5190 mmoles de Cu <sup>2+</sup> (5.0 mL de disolución 0.3038 mol.L <sup>-1</sup> ) con disolución de glucosa 0.0202 mol.L <sup>-1</sup> (0.9102 g en 250.0 mL).	88

## RESUMEN

La producción de miel y su exportación es una actividad creciente en El Salvador, es debido a esto que cobra mayor importancia el estudio de la calidad. Para tal finalidad, en esta investigación se han determinado diferentes parámetros fisicoquímicos (azúcares reductores, cenizas, fructosa, HMF, humedad, pH y sacarosa), para los cuales, a excepción de pH y humedad, se utilizan diferentes técnicas electroquímicas (potenciometría y titulaciones potenciométricas, conductimetría y polarografía diferencial de impulsos) como nuevas metodologías con mayores ventajas para realizar las determinaciones con respecto a los métodos convencionales. Todas las muestras de miel utilizadas para aplicar las metodologías cumplieron con la norma salvadoreña (NSO 67.19.01:08).

Adicionalmente, se propone una nueva metodología para la determinación de azúcares reductores aplicando una titulación amperométrica con ayuda de la polarografía diferencial de impulsos la cual, permitiría la determinación de más muestras de miel con menor cantidad de reactivo y con menor tiempo de análisis. Actualmente en esta investigación pudo reducirse la cantidad de disolución de  $\text{Cu}^{2+}$  utilizada en un 40%.

## 1. INTRODUCCIÓN

De manera general, el panorama a nivel mundial de los productos apícolas se encuentra dividido en países productores y países consumidores. El Salvador es un país que ha tenido incremento en su actividad productora de miel; en el año 2000 se produjeron 1,070 toneladas mientras que para el año 2010 se produjeron 2200<sup>(1)</sup>. Actualmente, el 80% de la producción nacional se exporta al continente europeo<sup>(2)</sup>.

Debido a que la miel es una fuente de divisas para El Salvador, ya que exporta la mayor parte de su producción, debe procurarse que este producto apícola cumpla con las normas de control de calidad de los países que lo reciben. Por otro lado, debe también garantizarse la calidad del producto para los consumidores en el país. Por lo expuesto anteriormente, es necesario actualizar la norma de calidad y además, presentar en ésta mejores métodos de análisis de control de calidad. Por ejemplo, en la actualidad la Norma Salvadoreña para Miel de Abejas no establece el contenido de cenizas máximo que debe de contener, a diferencia de las normas de países homólogos latinoamericanos como México y Argentina, productores y exportadores importantes a nivel mundial. El contenido de cenizas guarda relación con el tipo de miel, contenido en polen de la misma y sólidos insolubles.<sup>(3)</sup>

En esta investigación se implementaron nuevos métodos para la medición de parámetros fisicoquímicos en la miel, como la determinación del contenido de azúcares reductores, HMF (Hidroximetilfurfural), fructosa, contenido de cenizas, todos ellos a partir de la aplicación de técnicas electroquímicas, las cuales presentan ciertas ventajas con respecto a aquellas que se utilizan actualmente. Además, se determinarán los parámetros de pH y contenido de humedad. Este estudio será aplicado a mieles comerciales producidas en El Salvador y se comparará con los resultados de una miel producida en España, la cual ha sido galardonada por su calidad. Finalmente, se planteará una metodología básica para poder determinar el contenido de azúcares reductores utilizando la polarografía.

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1 HISTORIA DE LA APICULTURA.<sup>(4,5,6)</sup>

Inicialmente, la actividad del hombre con relación a las abejas era únicamente la caza de sus panales. En el periodo mesolítico, 10000 a 5000 años a.C., comienza la recolección de miel de colmenas silvestres y se piensa que en el Neolítico fue cuando aprendió a controlar las abejas y enjambres.

Se considera que el origen del cultivo de las abejas para obtener miel y productos derivados ocurrió hacia el año 4500 a.C. en una población llamada tartesios. Debido a que los fenicios mantenían relaciones comerciales con ellos, esto permite que la apicultura se expanda a otros pueblos del Oriente (babilonios, hebreos, egipcios entre otros).

En general, en los relatos de las sociedades más avanzadas de todas las épocas se han encontrado vestigios del conocimiento de las abejas. Los antiguos egipcios criaban abejas y comerciaban con la miel y la cera a lo largo de la costa oriental de África. La miel, además de ser un ingrediente básico de la momificación, desempeñó un papel importante ya que existen pinturas en las tumbas de los faraones que muestran actividades relacionadas con su extracción y almacenamiento. Inclusive, se encontraron recipientes con miel en una tumba egipcia sellada hace 35 siglos que conservaba su pureza y frescura, similar a miel recién extraída del panal.

De Egipto, la apicultura pasó a Grecia y después a Roma. Los griegos veneraron la apicultura ya que la diosa Artemisa era representada en las monedas con el cuño de una abeja en los años 480 a.C. De igual manera en Tracia también se dio el cuño de monedas con una abeja. Los romanos también practicaron la apicultura utilizando las propiedades medicinales de la miel. La expansión del imperio romano permitió que la apicultura se conociera en toda Europa.

En América se desarrolló la meliponicultura, ya que antes de su descubrimiento, el género *Apis* era inexistente. Las abejas del género *Meliponini* (sin aguijón) tuvieron un trato especial por los mayas. En esta época, la meliponicultura estaba más extendida que la apicultura en cualquier país de Europa.



Los mayas también tuvieron una deidad asociada con las abejas. Según algunas leyendas, el dios Ah Muzencab, “el que cuida la miel” es quien carga el cielo asegurando un buen flujo de néctar y así obtener una buena cosecha de miel.

De esta manera se observa que a lo largo de la historia de la humanidad la apicultura ha jugado un papel importante en el desarrollo de los pueblos. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.



Pintura rupestre encontrada en la Cueva de la Araña, España: Hombre extrayendo miel de un panal.



Imágenes de la práctica de la apicultura egipcia. Relieves de la tumba Pa-bu-sa en Tebas (Egipto)



Estela en Cobá (Quintana Roo, México), en la que se muestra al dios Ah-Muzencab, dios de las abejas.

Figura 1. Las abejas a través de la historia.

## 2.2 LA APICULTURA EN EL SALVADOR.

La actividad apícola en el Salvador se inició en la época colonial con la introducción de las abejas melíferas conocidas como “extranjeras”, de “castilla”, “negras” o “alemanas”, cuyo nombre científico es *Apis mellifera*.<sup>(7)</sup>

Ésta actividad creció en el siglo XIV y gran parte del siglo XX con una serie de limitantes, entre ellas, la carencia de leyes que regularan y controlaran la producción, la resistencia de algunos apicultores a la adquisición de nueva tecnología, la falta de uniformidad de material apícola y el inadecuado sistema de financiamiento.<sup>(7)</sup>

En 1976, con el fin de impulsar el desarrollo apícola y otras especies, el gobierno implementó un programa de especies menores. En 1980, este programa se fortaleció con el proyecto “Fomento de la Apicultura”, financiado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés). En 1984, el Banco Central de Reserva de El Salvador, abrió a través de bancos comerciales, una línea especial de créditos para la producción de miel.<sup>(7)</sup>

Ante la amenaza de la africanización de los apiarios, la FAO, en 1985, favoreció a los apicultores con el proyecto “Apoyo al Plan de Emergencia para el Control de Abeja Africanizada”, que capacitó adecuadamente a técnicos y productores de manera que el impacto en la producción fuera minimizado.

Con respecto a la organización de los apicultores, ésta comenzó en 1980 con la fundación de la Sociedad Cooperativa de Apicultores de El Salvador (SCAES). En 1987 se organizó la Asociación Cooperativa de Comercialización, Aprovisionamiento, Ahorro y Crédito de Apicultores “La Libertad”. A partir de 1996 algunas organizaciones no gubernamentales comenzaron a desarrollar proyectos apícolas en comunidades de escasos recursos y áreas de bosques.<sup>(7)</sup>

Ante la amenaza de la varroasis (enfermedad en las abejas producida por el acaro parásito varroa) en 1996, los sectores involucrados con la apicultura (productores, exportadores, Ministerio de Agricultura y Ganadería y Universidad de El Salvador) comenzaron a reunirse para analizar su impacto en el país. Para 1998, se formó la Comisión Nacional

Apícola de El Salvador (CONAPIS), una entidad jurídica, ajena a toda actividad política, religiosa o lucrativa, destinada a promover, fomentar y proteger la producción de miel de abeja y otros productos apícolas.<sup>(7)</sup>

En 1998 se creó el cluster (grupo geográficamente próximo de empresas interconectadas e instituciones asociadas) de apicultura, con el apoyo del Ministerio de Economía y por sugerencia de la empresa consultora Monitor de Estados Unidos, con el objetivo de promover el desarrollo económico, social y cultural del sector apícola.<sup>(8)</sup>

En relación a la producción; en la década de 1980, El Salvador fue el primer productor de miel en la región Centroamericana alcanzando su punto máximo en 1987 (3,408 TM). De 1987 a 1996, la producción cayó un promedio anual de 4.8% como consecuencia de los efectos de la deforestación, robo de colmenas y varroasis.<sup>(9)</sup> Posteriormente, en el año 2000 la producción de miel fue de únicamente 1,070 toneladas, ocurriendo un incremento constante hasta el año 2005 donde la producción fue de 2,508 toneladas. En años siguientes puede observarse que la producción ha tenido altos y bajos. El año 2007, El Salvador pierde definitivamente su lugar como primer productor de Centroamérica frente a Guatemala. Esta información se encuentra resumida en la Tabla 1.<sup>(1)</sup>

Tabla 1. Producción en toneladas de miel de abeja en los países de Guatemala y El Salvador, período: 2002 – 2010.<sup>(1)</sup>

País	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Guatemala	1,500	1,900	1,650	1,500	1,459	3,443	3,446	3,505	3,500
El Salvador	1,660	1,799	2,362	2,508	2,026	2,128	2,234	2,237	2,200

### 2.3 MIEL DE ABEJA

Según la Norma Salvadoreña para la Miel de Abejas (NSO 67.19.01:08) se define 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.<sup>(10)</sup>

## **2.3.1 CLASIFICACIÓN<sup>(10)</sup>**

### **2.3.1.1 POR SU ORIGEN BOTÁNICO**

- a) Miel de Flores: Es la obtenida principalmente de los néctares de las flores y se distinguen:
- Mieles monoflorales o uniflorales: Producto primordialmente de flores de la misma familia, género o especie y que posee características sensoriales, fisicoquímicas y microscópicas propias.
  - Mieles multiflorales, poliflorales o mil flores: Producto de la mezcla de néctares procedentes de varias especies de flores.
- b) Miel de mielato: Obtenida primordialmente a partir de secreciones de las partes vivas de las plantas o excreciones de insectos succionadores que se encuentran sobre ellas.

### **2.3.1.2 SEGÚN PROCEDIMIENTO DE COSECHA**

- a) Miel escurrida: Obtenida por escurrimiento de los panales desoperculados, sin larvas.
- b) Miel prensada: Obtenida por prensado de los panales sin larvas.
- c) Miel centrifugada: Obtenida por centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas

### **2.3.1.3 SEGÚN SU PRESENTACIÓN**

- a) Miel: Se encuentra en estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas.
- b) Miel en panal: Almacenada por las abejas en celdas operculadas de panales, construidos por ellas mismas que no contengan larvas y comercializada en panal entero o secciones.
- c) Miel con trozos de panal: Contiene uno o más trozos de panales con miel, exentos de larvas.
- d) Miel cristalizada o granulada: La que ha experimentado un proceso de solidificación como consecuencia de la cristalización de azúcares que puede ser natural o inducido.
- e) Miel cremosa o cremada: La que tiene una estructura cristalina fina y que pudo haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura.

#### **2.3.1.4 SEGÚN SU FORMA DE PRODUCCIÓN**

- a) Miel convencional: Obtenida por métodos tradicionales de producción.
- b) Miel orgánica/ecológica: La que en su fase de producción y procesamiento, cumple los requisitos de certificación para esta denominación.

#### **2.3.1.5 SEGÚN SU DESTINO**

- a) Miel para consumo directo.
- b) Miel para utilización en la industria: Esta responde a los requisitos de control de calidad exceptuando el índice de diástasa y contenido de HMF, los cuales podrán ser menor que 8 (en la escala de Shade) y mayor que 80 mg/Kg respectivamente.

#### **2.3.1.6 SEGÚN SU PROCESO**

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

### **2.3.2 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.<sup>(9)</sup>

#### **2.3.2.1 HUMEDAD**

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 en 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 susceptible al ataque microbiano. De hecho, el excesivo contenido de agua favorece la multiplicación de

levaduras osmofílicas; algunos autores consideran que este riesgo desaparece prácticamente cuando la miel tiene un contenido de humedad menor al 17 %.<sup>(3)</sup>

### **2.3.2.2 CARBOHIDRATOS (GLÚCIDOS)**

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.

La sacarosa está relacionada con el grado de maduración de la miel por lo que su valor debe ser menor al 5%; siendo el contenido máximo permitido por la mayoría de los países. Mieles con valores superior al 8% se consideran adulteradas por adición de azúcar de mesa (sacarosa) lo cual es penalizado por la ley. Sin embargo, su presencia no proviene únicamente de su adulteración, ya que puede deberse a las características de cada miel o de la falta de un adecuado tiempo de maduración en la cosecha.

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 miel recién extraída de los panales, aún existen transformaciones que continúan mientras las enzimas permanezcan 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.<sup>(11)</sup>

### **2.3.2.3 PROTEÍNAS**

Existen pequeñas cantidades de proteínas en la miel, la cual varía entre los diferentes tipos. 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%.<sup>(11)</sup>

### **2.3.2.4 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.<sup>(11)</sup>

#### **2.3.2.5 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.<sup>(11)</sup>

#### **2.3.2.6 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*).<sup>(11)</sup>

#### **2.3.2.7 MINERALES**

El contenido mineral o cenizas de la miel, guarda relación con el tipo de miel, contenido en polen y sólidos insolubles, este último aspecto relacionado con el método de extracción.

A pesar del bajo porcentaje de elementos minerales en la miel, puede considerarse importante desde el punto de vista alimenticio. El potasio, que constituye la tercera parte de las cenizas parece ser responsable de parte de las propiedades bactericidas atribuidas a la miel. Por otro lado, el contenido de cenizas ha sido también propuesto como parámetro indicador de adulteración con melazas.<sup>(3)</sup>

#### **2.3.2.8 SUSTANCIAS AROMÁTICAS**

En la miel se han aislado ésteres de ácidos alifáticos y aromáticos, aldehídos, cetonas y alcoholes.<sup>(11)</sup>

### **2.3.3 CONTROL DE CALIDAD<sup>(10)</sup>**

La Norma Salvadoreña para la Miel de Abejas, contempla ciertos requisitos los cuales se dividen en cuatro 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.

La norma no contempla en los parámetros fisicoquímicos el contenido de cenizas.

A continuación se presentarán exclusivamente los parámetros fisicoquímicos de interés para esta investigación.

#### **2.3.3.1. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS**

##### **2.3.3.1.1 AZÚCARES REDUCTORES**

Para la determinación de azúcares reductores se utiliza el método de Fehling. Según la Norma Salvadoreña, se aplica el método modificado de Lane-Eynon, el cual consiste en titular inicialmente una disolución de azúcar reductor conocida (glucosa al 1% p/v) lo que permite determinar el contenido de azúcares reductores al titular una muestra desconocida.

Como cualquier aldehído, las aldosas son fácilmente oxidadas. Existen varios reactivos para identificar a los azúcares reductores, como Tollens ( $\text{Ag}^+$  en  $\text{NH}_3$ ), Benedict ( $\text{Cu}^{2+}$  en citrato de sodio acuoso) y Fehling ( $\text{Cu}^{2+}$  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  $\text{Cu}^{2+}$  se reduce a  $\text{Cu(I)}$  y produce en el medio  $\text{Cu}_2\text{O}$ , un precipitado color rojo.<sup>(12)</sup>



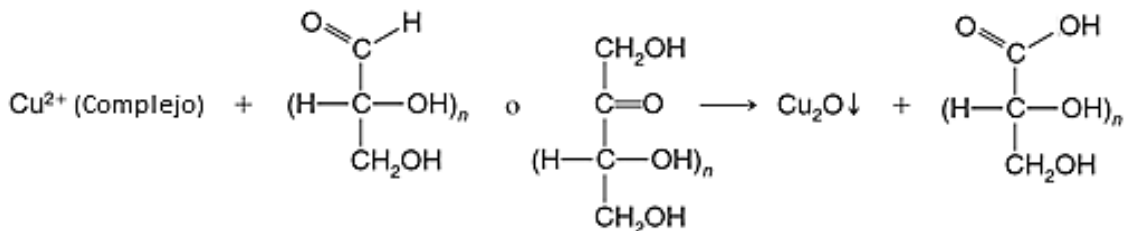


Figura 2. Reacción propuesta entre  $\text{Cu}^{2+}$  y un azúcar reductor.<sup>(12)</sup>

La fructosa también reduce al reactivo de Fehling, lo cual se debe a que la fructosa puede isomerizarse a una aldosa en disolución básica por tautomería ceto-enólica.

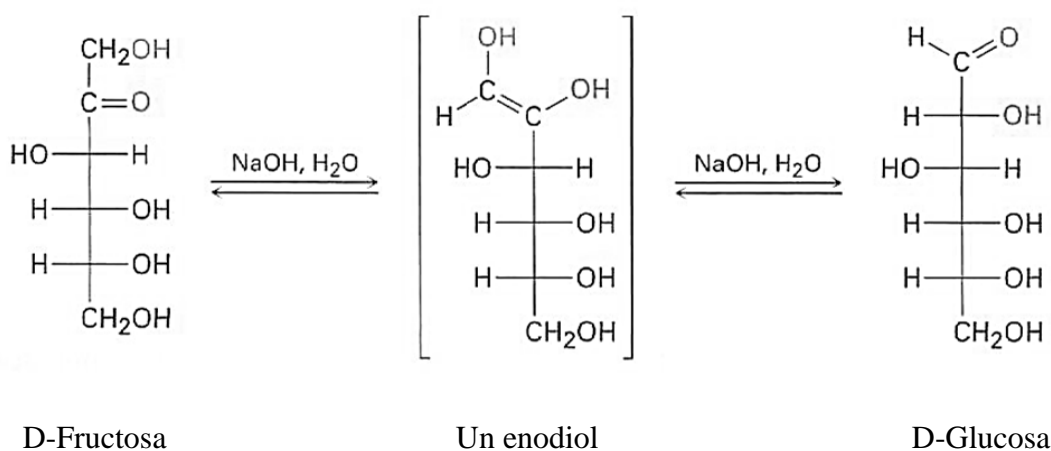


Figura 3. Isomerización de la fructosa a glucosa por tautomería ceto-enólica.<sup>(12)</sup>

La Norma Salvadoreña para Miel de Abeja 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.

### 2.3.3.1.2 CENIZAS

De manera general, la conductividad eléctrica está relacionada fundamentalmente con el contenido en sales minerales, ácidos orgánicos, proteínas y posiblemente con compuestos como azúcares y polioles de la miel. Permite estimar su origen (floral o de mielada) y orientar cual ha sido la fuente del néctar.<sup>(3)</sup>

Actualmente, ha sido descrita la correlación existente entre la conductividad eléctrica de la miel y su contenido en cenizas, lo que ha llevado a proponer la determinación del contenido

en sales minerales a través de la conductividad eléctrica, de manera más rápida y sencilla.<sup>(3)</sup>, utilizando una ecuación que establece la relación lineal entre el porcentaje de cenizas y la conductividad específica:

$$X = 1.74A + 0.14$$

en donde “X”, es la conductividad específica ( $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y “A”, el porcentaje de cenizas.

Los valores de la pendiente (1.74) y de la ordenada al origen (0.14) se obtuvieron luego de realizar un estudio de la correlación entre el porcentaje de cenizas (determinado por el residuo de la calcinación de una masa de miel conocida) y la conductividad eléctrica medida de una disolución acuosa de miel.<sup>(13)</sup>

La Norma Salvadoreña para Miel de Abeja no contempla el contenido de cenizas en sus requisitos. Sin embargo, si tomamos en cuenta la Norma Mexicana por ser el país con los principales antecedentes de este trabajo, se establece un porcentaje máximo del 0.60%.

### **2.3.3.1.3 FRUCTOSA**

La fructosa, también conocida como levulosa o azúcar de frutas, es un hidrocarburo de fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  con una masa molar de  $180.19 \text{ g mol}^{-1}$ . 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.<sup>(14)</sup> Es la cetosa más abundante y el azúcar más dulce conocido. Se encuentra enlazado a la glucosa en la sacarosa o azúcar común.<sup>(15)</sup>

La determinación de fructosa se llevará a cabo a través de la polarografía diferencial de impulsos, tomando en cuenta la señal de reducción. La determinación se realizará a través del método de adiciones patrón, con una disolución de fructosa de concentración conocida.<sup>(11)</sup>

La Norma Salvadoreña establece en sus requisitos una relación fructosa/glucosa mayor o igual que 1. Debido a que en este caso no se llevará a cabo la determinación de glucosa, no será posible comparar este parámetro con el valor límite. Sin embargo, podría plantearse como un parámetro cuantificable en la miel para formar parte en el futuro, de los requisitos en el control de calidad.

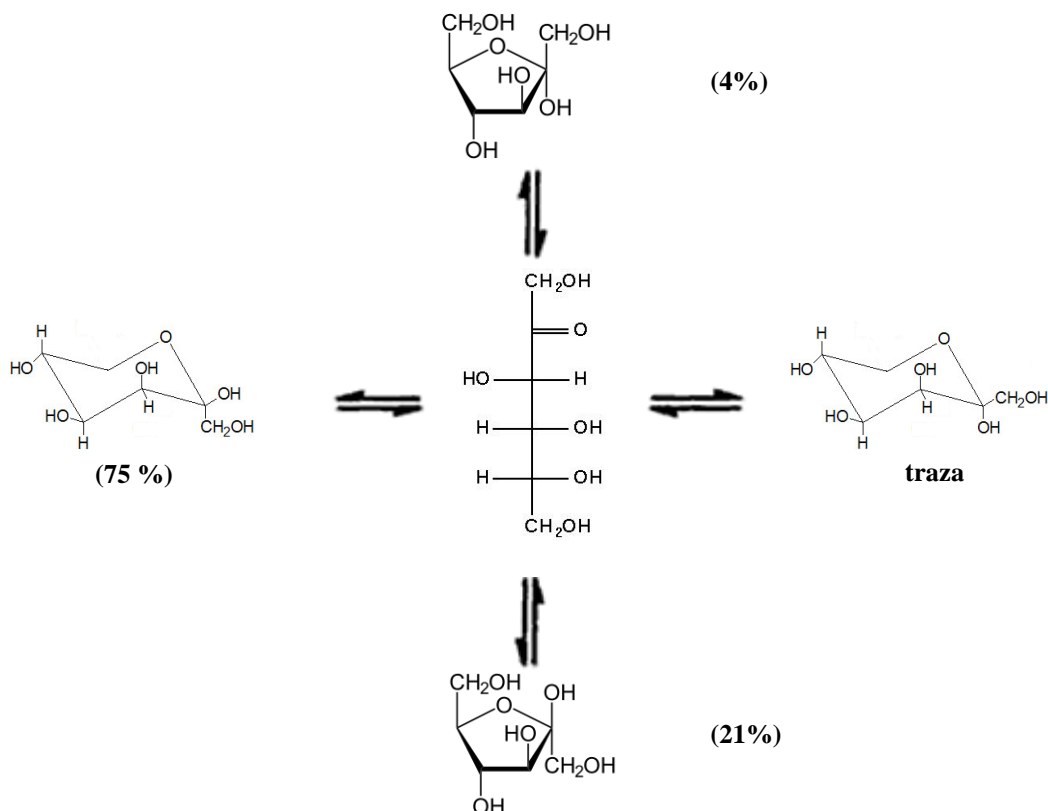


Figura 4. Tautómeros de la fructosa en disolución acuosa a temperatura ambiente.<sup>(15)</sup>

#### 2.3.3.1.4 HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

El 5-hidroximetilfurfural es un compuesto heterocíclico de fórmula molecular  $C_6H_6O_3$ , con una masa molar de  $126.11 \text{ g mol}^{-1}$ . Su punto de fusión es de  $31.5^\circ\text{C}$ . Es soluble en agua, metanol, etanol, acetona, entre otros. Puede presentarse como un sólido cristalino o líquido amarillento oscuro. Es ligeramente volátil por lo que debe conservarse en refrigeración.<sup>(11)</sup>

Los productos azucarados pueden deteriorarse por el calor al almacenarse, por lo que la miel también es susceptible a estos cambios que afectan sus propiedades organolépticas. Tanto la glucosa como la fructosa (con el tiempo y temperatura necesarios) pueden oxidarse, mediante el mecanismo presentado en la Figura 5, en HMF, un compuesto sin valor nutricional.<sup>(11)</sup>

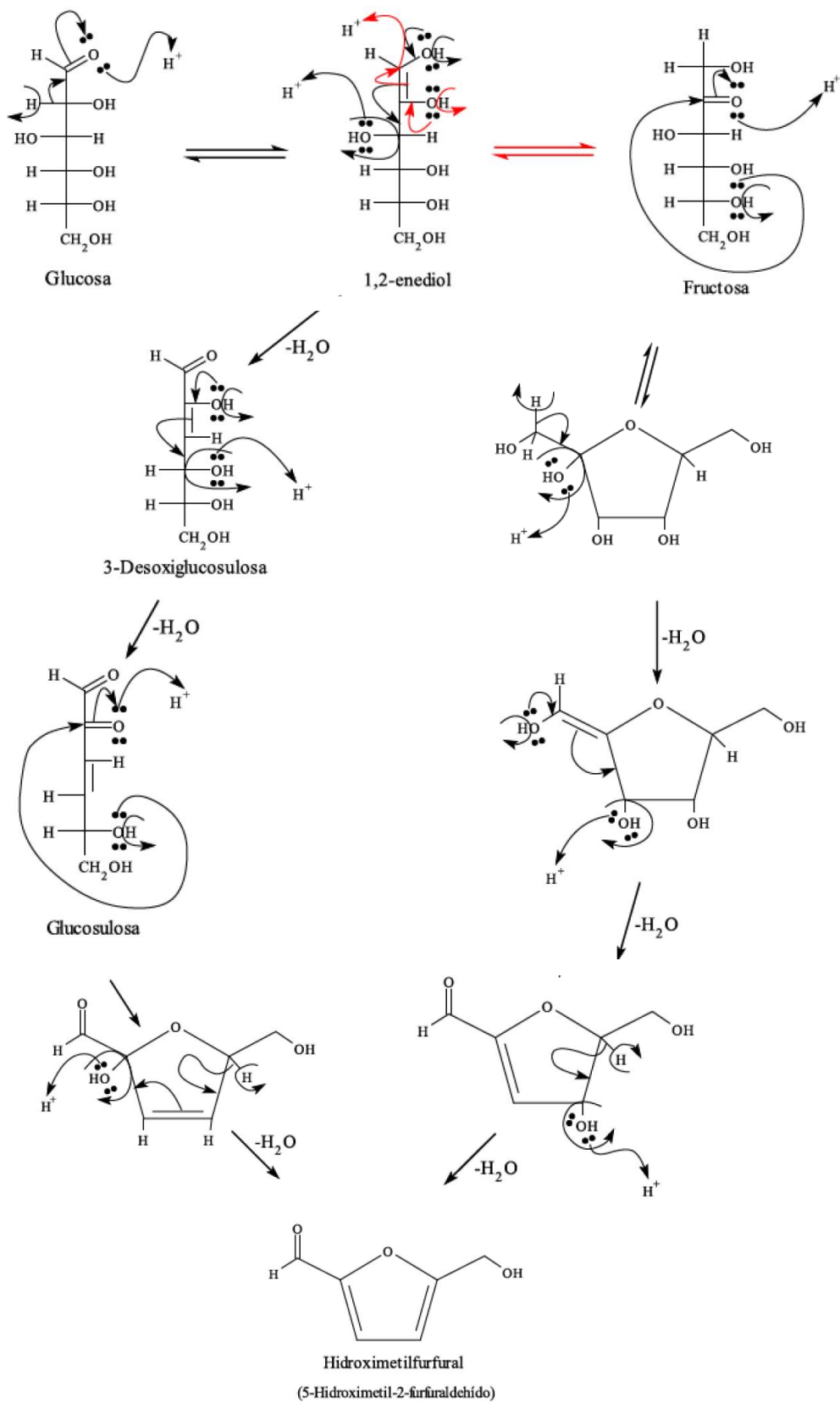


Figura 5. Mecanismo de formación del HMF<sup>(16)</sup>

Por lo tanto, una miel con niveles elevados de HMF pierde sus propiedades naturales y calidad nutricional. En consecuencia, el contenido de HMF en la miel se considera como un criterio determinante de calidad.<sup>(11)</sup>

Al igual que con la fructosa, la determinación del HMF se realizará por el método de adiciones patrón utilizando las corrientes de la señal de reducción a través de técnica de polarografía diferencial de impulsos.<sup>(5)</sup>

La miel, como producto natural, no contiene HMF; la presencia, menor o mayor de HMF se atribuye principalmente al manejo y almacenamiento, es decir, a la manipulación humana del producto y por tanto, de la calidad de manufactura.

La Norma Salvadoreña establece un nivel máximo de 40 ppm de HMF después del procesamiento. En mieles procedentes de regiones declaradas de ambiente tropical, así como sus mezclas, el nivel máximo permitido es de 80 ppm.

#### **2.3.3.1.5 HUMEDAD**

El método se basa en la medición de la densidad aparente, dada por la concentración de sólidos disueltos y en suspensión; generalmente se emplea para tal efecto un refractómetro con escala en grados Brix. Estos grados representan el porcentaje en peso de sacarosa químicamente pura en disolución de agua destilada a 293 K (20°C).<sup>(17)</sup> Para obtener el valor de humedad debe restarse al 100% el valor de los grados Brix que hacen referencia a los sólidos disueltos y así tener el valor que corresponde únicamente al agua (humedad). Deberán hacerse correcciones si las mediciones no se realizan a 20°C.

#### **2.3.3.1.6 SACAROSA**

La sacarosa, o azúcar de mesa ordinaria, es el compuesto orgánico puro más abundante en el mundo. Puede obtenerse del azúcar de caña (20% en peso) o de la remolacha azucarera (15% en peso).<sup>(15)</sup>

Es un disacárido de fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$  con un peso molecular de  $342.20 \text{ g mol}^{-1}$ . Es un sólido blanco que puede encontrarse en diversas formas, se descompone a 186°C y posee una solubilidad en agua a 25°C de 200g/100 mL.<sup>(18)</sup> Produce un equivalente de glucosa y un equivalente de fructosa en la hidrólisis como se observa en la Figura 6. Esta

mezcla 1:1 de glucosa y fructosa hace referencia al azúcar invertida debido a que el signo de la rotación óptica se invierte, o cambia, durante la hidrólisis de la sacarosa ( $[\alpha]_D=+66.5$ ) a la mezcla de glucosa/fructosa ( $[\alpha]_D=-22.0$ ).<sup>(17)</sup>

En este caso, la hidrólisis se llevó a cabo con una disolución de HCl diluida.

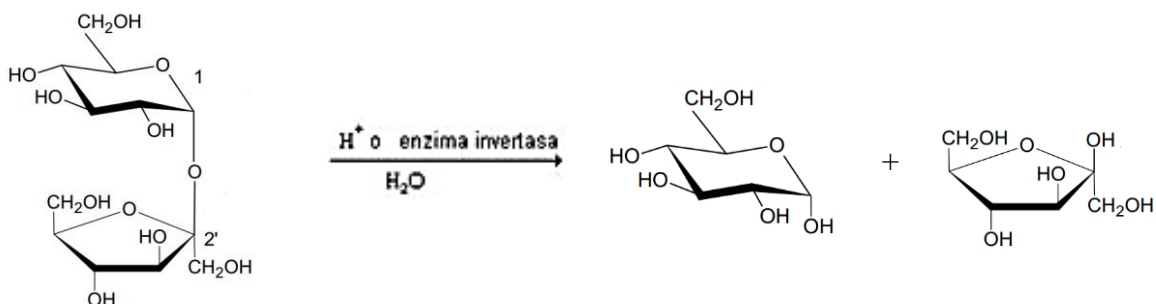


Figura 6. Reacción de hidrólisis de la sacarosa en medio ácido o con enzima invertasa.<sup>(19)</sup>

Una vez que se ha realizado la hidrólisis, se determinaron los azúcares reductores. Es de esperar que la cantidad de éstos se vea aumentada debido a que se tendrá más glucosa y fructosa proveniente de la hidrólisis (en la determinación sin hidrólisis, la sacarosa no participa ya que no es un azúcar reductor por no tener su carbono anomérico libre).

La Norma Salvadoreña establece un máximo de sacarosa del 5% para miel de flores, mientras que para miel de mielato y sus mezclas un máximo del 10%.

## 2.4 TÉCNICAS UTILIZADAS.

### 2.4.1 ELECTROQUÍMICA<sup>(16)</sup>

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.

El dispositivo experimental que se utiliza en electroquímica está constituido por un sistema electrodo 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 contraelectrodo y electrodo de referencia. 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 potenciostato.

Al utilizar este dispositivo de tal forma que se imponga de manera controlada un potencial al electrodo de trabajo, se pueden 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 interfase electrodo-disolución; bajo condiciones tales como agitación constante y 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 electroactiva.

#### **2.4.1.1 POTENCIOMETRÍA Y TITULACIONES POTENCIOMÉTRICAS**

La potenciometría se basa en la medición del potencial electroquímico. El potencial de un electrodo por el cual fluye una corriente  $i$  conocida (que puede ser nula), es función de la concentración de las sustancias electrolizadas o las especies con propiedades redox presentes. A través de la medición de potenciales puede conocerse la concentración de una sustancia o sus variaciones durante una reacción química.<sup>(20)</sup>

En esta investigación, la potenciometría fue utilizada en las determinaciones de pH y de azúcares reductores.

Para la determinación de pH se utiliza un pHmetro, el cual posee un electrodo combinado en el que se encuentran en un mismo dispositivo el electrodo indicador (membrana de vidrio) y el electrodo de referencia (electrodos de Ag/AgCl interno y externo).<sup>(21)</sup>

La membrana está conformada por una red irregular de tetraedros de silicatos ( $\text{SiO}_4$ ) unida mediante un átomo de oxígeno. Coordinados a los átomos de oxígeno se encuentran iones tales como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Los cationes monovalentes, principalmente el  $\text{Na}^+$  pueden moverse lentamente a través de la red del silicato. La superficie de la membrana se hincha

cuando absorbe agua, permitiendo que se dé un equilibrio de intercambio iónico entre los iones  $H^+$  y los cationes metálicos del vidrio.<sup>(21)</sup>

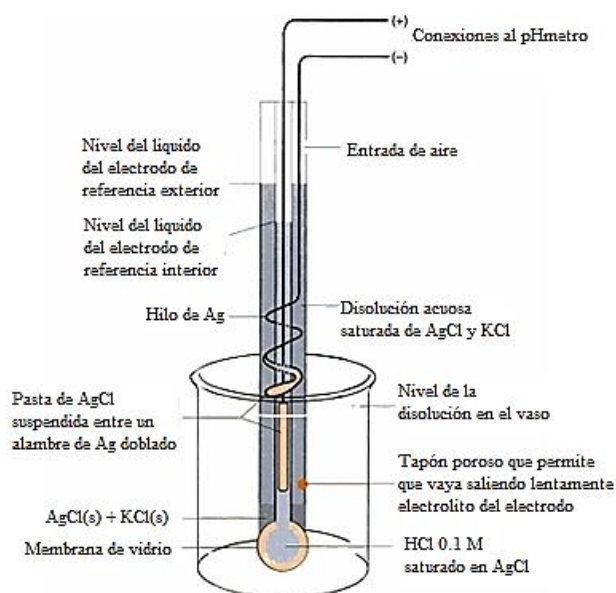


Figura 7. Diagrama de un electrodo combinado de vidrio, con un electrodo de referencia de AgCl.<sup>(21)</sup>

La diferencia de potencial entre los electrodos interior y exterior de Ag/AgCl de la Figura 7 depende de la concentración de cloruro de cada compartimiento y de la diferencia de potencial a través de la membrana de vidrio. Como la concentración de cloruro es constante en cada compartimiento electrodo, y la concentración de  $H^+$  también es constante en el interior de la membrana de vidrio, el único factor variable es el pH de la disolución de analito exterior a la membrana de vidrio.<sup>(21)</sup>

La respuesta de los electrodos de vidrio a 25°C se describe por la siguiente ecuación:

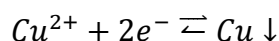
$$E = constante + \beta(0.059)\log[H^+]$$

El valor de la eficacia electromotriz ( $\beta$ ), es próxima a 1.00 (típicamente  $>0.98$ ). La medición de  $\beta$  y la constante se realiza al calibrar el electrodo con disoluciones buffer estándar.

En el caso de la determinación de azúcares reductores se realiza una valoración potenciométrica. Para dicha valoración se utiliza un electrodo indicador de Cu y como de referencia uno de calomel saturado (ECS).



En la titulación de Fehling, se está frente a un sistema rápido<sup>(20)</sup>. El electrodo de cobre se encuentra introducido en la disolución de iones  $\text{Cu}^{2+}$ . La reacción indicadora es:



por lo tanto, el potencial de equilibrio es:  $E_{eq} = E_0 + \frac{RT}{nF} \log[\text{Cu}^{2+}]$

Esto significa que el electrodo de cobre es indicador de la actividad de los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , pudiendo seguir dicha actividad durante la titulación potenciométrica<sup>(20)</sup>.

Conociendo que en la reacción entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y el azúcar reductor, el  $\text{Cu}^{2+}$  pierde un electrón al pasar a  $\text{Cu(I)}$  en el  $\text{Cu}_2\text{O}$  y el azúcar reductor gana 5 electrones, la estequiometría de la reacción debe de ser 5:1.<sup>(11)</sup> El potencial en el punto de equivalencia estará dado por la siguiente expresión:

$$E_{P.E.} = \frac{5E_{Az.Red.}^{0'} + E_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu(0)}}^{0'}}{6}$$

Por lo que el potencial en el punto de equivalencia está dado en 5/6 del cambio de potencial con respecto al potencial inicial en la curva potenciométrica.

Con respecto a la instrumentación, la diferencia de potencial se mide con un milivoltímetro.

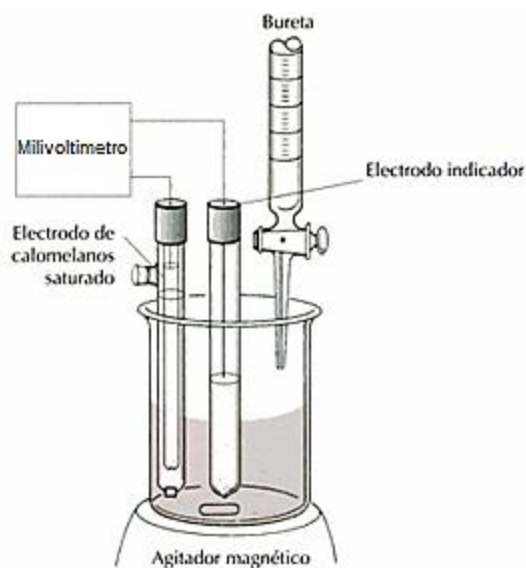


Figura 8. Sistema clásico para realizar una titulación potenciométrica<sup>(22)</sup>

### 2.4.1.2 CONDUCTIMETRÍA<sup>(23)</sup>

La conductimetría se basa en el hecho de que las soluciones electrolíticas se comportan como conductores eléctricos donde los iones en disolución son los responsables del transporte de cargas. Como un conductor obedece a la ley de Ohm, dicha conducción se verifica en el volumen de disolución delimitado por la distancia entre dos electrodos de posición fija. Esta condición experimental se cumple en arreglos denominados celdas conductimétricas, como se observa en la Figura 9.

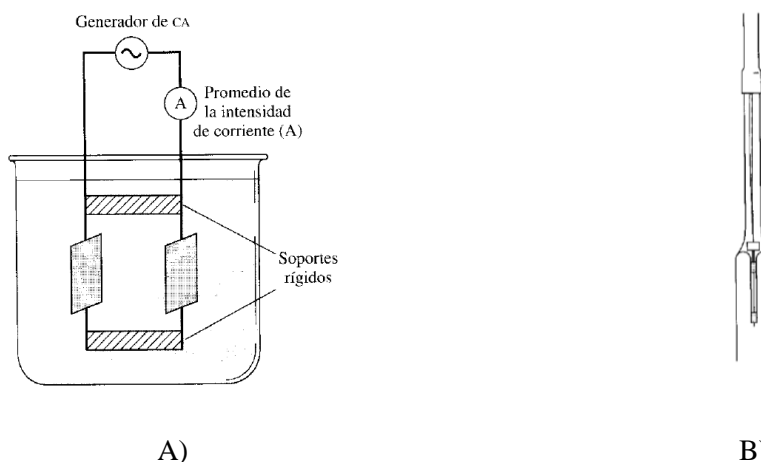


Figura 9. A) Sistema de electrodos de una celda conductimétrica. B) Celda de inmersión.<sup>(24)</sup>

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

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

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

La relación longitud/área es característica de cada arreglo de electrodos y se denomina constante de celda conductimétrica,  $k_{\text{celda}}$ . Es muy importante que el valor de  $k_{\text{celda}}$  se mantenga constante durante un experimento si se desea precisión en los resultados.

Se define la conductancia (L) como el inverso de la resistencia de la disolución ( $L=R^{-1}$ ), y la conductividad específica ( $\chi$ ) como el inverso de la resistividad,  $\chi=\rho^{-1}$ . Las unidades de la conductancia están dadas en siemens ( $S = \Omega^{-1}$ ), y la conductividad específica en S cm.

$$L = \frac{1}{R} = \frac{\chi}{k_{\text{celda}}}$$

En mediciones rutinarias, la constante de celda se determina indirectamente midiendo la resistencia cuando la celda conductimétrica contiene una disolución estándar de conductividad conocida. La relación entre la conductividad y la concentración se define por medio de la conductividad molar o equivalente, dependiendo de las unidades usadas para expresar la concentración, como se describe a continuación.

$$\Lambda_M = \frac{\chi}{C_0} \quad \Lambda_{eq} = \frac{\chi}{zC_0}$$

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

En esta última ecuación resulta conveniente expresar la concentración en  $\text{mol cm}^{-3}$  o en  $\text{eq cm}^{-3}$ , de tal manera que se simplifiquen las unidades de  $\Lambda$ . Es importante reiterar que el equivalente en conductimetría, a diferencia del equivalente químico, sólo depende de la carga del ión,  $z$ , en cuestión, de tal manera que se construye la siguiente correspondencia:

$$1 \text{ eq} = 1 \frac{\text{mol}}{z}$$

En síntesis, la relación de la resistencia eléctrica de una disolución electrolítica y la concentración de soluto iónico en disolución es la siguiente:

$$\frac{1}{R} = L = \frac{z\Lambda_M C_0}{k_{\text{celda}}}$$

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

$$\frac{1}{R} = L = \frac{\Sigma z\Lambda_M C_0}{k_{\text{celda}}}$$

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

$$\Lambda = \frac{Lk_{\text{celda}}}{C_0 z} = \frac{\chi}{zC_0}$$

### 2.4.1.3 POLAROGRAFÍA.<sup>(16)</sup>

Dentro de los métodos electroquímicos con mayor aplicación al análisis químico se encuentra la voltamperometría, la cual consiste en la imposición al electrodo de trabajo, de una variación lineal de potencial y determinación de la corriente correspondiente, lo que permite obtener directamente la curva de intensidad de corriente en función del potencial del electrodo, también conocida como voltamperograma.

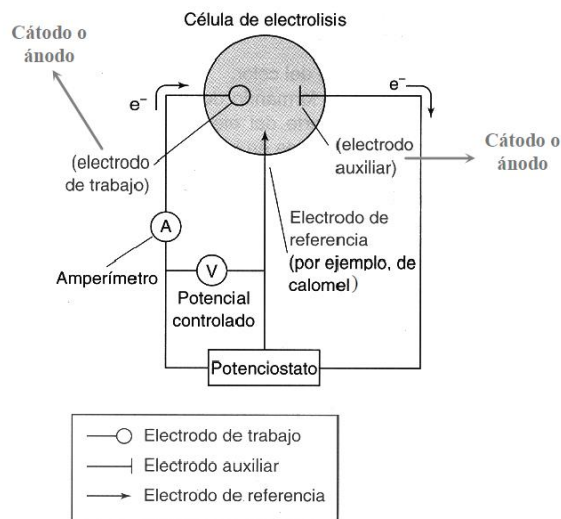


Figura 10. Circuito usada para electrólisis a potencial controlado con una celda de tres electrodos.<sup>(16)</sup>

#### 2.4.1.3.1 POLAROGRAFÍA CLÁSICA<sup>(25)</sup>

La polarografía es una forma de electroálisis en la que el electrodo de trabajo es un microelectrodo especial, un electrodo de gota de mercurio (EGM); se registra una gráfica de intensidad de corriente-potencial, llamada polarograma. La polarografía es un caso particular de la voltamperometría. En el caso más simple, la medida polarográfica se basa en el registro de la corriente que fluye a través del electrodo de gota de mercurio, como electrodo de trabajo, durante una variación lineal (directa) del potencial (polarografía clásica o de corriente directa, DCP).

La corriente que fluye a través del electrodo de trabajo tiene dos componentes, la corriente farádica  $i_F$ , que depende de la oxidación o reducción del analito, y la corriente capacitiva  $i_C$ , que se debe a la carga y descarga de la doble capa electroquímica en la superficie del electrodo de trabajo.

La corriente de difusión  $i_D$  es el valor máximo para  $i_F$ , el cual se obtiene cuando todo el analito, transportado por difusión a la superficie de la gota de mercurio, se oxida o reduce. La relación entre la corriente de difusión (también llamada corriente límite de difusión) y la concentración del analito esta descrita por la ecuación de Ilkovic.

$$i_D = 0.607nD^{1/2}m^{2/3}t_d^{1/6}C_a$$

Donde “ $i_D$ ” es la corriente de difusión, “ $n$ ” el número de electrones intercambiados en la reacción redox, “ $D$ ” el coeficiente de difusión, “ $m$ ” el flujo del mercurio, “ $t_d$ ” el tiempo de goteo y “ $C_a$ ” la concentración del analito.

En condiciones experimentales constantes, la ecuación de Ilkovic toma la forma general para las curvas voltamperométricas:

$$i_D = nk^D C_a$$

donde  $k^D$  es la constante de difusión convectiva.

#### 2.4.1.3.2 POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSO.

Es el más común y eficiente método de impulsos para determinaciones cuantitativas. En este método la señal de excitación consisten de un incremento en escalera de potencial (escalón de potencial  $\Delta E_{step}$ ), al cual se le aplica en sucesión periódica, impulsos de potencial constante (amplitud del impulso  $\Delta E_A$ ). La superimposición está sincronizada con el tiempo de goteo y con la superficie del electrodo. En la Figura 11 se muestra la técnica de medición para este tipo de polarografía.<sup>(16)</sup>

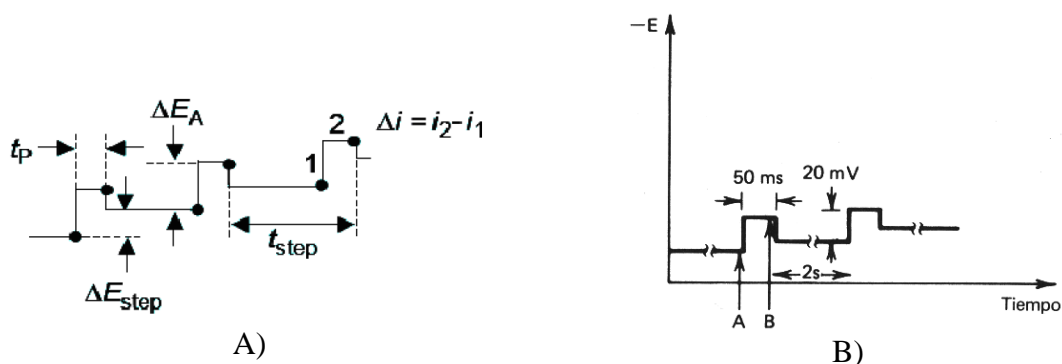


Figura 11. Señal de excitación para polarografía diferencial de impulsos.<sup>(11)</sup>

La corriente se mide dos veces para cada gota de mercurio: primero antes de cada impulso (punto 1 de la Figura 11 A) y después al final del impulso  $t_p$  (punto 2 de la Figura 11 A).

Las diferencias entre las mediciones ( $\Delta i$ ) se grafican contra el potencial y producen polarogramas en forma de picos. De esta manera también se reduce la contribución de la corriente capacitiva y por lo tanto se aumenta la sensibilidad. El límite de detección para este método es de  $10^{-7} - 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ . En la Figura 12 se muestra el tipo de curvas de intensidad de corriente-potencial que se obtienen con la polarografía diferencial de impulsos: la altura máxima de la señal es proporcional a la concentración de la especie que se determina.<sup>(16)</sup>

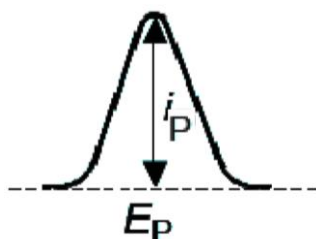


Figura 12. Curva de intensidad de corriente-potencial para polarografía diferencial de impulsos, donde  $i_p$  es la corriente de pico y  $E_p$  es el potencial de pico.<sup>(16)</sup>

La ecuación de intensidad de corriente para esta técnica es:

$$i_p = \frac{nF^2}{4RT} AC_a \Delta E_A \sqrt{\frac{D}{\pi t_p}}$$

Donde " $i_p$ " es la corriente de pico, " $n$ " el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica, " $F$ " la constante de Faraday, " $R$ " la constante de los gases, " $T$ " la temperatura absoluta, " $A$ " el área de superficie del electrodo, " $\Delta E_A$ " la amplitud del impulso,  $C_a$  la concentración del analito y  $t_p$ , el tiempo de la corriente muestreada por pulso.<sup>(25)</sup>

#### 2.4.1.4 TITULACIÓN AMPEROMÉTRICA A POTENCIAL IMPUESTO.

La titulación amperométrica a potencial impuesto ha sido utilizada en la propuesta de nueva metodología para la determinación de azúcares reductores.

En este método, se miden los cambios de la intensidad de corriente manteniendo fijo el potencial en el electrodo de trabajo.<sup>(24)</sup> En este caso en particular, se utilizan los polarogramas de diferencial de impulsos de la reducción de Cu (II) y se mide la corriente del pico, el cual aparece al mismo potencial.

En la metodología propuesta, la titulación se realizó fuera de la celda electroquímica del polarógrafo y se toman alícuotas para medir la variación de la concentración durante el transcurso de la reacción de Cu(II) con los azúcares reductores a través de las medidas de intensidad de corriente (Figura 13 A). En las mediciones, a medida que se añaden las alícuotas de Cu(II) se observa un aumento en la corriente del pico; sin embargo, dicho aumento va siendo más pequeño con la adición de cada alícuota (cada alícuota corresponde a una adición de volumen de azúcar reductor en la titulación). Estas diferencias entre las señales se deberán a la concentración de Cu(II) que se encuentra en esos momentos en la titulación, por lo cual son las que se utilizarán al plantear la curva de la titulación amperométrica.

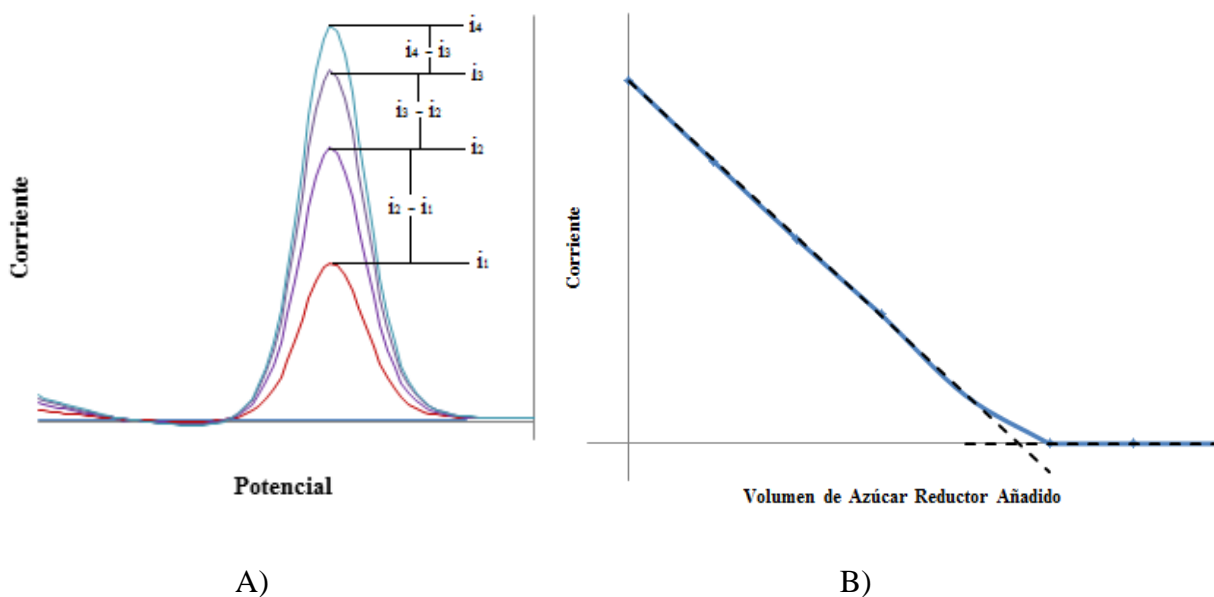


Figura 13. Titulación Amperométrica a Potencial Impuesto. A) Curvas polarográficas durante la titulación de Cu(II) con disolución de Azúcares Reductores. Cada una de las curvas corresponde a una adición de azúcares reductores. Puede observarse cómo las diferencias de corriente van disminuyendo a medida que avanza la reacción. B) Curva de Titulación esperada para esta reacción. El punto de equivalencia se encuentra cuando la intensidad de corriente es igual a cero.

Debido a que se miden diferencias de corriente, en el punto de equivalencia, todo el Cu(II) de la disolución habrá reaccionado con los azúcares reductores. Por lo tanto, al tomar una nueva alícuota y trazar el polarograma se obtendrá que la intensidad de corriente es la misma con respecto a la medición anterior, por lo que la diferencia en la intensidad de

corriente de ambas mediciones será de cero. En la Figura 13 B se observa la curva de titulación amperométrica esperada.

En una titulación amperométrica, el punto de equivalencia se obtiene en el punto en el cual se intersectan las dos líneas rectas de la curva.<sup>(26)</sup> Para este caso, en este mismo punto la diferencia de intensidad de corriente es igual a 0. Por lo que si se obtienen algunos puntos (4 en este trabajo) de la gráfica, puede utilizarse la relación lineal entre la concentración y la corriente, determinar la ecuación de la recta que expresa dicha relación y determinar el valor del volumen de disolución de azúcares reductores que habría de ser añadido para que el valor de intensidad de corriente sea igual a cero.

## 2.4.2 REFRACTOMETRÍA

La refracción consiste en la desviación de la trayectoria que sufre un haz de radiación monocromática al pasar desde el vacío a otro medio material de distinta densidad.<sup>(26)</sup>

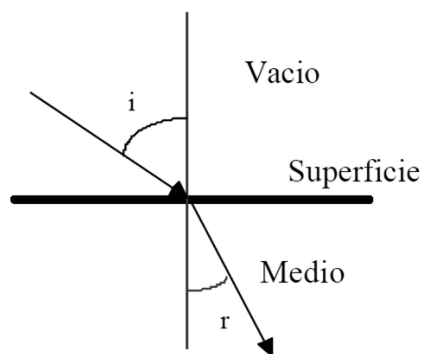


Figura 14. Fenómeno de refracción<sup>(26)</sup>

En este fenómeno se cumple la ley de Snell, que define al índice de refracción (n):

$$n = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$$

donde “i” y “r” son los ángulos de incidencia y refracción respectivamente, que forma el haz con la normal a la superficie de separación.

A su vez, la interacción entre la radiación y el medio ocasiona una reducción en la velocidad de la luz mientras ésta avanza a través del medio. Este fenómeno está relacionado con el índice de refracción por:



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

donde “c” y “v” son respectivamente, las velocidades de propagación de la radiación en el vacío y en el medio. Por lo tanto, el índice de refracción está definido por:

$$n = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r} = \frac{c}{v}$$

El índice de refracción del medio depende de la temperatura.<sup>(26)</sup>

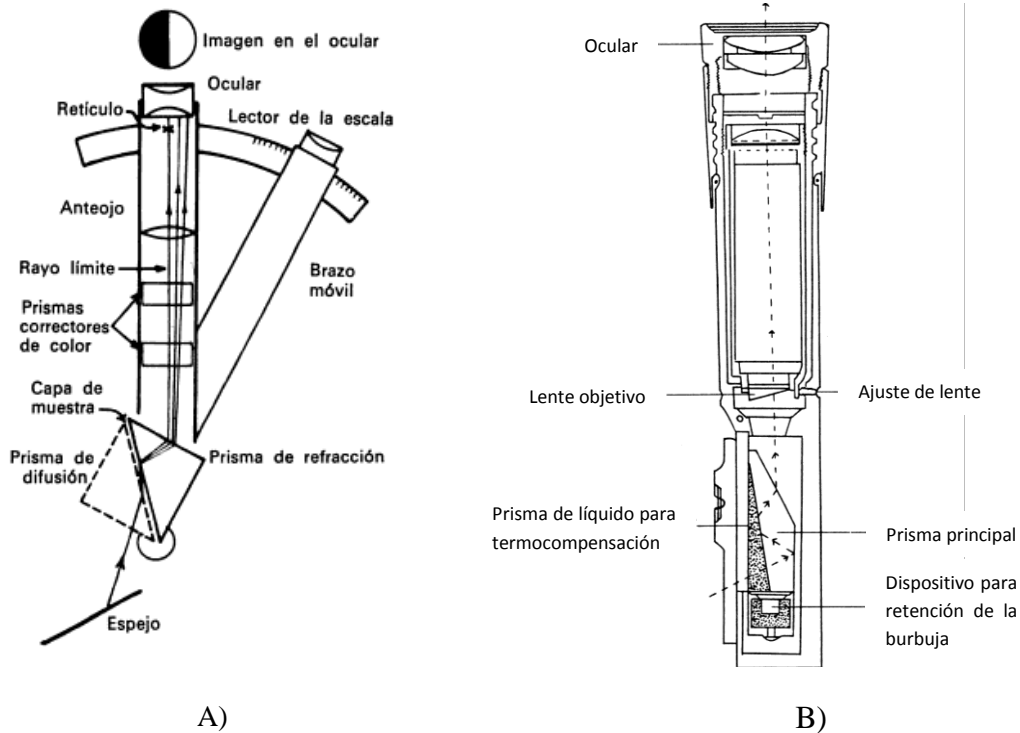


Figura 15. Instrumentos para medir índices de refracción. A) Refractómetro de Abbe.<sup>(27)</sup>  
 B) Esquema general para un Refractómetro de sólidos totales el cual mide el índice de refracción y su escala presenta el contenido de sólido disueltos, para este caso, azúcares.<sup>(28)</sup>

Uno de los instrumentos más usados en refractometría es el refractómetro de Abbe (Figura 15 A); en este instrumento, el líquido problema se coloca formando una película muy delgada entre dos prismas, y la radiación rasante incide y se refracta en el prisma de refracción. Recorriendo con un anteojo la cara superior de este prisma, se puede encontrar el ángulo de emergencia del rayo límite. Para ello, el prisma va montado de tal modo que puede girar alrededor de un punto central de su superficie, siendo sometido a rotación hasta

que se hace coincidir la línea de separación de las regiones clara y oscura que se observa a través del antejo con el retículo del ocular. El aparato lleva una escala calibrada en la que se lee directamente el valor del índice de refracción.<sup>(27)</sup>

En muchos casos, el índice de refracción de las mezclas binarias varía linealmente con la composición de las mismas, aunque siempre será conveniente comprobar esta actividad mediante la construcción de curvas de calibrado.<sup>(27)</sup> Gracias a esta propiedad puede plantearse una relación entre el índice de refracción y la fracción en masa de sacarosa (concentración), lo que permite tener refractómetros de mano con escala de fracción en masa de azúcar (Grados Brix).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO.

##### 3.1.1 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO.

- Agitadores de vidrio y magnéticos.
- Balones volumétricos de 5.0, 10.0, 100.0 y 200.0 mL.
- Conductímetro “644 Metrohm”.
- Matraz Erlenmeyer de 50 mL.
- Micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ L.
- pH metro “713 Metrohm”.
- Pipetas volumétricas de 2.0, 4.0 y 5.0 mL.
- Polarógrafo “PRG5”, marca “Tacussel”
- Refractómetro “Atago N-3E”.
- Vasos de precipitado de 5, 10, 20 y 50 mL.
- Balanza analítica Mettler AE240.
- Buretas de 50 y 25 mL.
- Electroodos: gota de mercurio, platino, calomel y de cobre.
- Milivoltímetro “Tacussel” S6N.
- Parrilla de agitación y calentamiento “Corning”.
- Pinzas para bureta, de sostén y de extensión.
- Polarógrafo 797 VA COMPUTRACE, marca “Methrom”.
- Termómetro Branna de -10°C a 110°C

##### 3.1.2 REACTIVOS

- Agua destilada y desionizada.
- Ácido Clorhídrico, grado reactivo analítico.
- EDTA para análisis, grado reactivo analítico, Merck.
- Glucosa, grado alimenticio.
- Sulfato de cobre pentahidratado, grado reactivo analítico. Analityka.
- Tartrato de sodio y potasio, grado reactivo analítico. J.T. Baker.
- Hidroximetilfurfural (HMF), grado reactivo analítico. Sigma.
- Fructosa, grado reactivo analítico (99% de pureza). Sigma-Aldrich.
- Cloruro de Calcio, grado reactivo analítico. Mallinckrodt.
- Disolución buffer pH=10 (ácido bórico/cloruro de potasio-hidróxido de sodio), grado reactivo analítico, Merck.
- Cobre electrolítico.

### 3.2 MUESTRAS

Las mieles Salvadoreñas se obtuvieron en diferentes supermercados de San Salvador en marzo del 2013. En la Tabla 2 se muestra la información que presentaban las etiquetas.

Tabla 2. Información de muestras de miel utilizadas para análisis de control de calidad.

<b>Muestra</b>	<b>Información</b>	<b>Descripción de la muestra</b>
1	Miel Salvadoreña “Naturamiel” (Multifloral, de la zona costera).	Estado físico: Líquido Color: Ambar oscuro.
2	Miel Salvadoreña “Miel de las abejas”.	Estado físico: Líquido Color: Ambar oscuro
3	Miel Salvadoreña “Sabemas”.	Estado físico: Líquido Color: Ambar
4	Preparado alimenticio de miel de abeja, propóleos y polen “Don Alvaro El Apicultor”.	Estado físico: Líquido Color: Ambar
5	Miel Salvadoreña “Miel del Colmenar” (Miel de campanilla).	Estado físico: Líquido Color: Ambar
6	Miel Salvadoreña “Miel de Dios”	Estado físico: Líquido Color: Ambar
7	Miel Salvadoreña “Naturamiel” (Floración de Mango Llano).	Estado físico: Líquido Color: Ambar oscuro
8	Preparado alimenticio de miel de abjea, propóleos y polen “Abejita feliz”.	Estado físico: Líquido Color: Ambar claro
9	Miel Española “Duteda” (Miel de Brezo).	Estado físico: Líquido Color: Ambar oscuro

Todas las muestras, incluyendo la española son comerciales, por lo que todas se encuentran etiquetadas. Todas las mieles presentan en su etiqueta el número de registro sanitario, su contenido (en gramos o mililitros), el país de origen y fecha de vencimiento. Únicamente las muestras 1 y 7 presentan la fecha de producción (30/01/07 para ambas), al igual que las muestras 1, 5, 7 y 9 presentan el tipo de floración.

Por otro lado es de resaltar que únicamente la muestra 1 y 9 mencionan que es natural en la miel la solidificación y que se caliente en un baño con agua si se prefiere líquida.

En relación a su forma de almacenamiento únicamente las muestras 3, 6, 8 y 9 presentan datos. Finalmente, respecto a sus características organolépticas, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de características organolépticas (sabor y olor) entre las muestras.

Característica	Muestras								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor (dulzura)	Fuerte	Medio	Fuerte	Bajo	Fuerte	Medio	Fuerte	Bajo	Fuerte
Olor	Fuerte	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Bajo	Bajo	Medio	Bajo

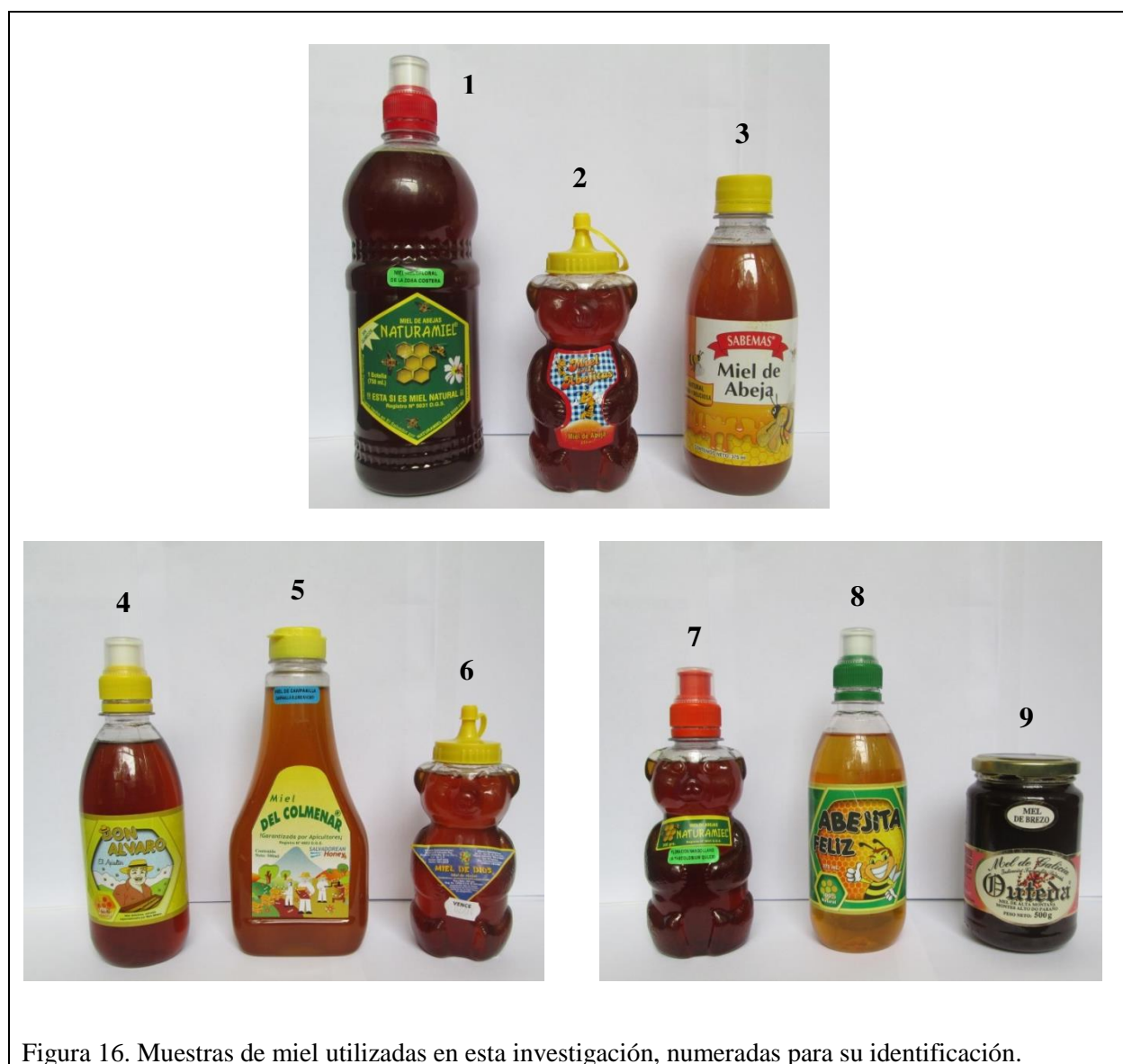


Figura 16. Muestras de miel utilizadas en esta investigación, numeradas para su identificación.

### **3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.**

#### **3.3.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.**

##### **3.3.1.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR POTENCIOMETRÍA.**

Inicialmente, se preparó una disolución de miel de aproximadamente 0.5 g en 200.0 mL de agua destilada; sin embargo, para optimizar el tiempo de duración de la valoración y utilizar menos volumen de disolución de miel, se prepararon posteriormente disoluciones al doble de concentración, es decir de 0.5 g de miel en 100.0 mL.

A continuación, se preparó la disolución de Fehling a titular, mezclando 5.0 mL de la disolución Fehling A ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; en este caso se utilizó a una concentración de  $0.2657 \text{ mol.L}^{-1}$ ) y 5.0 mL de la disolución Fehling B (tartrato de sodio y potasio  $1.170 \text{ mol.L}^{-1}$  e hidróxido de sodio  $2.500 \text{ mol.L}^{-1}$ ) en un vaso de precipitado de 50 mL. En los casos en que la disolución titulante de miel a utilizar se encuentre más concentrada (0.5g de miel/100 mL), deberá de adicionarse a la disolución de Fehling preparada, 5.0 mL de agua destilada para asegurarse que los electrodos estén cubiertos durante todo el proceso de la titulación.

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  $87^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, la disolución de Fehling se tituló con la disolución de miel preparada. Con la adición de los diferentes volúmenes de miel, se midió el cambio de potencial con un electrodo de cobre conectado a un milivoltímetro, obteniéndose la curva potenciométrica para determinar posteriormente el punto de equivalencia y así los moles de azúcares reductores. Finalmente, esta cantidad de moles se expresó en porcentaje en masa de azúcares reductores en la muestra.

##### **3.3.1.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS.**

Se preparó una disolución de miel de aproximadamente 1.0 g en 10.0 mL de agua desionizada. Posteriormente se colocó en un vaso de precipitado de 20.0 ml y se midió la conductividad eléctrica con la ayuda de un conductímetro. Como se trata de una propiedad

aditiva, se midieron las conductividades tanto de la disolución como del agua desionizada para así poder calcular la conductividad debida únicamente a los componentes de la miel a través de una simple resta. Una vez determinada la conductividad eléctrica de la miel se procedió a calcular el porcentaje de cenizas utilizando la relación lineal que existe entre ambas.

### **3.3.1.3 DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA.**

Se preparó una disolución de fructosa entre  $2.0 \cdot 10^{-2}$  y  $2.5 \cdot 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> (es decir, alrededor de 4 mg mL<sup>-1</sup>; por ejemplo, se pesaron 0.0386 g y se disolvieron en un volumen de 10.0 mL de agua desionizada). Esta es la disolución que se utilizó en el método de adiciones patrón. En el caso de la muestra de miel, se preparó una disolución de aproximadamente 1.0 g en 10.0 mL de agua desionizada. Se estableció como intervalo de trabajo experimental los potenciales de -1.30 a -1.90 V con una velocidad de barrido de 5.0 mV/s.

Para llevar a cabo la determinación, se preparó la celda electroquímica, para realizar las mediciones en el polarógrafo, colocando 10 mL de disolución de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O de concentración 1.0 mol.L<sup>-1</sup> como electrólito soporte. Una vez ubicada la celda en el equipo, se burbujeó la disolución por un tiempo de 400 s con nitrógeno gaseoso para eliminar el oxígeno disuelto en la disolución de electrolito soporte, ya que podría provocar interferencias al momento de llevar a cabo las mediciones. A continuación se procedió a trazar el polarograma obteniéndose así la curva residual que corresponde únicamente al medio. Para la determinación se empleó la polarografía diferencial de impulsos.

Posteriormente se adicionaron a la celda electroquímica 50 µL de la disolución de miel y se trazó nuevamente el polarograma correspondiente. De igual forma se hizo el procedimiento para las adiciones de 50 µL de la disolución patrón de fructosa, hasta adicionar un total de 200 µL. Antes de cada adición se burbujeó la celda con nitrógeno gaseoso por un tiempo de 30 segundos. La señal de reducción de fructosa se detectó aproximadamente entre -1.30 a -1.60 V. Una vez obtenidos los polarogramas, se graficaron las magnitudes de corriente obtenidas contra las cantidades adicionadas de fructosa para realizar el cálculo de la

cantidad de fructosa en la muestra según el método de adiciones patrón. El resultado se expresó como porcentaje en masa de fructosa en la muestra.

#### **3.3.1.4 DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF).**

Al igual que para la fructosa, la determinación de HMF se realizó a través del método de adiciones patrón, por lo que se preparó una disolución de HMF del orden de  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  (por ejemplo, 0.0136 g disueltos en 10.0 mL de agua desionizada).

Para la muestra de miel, se preparó una disolución de aproximadamente 2.5g en 5.0 mL de agua desionizada. La alta concentración de disolución de miel se debe a que el HMF es un componente minoritario.

Para la determinación, como electrolito soporte se agregaron 10.0 mL de disolución amortiguadora de boratos en la celda electroquímica. Posteriormente, se burbujeó la disolución con nitrógeno gaseoso por un tiempo de 400 s y se trazó el polarograma correspondiente a la curva residual. Así como en la determinación de fructosa, en la determinación del HMF se empleó la polarografía diferencial de impulsos. En este caso, se estableció como intervalo de trabajo los potenciales de -0.80 a -1.50 V con una velocidad de barrido de 5.0 mV/s.

Debido a la baja concentración en la que se encuentra el analito, dependiendo de la señal de reducción observada en el polarograma, se adicionaron de 1.0 a 2.0 mL de la disolución de miel a la celda electroquímica. Posteriormente, se hicieron adiciones de 10  $\mu\text{L}$  de la disolución patrón hasta adicionar un total de 40  $\mu\text{L}$ . Después de cada adición se trazó el polarograma correspondiente, no olvidando burbujear con nitrógeno gaseoso por 30 segundos entre cada una de ellas. La señal de reducción de HMF se detectó aproximadamente entre -1.10 a -1.40 V. Una vez obtenidos los polarogramas, se grafican las magnitudes de corriente obtenidas contra las cantidades adicionadas de patrón para calcular la cantidad de HMF en la muestra, según el método de adiciones patrón. El resultado se expresó como partes por millón (ppm) de HMF en la muestra.



### **3.3.1.5 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.**

Se colocaron unas gotas de miel en el prisma del refractómetro de manera que éste se encontrara cubierto por completo. Posteriormente, se observó a través del ocular y se leyó el valor de grados Brix. En cada una de las mediciones se tomó la temperatura para hacer las correcciones correspondientes en el valor de grados Brix. Una vez corregido el valor se calculó el porcentaje de humedad.

### **3.3.1.6 DETERMINACIÓN DE pH.**

Se preparó una disolución de miel de aproximadamente 1.0 g en 10.0 mL (se utilizó la misma disolución que en la determinación de cenizas). Posteriormente se colocó la disolución en un vaso de precipitado de 20.0 ml y se mide el pH con la ayuda de un pH metro.

### **3.3.1.7 DETERMINACIÓN DE SACAROSA.**

Se disolvió aproximadamente 1.0 g de miel en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, se tomaron 20.0 mL de esta disolución y se colocaron en un balón volumétrico de 50.0 mL, luego se añadieron 2.0 mL de HCl al 2% para iniciar el proceso de hidrólisis de la sacarosa. Para asegurar la hidrólisis completa se colocó el balón en un lugar donde recibió la mayor cantidad de luz solar posible por 48 horas. A continuación, se aforó y se procedió a utilizar esta disolución como titulante de la disolución de Fehling de igual manera que en la determinación de azúcares reductores. La diferencia del porcentaje obtenido en esta determinación con el porcentaje de azúcares produjo como resultado el porcentaje de sacarosa.

### **3.3.2 APLICACIÓN DE LA POLAROGRAFÍA EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.**

El hecho de conocer y utilizar la estequiometría de la reacción de Fehling con los azúcares reductores, facilita la utilización de la titulación potenciométrica y determinar el punto de equivalencia con la curva de la titulación y no con un indicador visual. Esto permite que no tenga que usarse una concentración de Cu (II) específica para utilizar las tablas de Fehling (con una concentración de Cu(II) planteada por Fehling y según el volumen de disolución

de miel gastado, se busca en estas tablas el porcentaje de azúcares reductores) y también evitar el uso del método modificado de Lane-Eynon en el cual no se utilizan tablas pero deben hacerse dos titulaciones para una sola determinación. Por lo expuesto anteriormente, puede afirmarse que se mejoraron las condiciones de trabajo del método de Fehling. Sin embargo, la titulación potenciométrica aún toma mucho tiempo y se utilizan 5.0 mL de disolución de Cu(II) en cada determinación.

Esta nueva propuesta de metodología en la cual se aplica la polarografía ha sido el producto de la búsqueda de la optimización de recursos, tratando de emplear menos tiempo y cantidad de reactivo.

La determinación se realizó a través del planteamiento de una titulación amperométrica inversa a potencial constante, utilizando un polarógrafo para obtener las señales de corriente correspondientes. En dicha determinación se utilizó como azúcar reductor una disolución de glucosa de concentración aproximadamente  $0.020 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Éste método se desarrolla con base en la misma reacción involucrada en la determinación de azúcares reductores por potenciometría, lo que implica que debe prepararse una disolución de cobre (II) complejado con tartratos y que la reacción de dicha disolución con el azúcar reductor debe darse a una temperatura cercana a la ebullición.

Debido a que en la polarografía, la magnitud de las señales de corriente son directamente proporcionales a la concentración de la especie química en estudio, podrían presentarse varios inconvenientes al intentar plantear un único sistema en el que la celda electroquímica se vea calentada en una temperatura cercana a la ebullición (principalmente, pérdida de volumen y por consiguiente errores en la concentración), por lo que se dividió el sistema de trabajo en dos partes para buscar un mayor control de estos aspectos. Una parte utiliza un matraz Erlenmeyer de 50 mL como reactor en el cual se coloca una cantidad inicial de cobre (II) complejado con tartratos (reactivo de Fehling); en dicho reactor se realizan las adiciones de la disolución de azúcar reductor (en este caso de prueba, disolución de glucosa), siempre a una temperatura cercana a la ebullición.

La otra parte del sistema, consiste en la celda electroquímica del polarógrafo la cual se prepara con disolución de tartratos como electrolito soporte, añadiendo alícuotas de la disolución de cobre (II). Aquí es donde se toma en cuenta la titulación amperométrica, tomando como punto inicial la corriente cuando el volumen de azúcar reductor añadido es de cero en el reactor. Posteriormente, se tomarán alícuotas del reactor por cada adición de azúcar reductor.

Esto permite considerar las condiciones para minimizar la pérdida de volumen al calentar el frasco Erlenmeyer como reactor, lo cual se vería más complicado si se realizara en la celda electroquímica.

Para esta metodología se hicieron una diversidad de pruebas variando diferentes condiciones y entre los factores experimentales más determinantes que se encontraron fue la adición de la alícuota a la celda electroquímica. Al adicionar alícuotas del orden de los microlitros se corre el riesgo de obtener errores importantes si la alícuota es muy pequeña y las puntas de la micropipeta a utilizar no se encuentran en buen estado. Esto puede verse contrarrestado si se utiliza una disolución inicial de cobre (II) más diluida, lo cual implica que para obtener una señal de corriente apreciable se requiera un mayor volumen en la alícuota y así el error por una cantidad de volumen que pueda quedar en la punta de la micropipeta se minimiza.

El utilizar una disolución de cobre (II) más diluida ayuda a la vez a contrarrestar el efecto de una posible pérdida de volumen al calentar el reactor. Si la disolución se diluye adicionando agua desionizada, la pérdida de solvente por calentamiento se ve disminuida en un volumen mayor de líquido con respecto a otro que posea menos disolvente.

Con base a todas estas consideraciones, a continuación se presenta como ejemplo un procedimiento en el cual se obtuvieron resultados satisfactorios:

Inicialmente se colocaron como electrolito soporte en la celda electroquímica del polarógrafo, 5.0 mL de la disolución de tartratos que se utiliza para complejar al Cu (II) con 5.0 mL de agua desionizada. Posteriormente, se burbujeó la disolución con nitrógeno gaseoso por un tiempo de 400 s y se trazó el polarograma correspondiente a la curva

residual. El intervalo de potencial de trabajo establecido fue de -0.70 a -0.35 V con una velocidad de barrido de 5.0 mV/s.

Por otro lado, en un matraz Erlenmeyer (reactor) de 50 mL se adicionó un volumen (3.0 o 2.0 mL, dependiendo del caso) de disolución de Cu (II) de concentración conocida ( $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$ , en este ejemplo), 5.0 mL de disolución de tartratos y 22.0 mL de agua desionizada, teniendo así los 3.0 mL de Cu (II) en un volumen total de 30.0 mL; por lo tanto, la disolución de Cu (II) se diluyó a su décima parte. Se tomó una alícuota (de 80  $\mu\text{L}$ ) y se adicionó a la celda electroquímica y se trazó el polarograma correspondiente, después de haber burbujeadado la disolución con nitrógeno por 30 s. Esto último es muy importante para eliminar cualquier cantidad de oxígeno presente en la disolución de la celda electroquímica.

Una vez tomado el polarograma inicial que corresponde a una adición de 0.00 mL de glucosa, se añadió al frasco Erlenmeyer, 2.0 mL de disolución de glucosa  $0.0200 \text{ mol.L}^{-1}$  (0.9009 g en 250.0 mL), para que la reacción se llevara a cabo con mayor velocidad se empleó agitación magnética. Para el calentamiento que requiere la reacción del azúcar reductor con el Cu (II), se aplicó un baño de maría utilizando un vaso de precipitado de 250 mL. La pérdida de volumen de líquido por calentamiento, se controló cerrando con un tapón de hule el matraz Erlenmeyer el cual se recubre con papel parafilm para minimizar en lo posible el escape de vapor.

Al observar la ebullición del agua en baño de maría, se sumergió el matraz Erlenmeyer por un periodo de 5 minutos (Se realizaron pruebas previas con volúmenes similares de líquido encontrando que la disolución alcanzaba la temperatura de  $87^\circ\text{C}$  a los 3 minutos, temperatura en la cual se observó que la reacción puede llevarse a cabo).

A continuación, se enfrió el matraz Erlenmeyer en un baño de hielo por un tiempo aproximado de 3 minutos. Una vez enfriado, se procedió a retirar el papel parafilm y el tapón de hule del matraz (es de mucha importancia que la parte superior del matraz se encuentre en contacto con el baño de hielo, ya que de lo contrario al momento de destaparlo puede haber vapor retenido que se escape, esto se ve evidenciado por la formación de

burbujas alrededor del tapón. Además, se tuvo la precaución de no sacar alícuotas con el líquido caliente ya que el líquido no sería retenido por las puntas de la micropipeta).

Al enfriarse el matraz, se tomó nuevamente una alícuota de 80  $\mu\text{L}$  para adicionarla en la celda electroquímica del polarógrafo y se trazó el polarograma correspondiente. La magnitud de corriente del pico obtenido corresponderá al volumen (de 2.0 mL en este caso) de adición de glucosa en la titulación amperométrica.

El procedimiento descrito anteriormente se repite para dos adiciones más (de 2.0 mL) de disolución de glucosa, las magnitudes de corriente obtenidas en los polarogramas corresponderán a la adición (de 4.0 mL y 6.0 mL) de disolución de glucosa en la titulación amperométrica.

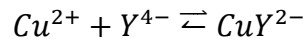
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los análisis llevados a cabo en el presente trabajo. En cada uno se demostrará cómo se llevaron a cabo los cálculos respectivos y posteriormente los resultados obtenidos de las muestras en total.

#### 4.1.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

Inicialmente se tituló la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (34.6521g en 500.0 mL) con una disolución de EDTA  $0.0364 \text{ mol.L}^{-1}$  como patrón primario, lo cual permitirá utilizar la disolución de  $\text{Cu}^{2+}$  como patrón secundario. El punto de equivalencia se determinó por potenciometría con un electrodo indicador de Cu. La reacción de la titulación es la siguiente:



Debido a que la estequiometría de la reacción es 1:1, el punto de equivalencia estará dado a la mitad de la curva potenciométrica (punto de inflección).

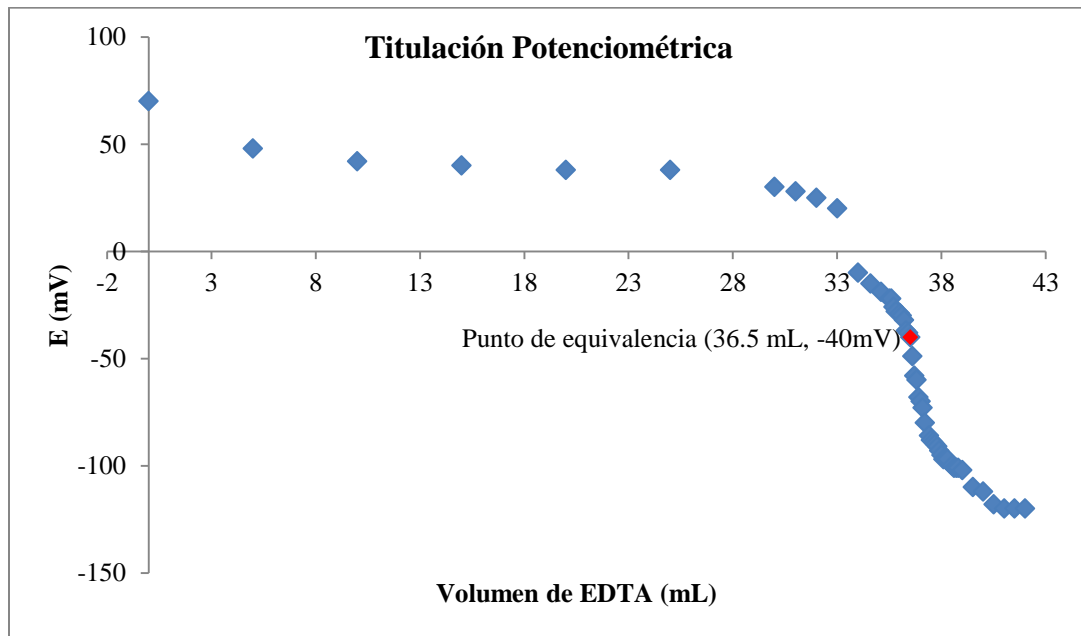


Figura17. Titulación de 5.0 mL de disolución de Cu (II) con disolución de EDTA  $0.0364 \text{ mol.L}^{-1}$

A partir de la curva de titulación potenciométrica (Figura 17) se puede conocer el volumen en el punto de equivalencia y puesto que se titulan 5.0 mL de la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se procede a realizar el cálculo de su concentración. En el ejemplo presentado en la Figura 17, el volumen utilizado para llegar al punto de equivalencia fue de 36.5 mL de EDTA.

$$36.5 \text{ mL} \left( \frac{0.0364 \text{ mmol EDTA}}{1.0 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mmol EDTA}} \right) = 1.3286 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

$$[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = \frac{1.3286 \text{ mmol}}{5.0 \text{ mL}} = 0.2657 \text{ M}$$

Para la reacción de Fehling se titulan 5.0 mL de disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de concentración  $0.2657 \text{ mol.L}^{-1}$ , por lo que la cantidad de mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  que reaccionen con los azúcares reductores de la miel son:

$$5.0 \text{ mL} \left( \frac{0.2657 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1.0 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mmol Cu}^{2+}}{1 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} \right) = 1.3286 \text{ mmol Cu}^{2+}$$

Para continuar con los cálculos para la muestra 7, se utiliza la curva potenciométrica experimental, la cual se presenta a continuación.

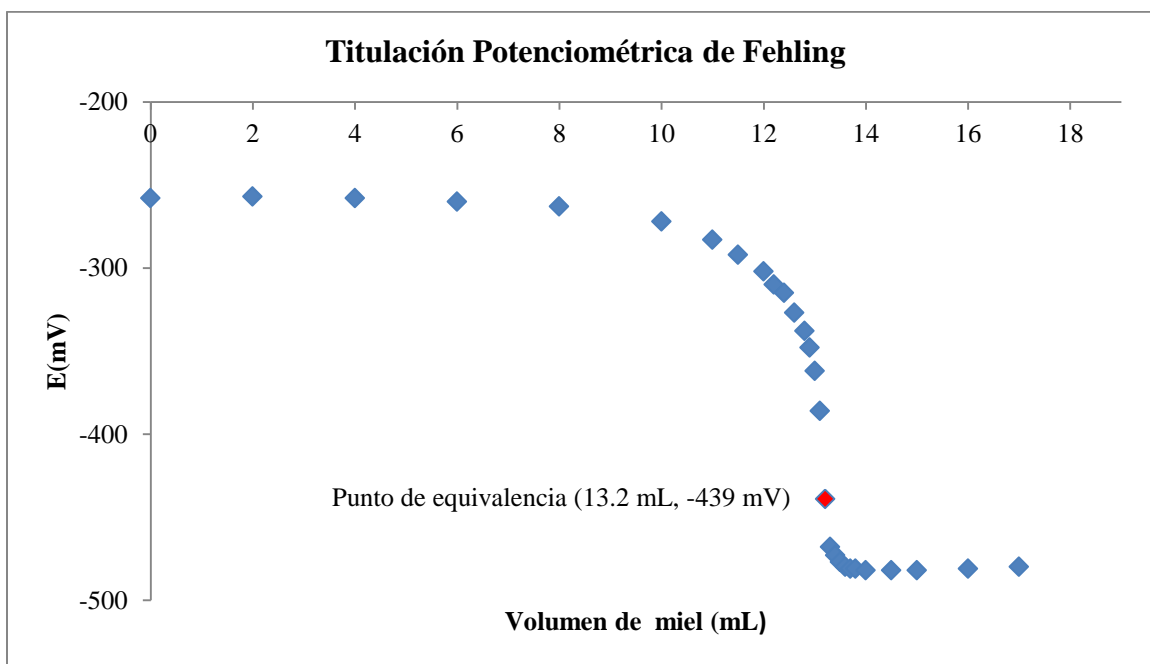


Figura 18. Titulación de 1.3286 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  (5.0 mL de disolución  $0.2657 \text{ mol.L}^{-1}$ ) con disolución de la muestra 7, marca “Naturamiel” de Mango Llano (522 mg en 100 mL).

Para calcular el punto de equivalencia, se toma en cuenta que este se encuentra a 5/6 del cambio de potencial que se observa en la curva potenciométrica (ver apartado 2.4.1.1.). Para este caso, se observa que antes del punto de equivalencia (antes del cambio brusco de valores de potencial), el valor del potencial de equilibrio es casi constante alrededor de -257 mV y el potencial final una vez que permanece constante es -482 mV, por lo que tenemos un cambio de potencial de -225 mV. Si calculamos los 5/6 de los -225 mV se obtiene como resultado -186.5 mV, por lo que el potencial en el punto de equivalencia sería el potencial inicial (-257 mV) más el cambio de -186.5 mV, es decir -443.5 mV. Al observar la curva potenciométrica, se tiene que el valor más cercano es de -439 mV al que corresponde un volumen de disolución de miel añadido de 13.2 mL. Con esto se conoce que se requirieron de 13.2 mL de disolución de miel para que reaccionaran en su totalidad los 1.3286 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Para calcular los mmoles de azúcares reductores que reaccionaron con los mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  se utiliza la relación estequiométrica de 1 mmol de azúcar reductor por 5 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$ , posteriormente se calculan los miligramos de azúcares reductores utilizando la masa molar de  $180.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ :

$$1.3286 \text{ mmol Cu}^{2+} \left( \frac{1 \text{ mmol Azúcar red.}}{5 \text{ mmol Cu}^{2+}} \right) = 2.6572 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.}$$

$$2.6572 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.} \left( \frac{180.16 \text{ mg Azúcar red.}}{1 \text{ mmol Azúcar red.}} \right) = 47.87 \text{ mg Azúcar red.}$$

Una vez calculados los miligramos de azúcares reductores que corresponden a los 13.2 mL de disolución de miel, se calculan para los 100.0 mL de disolución preparados en total:

$$47.87 \text{ mg Azúcar red.} \left( \frac{100 \text{ mL de disolución}}{13.2 \text{ mL de disolución.}} \right) = 362.67 \text{ mg Azúcar red.}$$

Conociendo que en los 100.0 mL de disolución se disolvieron 522 mg de miel puede calcularse el porcentaje de azúcares reductores presentes en la miel:

$$\left( \frac{362.67 \text{ mg Azúcar red.}}{522.00 \text{ mg de miel}} \right) 100 = 69.48\% \text{ Azúcar red.}$$



De igual manera se desarrollaron los cálculos para las demás muestras de miel. Es de tomar en cuenta que en todos los casos se tomaron 5.0 mL de disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de concentración  $0.2657 \text{ mol.L}^{-1}$ , por lo que en todas las muestras los mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  titulados son 1.3286 y por consiguiente los mmoles titulantes de azúcares reductores siempre son  $2.6572 \times 10^{-1}$ .

Tabla 4. Resultados obtenidos en la determinación de azúcares reductores.

<b>Muestra</b>	<b>Disolución de miel (mg miel / mL disolución)</b>	<b>Concentración (g miel / L disolución)</b>	<b>V<sub>(mL)</sub> en punto de equivalencia</b>	<b>Porcentaje de azúcares reductores</b>
1	539.3/200	2.696	25.0	71.01
2	512.4/200	2.562	26.5	70.51
3	509.4/100	5.094	12.8	73.42
4	537.6/100	5.376	19.4	45.90
5	545.9/100	5.459	12.2	71.88
6	535.2/100	5.352	12.3	72.72
7	522.0/100	5.220	13.2	69.48
8	546.8/100	5.468	18.2	48.10
9	540.9/100	5.409	12.3	71.95

Según la Norma Salvadoreña para Miel de Abejas (NSO 67.19.01:08) el porcentaje de azúcares reductores mínimo para miel de flores es del 60%. Todas las muestras de miel estudiadas poseen un porcentaje arriba o cercano del 70% por lo que cumplen con la norma.

En el caso de los preparados alimenticios (muestras 4 y 8), según la Norma Salvadoreña para Preparados Alimenticios con Miel de Abeja (NSO 67.38.02:05) no se establece un porcentaje mínimo de azúcares reductores, únicamente se menciona que la miel a utilizar para el preparado alimenticio debe cumplir la norma para miel de abejas; sin embargo, podemos observar que ambos preparados poseen un porcentaje de azúcares reductores similar con el 45.90 y 48.10%.

#### 4.1.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS.

En la determinación de cenizas, se midió la conductancia ( $\mu\text{S}$ ) con la ayuda de un conductímetro. Al multiplicar los valores de conductancia por la constante de celda ( $1.0 \text{ cm}^{-1}$ ) se obtienen valores de conductividad específica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Para la muestra 7, se presentan los resultados de las mediciones y cálculos obtenidos:

$$\text{Conductividad específica del agua } (\chi_{\text{H}_2\text{O}}) = 1.8 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\text{Conductividad específica de la disolución de miel } (\chi_{\text{disolución}}) = 380 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\text{Conductividad específica de la miel } (\chi_{\text{disolución}} - \chi_{\text{H}_2\text{O}}) = 378.2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$$

A continuación se utiliza la ecuación que establece la relación lineal entre el porcentaje de cenizas y la conductividad específica:

$$\chi = 1.74A + 0.14$$

en donde “ $\chi$ ”, es la conductividad específica ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y “A”, el porcentaje de cenizas.

Por lo tanto, el valor del porcentaje de cenizas estará dado por la siguiente expresión:

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

Antes de calcular dicho porcentaje, debido a que la conductividad específica debe expresarse en  $\text{mS}/\text{cm}$ , se realizó la conversión de  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $\text{mS}/\text{cm}$  dividiendo entre 1000. En este caso,  $378.2 \mu\text{S}/\text{cm}$  equivalen a  $0.3782 \text{ mS}/\text{cm}$ .

El cálculo para el porcentaje de cenizas para esta muestra de miel, se presenta a continuación:

$$A = \frac{0.3782 - 0.14}{1.74} = 0.1373\%$$

De esta manera se realizaron los cálculos para todas las muestras. Es de tomar en cuenta que no en todas las muestras la conductividad específica del agua ( $\chi_{\text{H}_2\text{O}}$ ) es la misma, ya que no todas las disoluciones se hicieron con la misma agua desionizada.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la determinación de cenizas.

Muestra	Concentración (g miel/L disolución)	Conductividad Específica $\chi$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	$\chi_{\text{disol}} - \chi_{\text{H}_2\text{O}}$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Conductividad Específica (mS/cm)	Porcentaje de Cenizas
1	106.92	380	378.2	0.3782	0.1369
2	105.65	229	227.2	0.2272	0.0501
3	107.07	212	210.2	0.2102	0.0403
4	105.02	190	188.2	0.1882	0.0277
5	102.67	288	286.2	0.2862	0.0840
6	101.40	228	224.9	0.2249	0.0488
7	104.85	382	378.9	0.3789	0.1373
8	103.40	91	87.9	-----	-----
9	104.15	297	293.9	0.2939	0.0884

La Norma Salvadoreña no considera entre sus requisitos el porcentaje de cenizas. Si se considera el porcentaje de cenizas de la Norma Mexicana de Miel (NMX-F-036-2006) por ser el lugar de origen de los principales antecedentes de este estudio y de los exportadores más importantes de miel en el mundo, todas las muestras poseen un porcentaje de cenizas aceptable, ya que dicha norma establece un porcentaje máximo del 0.60%. Las muestras con mayor porcentaje se acercan al 0.14%.

Tomando los casos particulares de las muestras 4 y 8 que corresponden a preparados alimenticios con base de miel, se observa que para la muestra 4 el porcentaje es 0.0277% y para la muestra 8 no es posible determinarlo, ya que si se utiliza el valor de conductividad específica se obtiene un valor negativo de porcentaje, lo cual no es posible porque se está determinando cantidad de materia. Este resultado confirma que dicha expresión se ha establecido con base al contenido promedio de cenizas en miel pura, por lo que no podríamos considerar el resultado de la muestra 4 como acertado; también es posible que esta ecuación deba confirmarse experimentalmente y quizá deba cambiarse el valor de la ordenada al origen.

### 4.1.3 DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA.

Para la muestra 7, se preparó una disolución de miel de 1.0529 g en 10.0 mL de agua desionizada, por lo que posee una concentración de 0.10529 g/mL.

A continuación se presentan los polarogramas obtenidos para la señal de reducción de fructosa en la muestra de miel como en cada una de las adiciones patrón de fructosa:

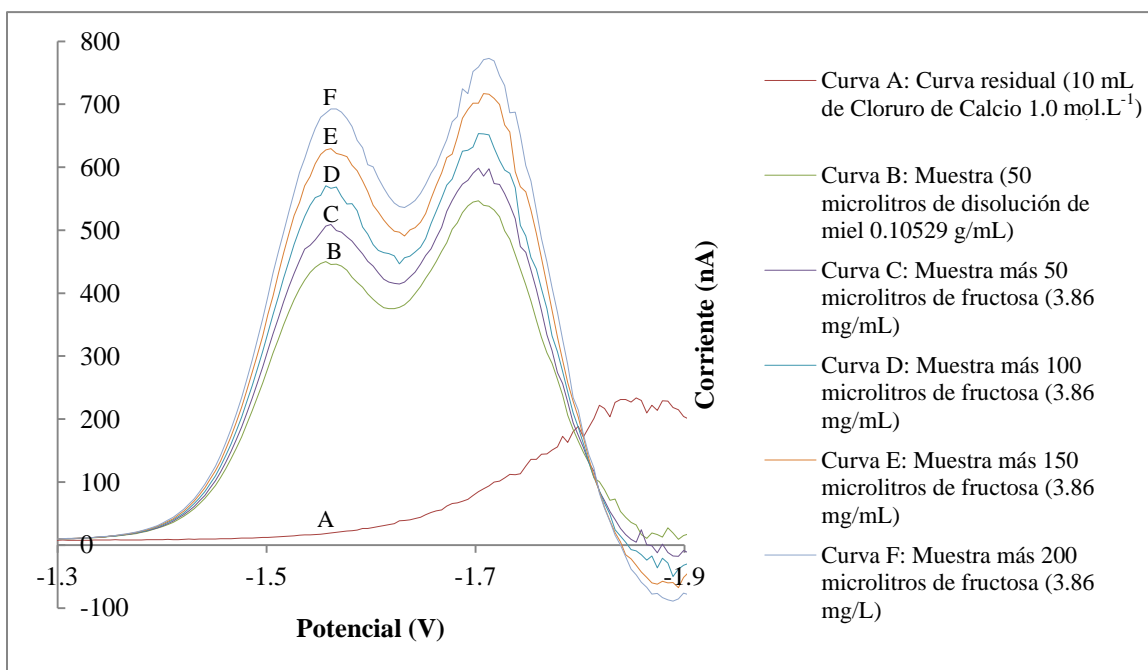


Figura 19. Polarogramas para la determinación de fructosa

Puede observarse en los polarogramas de la Figura 19 que a medida que a la muestra de miel (curva B) se le adiciona disolución patrón de fructosa, se produce un aumento en la altura del pico de las señales. Esto se debe a la relación directa que hay entre la corriente y la concentración.

Para construir la curva patrón, se calculó la cantidad de fructosa con cada una de las adiciones, recordando que la concentración de la disolución patrón es de 3.86 mg/mL:

- Al adicionar 50  $\mu$ L de patrón:

$$50 \mu\text{L} \left( \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} \right) \left( \frac{3.86 \text{ mg de fructosa}}{1 \text{ mL}} \right) = 0.193 \text{ mg de fructosa}$$

Debido a que las adiciones son de 50  $\mu$ L, podemos calcular fácilmente las cantidades de fructosa en las demás adiciones. Para 100  $\mu$ L la masa de fructosa añadida debe ser el doble

que para 50  $\mu\text{L}$  (0.386 mg), para 150  $\mu\text{L}$  el triple (0.579 mg) y para 200  $\mu\text{L}$  el cuádruple (0.772 mg)

Con respecto al polarograma, se tomó el pico de la señal de reducción que aparece aproximadamente entre -1.30 y -1.60 V. En este caso particular, el potencial en el cual se encontró el pico de la señal es de -1.56 V. Además se midió la corriente de la curva residual en este potencial para eliminar la corriente debida al medio en la celda, cuyo valor es de 18.1 nA. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Corrientes obtenidas para la reducción de fructosa para la muestra 7.

$V_{\mu\text{L}}$ de patrón añadido.	mg de patrón añadido.	I (nA)	$I_{\text{corregida}} (I - I_{\text{residual}})$ (nA)
0	0.000	450	431.9
50	0.193	509	490.9
100	0.386	571	552.9
150	0.579	630	611.9
200	0.772	693	674.9

De acuerdo con el método de adiciones patrón, se grafica la cantidad de fructosa añadida contra la magnitud de corriente del pico de señal de reducción de la fructosa:

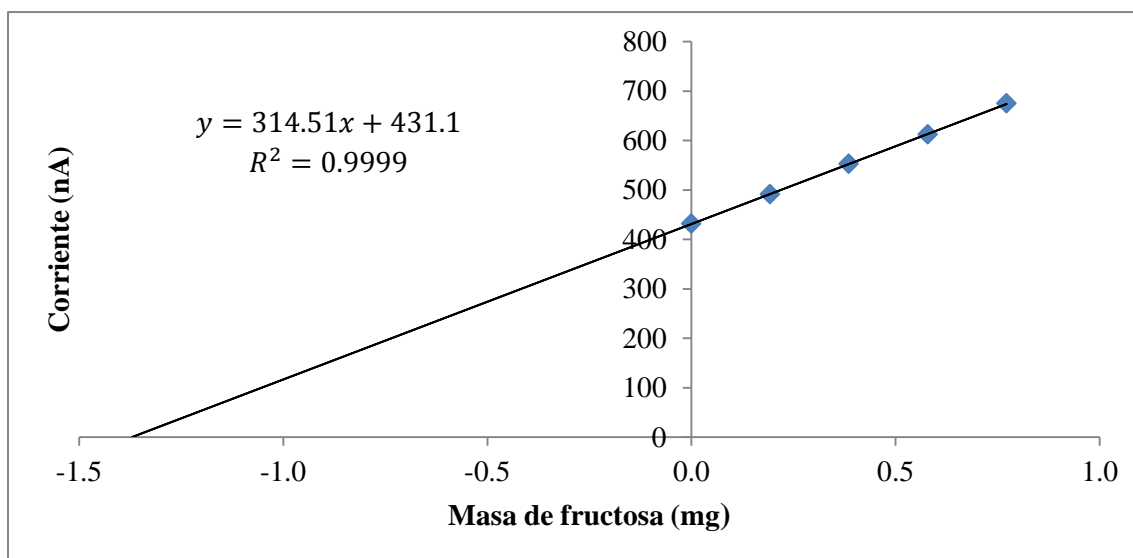


Figura 20. Magnitud de corriente contra cantidad de fructosa añadida para la muestra 7.

Se puede observar en la gráfica que los puntos siguen una tendencia de línea recta expresada por la ecuación  $y = 314.51x + 431.1$ , donde “x” corresponde a la cantidad de fructosa y “y” a la magnitud de corriente. Dicha tendencia posee una muy buena correlación lineal, presentando un coeficiente de determinación de 0.9999. Para el cálculo de la fructosa en la muestra, utilizamos la ecuación de la línea recta para extrapolar y conocer el valor de  $x$  cuando el valor de corriente ( $y$ ) es igual a cero:

$$0 = 314.51x + 431.1$$

$$x = \frac{0 - 431.1}{314.51}$$

$$x = -1.3707$$

En el método de adiciones patrón el valor calculado de  $x$  siempre es negativo, ya que siempre se extrapola hacia el eje negativo. El resultado de  $x$  obtenido, implica que en la adición de 50 $\mu$ L de disolución de miel, se encuentran 1.3707 mg de fructosa. Con este resultado se calcula la cantidad de fructosa total en la disolución de 10.0 mL, con la consideración de que 50 $\mu$ L equivalen a  $5 \times 10^{-2}$  mL:

$$1.3707 \text{ mg} \left( \frac{10 \text{ mL}}{5 \times 10^{-2} \text{ mL}} \right) \left( \frac{1.0 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) = 0.2741 \text{ g}$$

Puesto que la disolución de miel se preparó disolviendo 1.0529 g en los 10.0 mL, se puede calcular el porcentaje de fructosa en la miel:

$$\% \text{ de fructosa} = \left( \frac{0.2741 \text{ g de fructosa}}{1.0529 \text{ g de miel}} \right) 100\%$$

$$\% \text{ de fructosa} = 26.04\%$$

De igual manera se realizaron los cálculos para las demás muestras de miel analizadas, que se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos en la determinación de fructosa.

Muestra	Concentración (g <sub>miel</sub> / mL <sub>disolución</sub> )	Ecuación de curva de adiciones patrón.	Correlación de la curva (R <sup>2</sup> )	Porcentaje de fructosa
1	0.10370	$y = 246.11x + 360.6$	0.9960	28.26
2	0.10750	$y = 252.33x + 307.8$	0.9999	24.21
3	0.10517	$y = 206.22x + 332.2$	0.9890	30.63
4	0.10406	$y = 174.09x + 69.2$	0.9990	07.64
5	0.10270	$y = 253.37x + 383.7$	0.9950	29.49
6	0.10411	$y = 295.85x + 350.7$	0.9982	22.77
7	0.10529	$y = 314.51x + 431.1$	0.9999	26.04
8	0.10413	$y = 245.60x + 92.4$	0.9990	07.23
9	0.10106	$y = 317.62x + 470.6$	0.9987	29.32

El contenido de fructosa no se encuentra en la Norma Salvadoreña, únicamente se expresa como requisito la relación de fructosa/glucosa la cual debe ser mayor o igual a 1. De manera general podemos observar que la mayoría de las mieles poseen un porcentaje de fructosa entre un 25% y 30%, a excepción de los preparados alimenticios, los cuales presentan un porcentaje alrededor del 7%. En el futuro, con esta metodología podría plantearse únicamente la determinación de fructosa en la Norma.

#### 4.1.4 DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF).

Para la muestra 9, se preparó una disolución de miel de 2.5580 g en 5.0 mL de agua desionizada, por lo que posee una concentración de 0.5116 g/mL. El volumen adicionado de muestra fue de 1 mL (1000 µL).

Nuevamente, al igual que en el caso de la fructosa, puede observarse la relación de la corriente con la concentración en el polarograma. A medida que a la muestra de miel (curva B) se le adiciona disolución patrón de HMF, se produce un aumento en el pico de la señales.

El polarograma obtenido para la señal de reducción de HMF en la muestra de miel como en cada una de las adiciones patrón de HMF se presenta en la Figura 21.

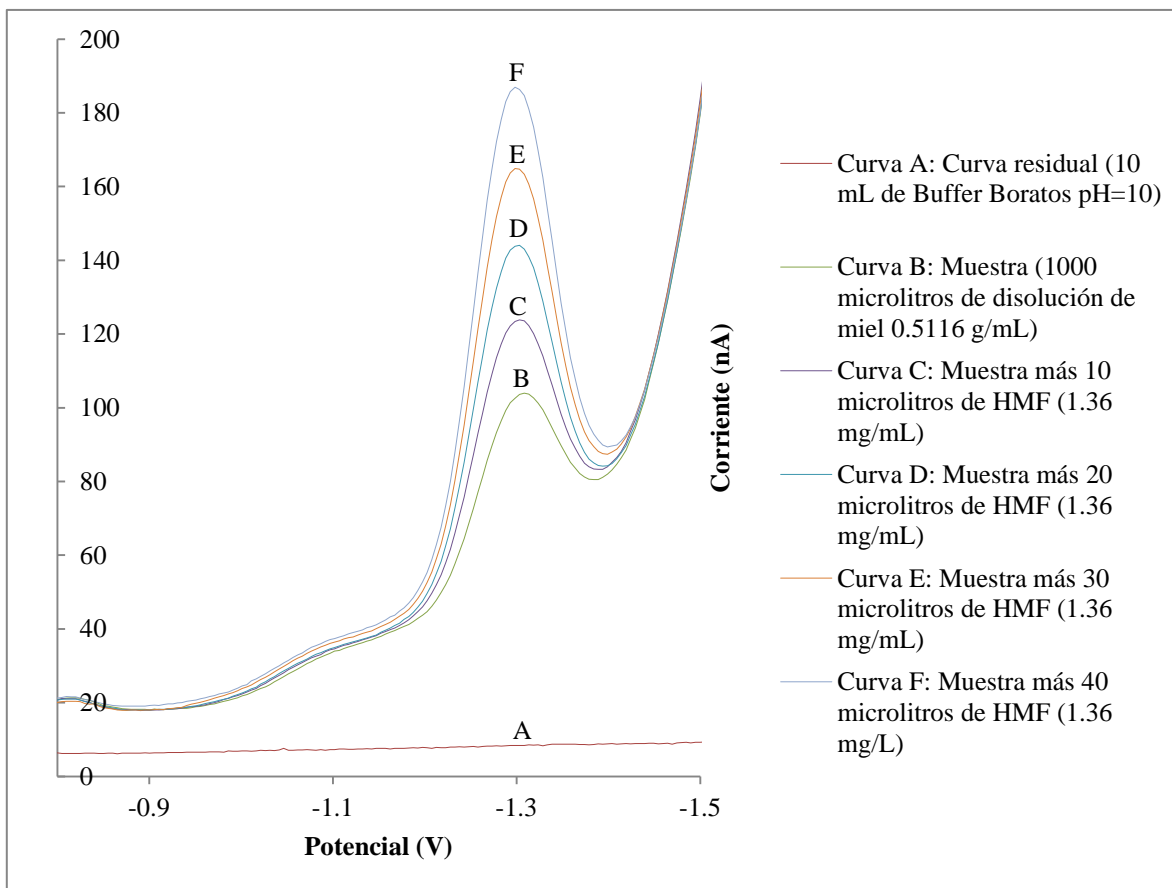


Figura 21. Polarogramas para la determinación de HMF.

Para construir la curva patrón, se calculó la cantidad de HMF con cada una de las adiciones, con base en la concentración de la disolución patrón de 1.36 mg/mL:

- Al adicionar 10  $\mu\text{L}$  de patrón:

$$10 \mu\text{L} \left( \frac{1.36 \mu\text{g de HMF}}{1 \mu\text{L}} \right) = 1.36 \mu\text{g de HMF}$$

Al ser las adiciones de 10  $\mu\text{L}$ , pueden calcularse las cantidades de HMF en las demás adiciones. Para 20  $\mu\text{L}$  la masa de HMF añadida debe de ser el doble que para 10  $\mu\text{L}$  (2.72  $\mu\text{g}$ ), para 30  $\mu\text{L}$  el triple (4.08  $\mu\text{g}$ ) y para 40  $\mu\text{L}$  el cuádruple (5.44  $\mu\text{g}$ )

Con respecto al polarograma, con la ayuda del software del polarografo se midió la altura del pico de la señal de reducción que aparece aproximadamente entre -1.10 y -1.40 V. En este caso particular, el potencial en el cual se encontró el pico de la señal es de -1.30 V.

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 8.



Tabla 8. Corrientes obtenidas en la reducción de HMF para la muestra 9.

<b>V<sub>HL</sub> de patrón añadido.</b>	<b>µg de patrón añadido.</b>	<b>I (nA)</b>
0	0.00	39.7
10	1.36	58.5
20	2.72	78.5
30	4.08	97.3
40	5.44	118

Conforme al método de adiciones patrón, se grafica la magnitud de corriente del pico de señal de reducción de la fructosa contra la cantidad de HMF añadida; la cual se muestra en la Figura 22.

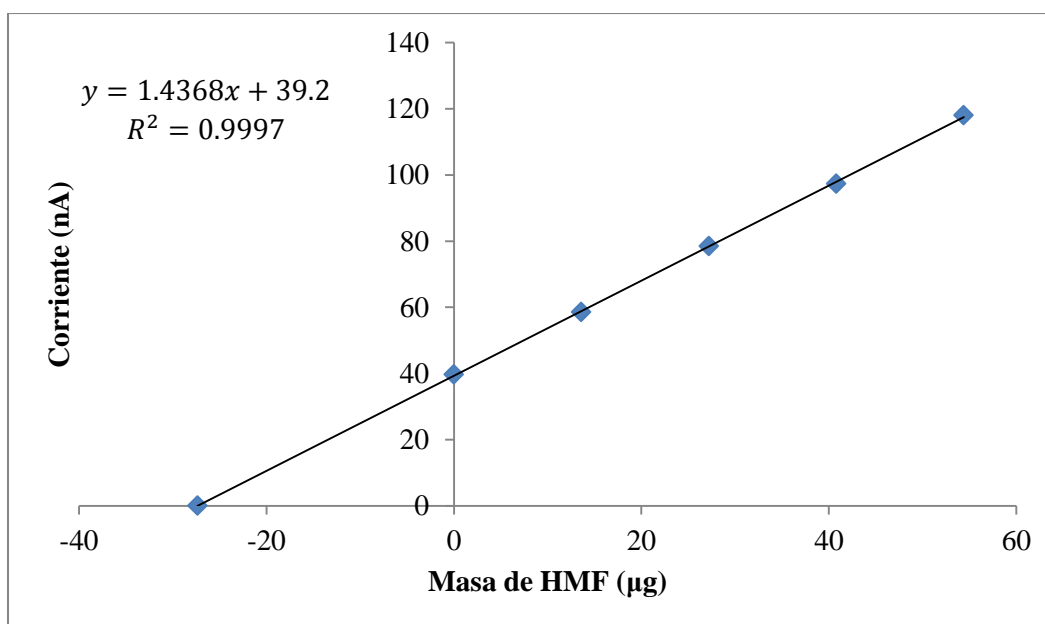


Figura 22. Magnitud de corriente contra cantidad de HMF añadido para la muestra 7

Se puede observar en la gráfica que los puntos siguen una tendencia de línea recta expresada por la ecuación  $y = 1.4368x + 39.2$ , donde “x” corresponde a la cantidad de HMF y “y” a la magnitud de corriente. Dicha tendencia posee una muy buena correlación lineal, presentando un coeficiente de determinación de 0.9997. Para el cálculo de HMF en

la muestra, utilizamos la ecuación de la línea recta para extrapolar y conocer el valor de  $x$  cuando el valor de corriente ( $y$ ) es igual a cero:

$$0 = 1.4368x + 39.2$$

$$x = \frac{0 - 39.2}{1.4368} = -27.37$$

Por lo tanto, en la adición de 1000  $\mu\text{L}$  de disolución de miel, se encuentran 27.37  $\mu\text{g}$  de HMF. Con este resultado se calculó la cantidad de fructosa total en la disolución de miel (5.0 mL) al tomar en cuenta que 1000 $\mu\text{L}$  equivalen a 1 mL:

$$27.37 \mu\text{g} \left( \frac{5.0 \text{ mL}}{1.0 \text{ mL}} \right) = 136.83 \mu\text{g}$$

Puesto que la disolución de miel se preparó disolviendo 2.5580 g en los 5.0 mL, podemos calcular la concentración en partes por millón de HMF en la miel:

$$\text{ppm de HMF} = \frac{136.83 \mu\text{g de HMF}}{2.5580 \text{ g de miel}} = 53.49 \text{ ppm de HMF}$$

De igual manera se realizaron los cálculos para las demás muestras de miel analizadas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la determinación de HMF.

Muestra	Concentración (g miel / mL disolución)	Ecuación de curva de adiciones patrón.	Correlación de la curva ( $R^2$ )	Concentración de HMF (ppm)
1	0.51170	$y = 1.3657x + 0.058$	0.9947	00.04
2	0.50480	$y = 1.9404x + 26.68$	0.9994	27.24
3	0.50918	$y = 2.0304x + 7.698$	0.9998	07.45
4	0.50050	$y = 1.8654x + 27.84$	0.9993	29.82
5	0.50480	$y = 0.7137x + 1.0808$	0.9988	01.50
6	0.50520	$y = 1.5979x + 8.084$	0.9992	10.01
7	0.50830	$y = 0.9348x - 1.4532$	0.9941	-----
8	0.50770	$y = 1.5221 + 26.96$	0.9986	38.77
9	0.51160	$y = 1.4368x + 39.32$	0.9997	53.49

Según la Norma Salvadoreña, la cantidad de HMF límite posible es de 40 ppm después del procesamiento de la miel, pero si su lugar de origen es de clima tropical, se admiten hasta 80 ppm. Al observar los resultados se ve que todas las mieles de El Salvador, cumplen con este requisito. La única miel que no cumple con la norma es la española, probablemente esto puede deberse a que fue calentada durante su almacenamiento en la estantería o durante su transporte desde España.

Es importante resaltar que hubo tres mieles cuyo contenido de HMF determinado fue muy bajo. La muestra 1 (Naturamiel, de la zona costera), que presentó únicamente 0.04 ppm; la muestra 5 (Miel del Colmenar) con 1.50 ppm y finalmente, la muestra 7 (Naturamiel, de mango llano) la cual no se pudo determinar por estar debajo del límite de detección.

#### **4.1.5 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.**

Al colocar la muestra 4 en el prisma del refractómetro, se observó en el ocular un valor de 82.60 grados Brix. Debido a que al momento de hacer la medición se registró una temperatura de 24°C se realizó la corrección respectiva con respecto a la temperatura de 20°C con un factor dado por el refractómetro:

Grados Brix (24°C): 82.60°

Corrección de grados Brix:  $82.60^\circ + (24^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C})(0.0023) = 82.61^\circ$

Una vez determinados los grados Brix los cuales hacen referencia al porcentaje de sólidos disueltos, si restamos dicha cantidad al 100% se obtiene el porcentaje debido al agua (humedad) presente en la muestra:

Porcentaje de humedad:  $100\% - 82.61\% = 18.79\%$

Por lo tanto, se tiene que el porcentaje de humedad para la muestra 9 es de 18.79%. De igual manera se procedió a realizar el cálculo para las demás muestras de miel. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10:

Tabla 10. Resultados obtenidos en la determinación de humedad.

Muestra	Grados Brix	T (°C)	Grados Brix corregidos	Porcentaje de humedad
1	81.20	24	81.21	18.79
2	81.80	24	81.81	18.19
3	81.60	24	81.61	18.39
4	82.60	24	82.61	17.39
5	80.20	24	80.21	19.79
6	81.00	24	81.01	18.99
7	81.00	25	81.01	18.99
8	82.40	25	82.41	17.59
9	81.20	25	81.21	18.79

En el caso de la humedad, todas las muestras cumplen con el límite máximo establecido por la Norma Salvadoreña para miel de abejas. Dicha norma establece como valor máximo un 20% de humedad.

Al observar el porcentaje de humedad de todas las muestras puede notarse que la muestra 5 (Miel del Colmenar) se encuentra muy cerca del valor límite con un 19.79% mientras que la muestra 4 (Sabemas) posee el valor más alejado con 17.39% de humedad. Sin embargo, no debe olvidarse que esta última muestra es un preparado alimenticio con base de miel, propóleos y polen y no una miel natural. Con base a lo anterior, llama la atención que la segunda muestra con menor contenido de humedad es la muestra 8 que también es un preparado alimenticio. Dicha muestra posee un porcentaje de del 17.59%.

En general, todas las demás muestras de miel a las que se les determinó el porcentaje de humedad presentan un valor mayor al 18%.

#### **4.1.6 DETERMINACIÓN DE pH.**

El resumen de las mediciones obtenidas con la ayuda del pHmetro para cada una de las muestras de miel se presenta a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de pH.

Muestra	Concentración (g miel/mL disolución)	pH
1	0.10692	4.12
2	0.10565	4.04
3	0.10707	3.90
4	0.10502	4.23
5	0.10267	4.15
6	0.10140	3.92
7	0.10485	4.09
8	0.10340	4.06
9	0.10415	4.20

De manera general se observa que el pH de todas las muestras se encuentra en un valor cercano a 4.0. Aunque el pH no se considera como requisito tanto en la Norma Salvadoreña como en la Norma Mexicana, es de mucha importancia ya que si el pH de una miel es muy ácido conlleva a que ésta pueda fermentar más fácilmente. En promedio, el pH para una miel natural se encuentra entre 3.5 y 6.5.

#### 4.1.7 DETERMINACIÓN DE SACAROSA.

Para esta determinación se valoraron 5.0 mL de disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de concentración  $0.3169 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se calculan los mmoles de Cu (II) que serán los que reaccionen con los azúcares reductores de la miel:

$$5.0 \text{ mL} \left( \frac{0.3169 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1.0 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mmol Cu(II)}}{1 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} \right) = 1.5845 \text{ mmol Cu(II)}$$

A continuación se presenta como ejemplo los resultados obtenidos para la muestra 5; se utiliza la curva potenciométrica obtenida en la valoración y que se muestra en la Figura 23.

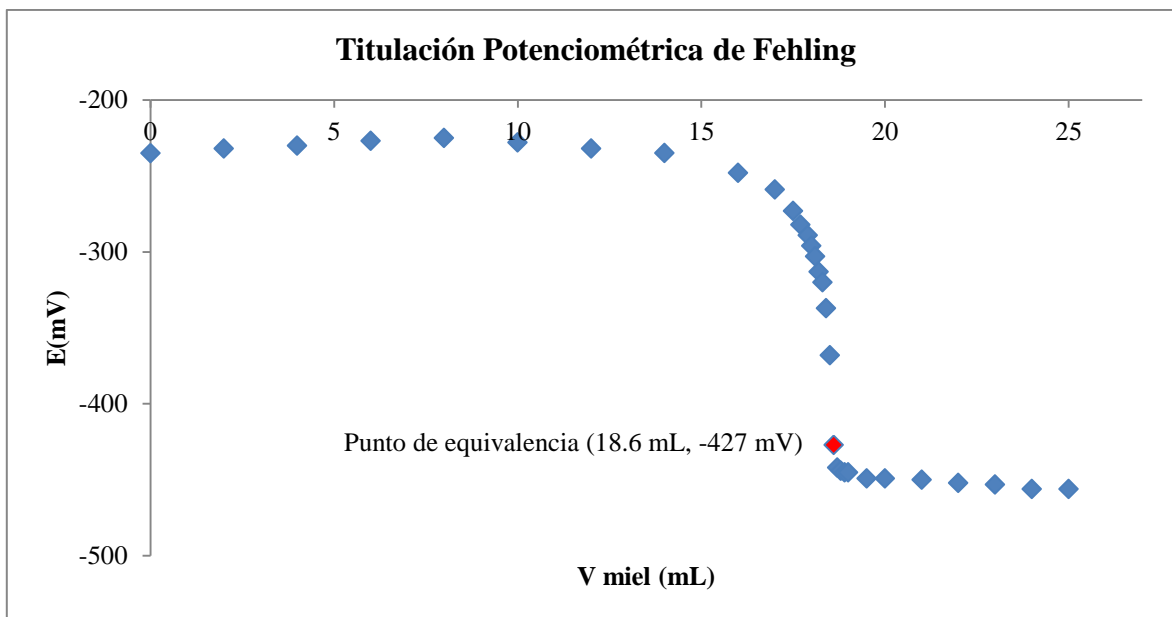


Figura 23. Titulación de 1.5845 mmoles de Cu(II) (5.0 mL de disolución 0.3169 mol.L<sup>-1</sup>) con disolución de la muestra 5, miel marca "Miel del Colmenar" (Disolución de 50.0 mL preparada a partir de una alícuota de 20.0 mL de disolución de 1.0135g de miel en 100.0 mL).

Para calcular el punto de equivalencia, se toma en cuenta que se localiza a 5/6 del cambio de potencial que se observa en la curva potenciométrica. Para este caso, antes que se observe la disminución abrupta del potencial, su valor es de -225 mV y el potencial final una vez que permanece constante es -456 mV, por lo que tenemos un cambio de potencial de 231 mV. Si calculamos los 5/6 de los 231 mV se obtiene como resultado 192.5 mV, por lo que el potencial en el punto de equivalencia sería el inicial (-225 mV) más el cambio de -192.5 mV, es decir -417.5 mV. Al observar la curva potenciométrica, se tiene que el valor más cercano es de -427 mV al que corresponde un volumen de disolución de miel añadido de 18.6 mL. Con esto se conoce que se requirieron de 18.6 mL de disolución de miel para que reaccionaran en su totalidad los 1.5845 mmoles de Cu (II).

Para calcular los mmoles de azúcares reductores que reaccionaron con los mmoles de Cu (II) se utiliza la relación estequiométrica de 1 mmol de azúcar reductor por 5 mmoles de Cu (II), posteriormente se calculan los miligramos de azúcares reductores utilizando la masa molar de 180.16 g.mol<sup>-1</sup>:

$$1.5845 \text{ mmol } Cu^{2+} \left( \frac{1 \text{ mmol Azúcar red.}}{5 \text{ mmol } Cu^{2+}} \right) = 3.1690 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.}$$

$$3.1690 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.} \left( \frac{180.16 \text{ mg Azúcar red.}}{1 \text{ mmol Azúcar red.}} \right) = 57.09 \text{ mg Azúcar red.}$$

Una vez calculados los miligramos de azúcares reductores que corresponden a los 18.6 mL de disolución de miel, se calculan para los 50.0 mL de disolución preparados:

$$57.09 \text{ mg Azúcar red.} \left( \frac{50.0 \text{ mL de disolución}}{18.6 \text{ mL de disolución.}} \right) = 153.47 \text{ mg Azúcar red}$$

Como se tomó una alícuota de 20.0 mL de la disolución original de miel (1.0135g en 100.0 mL), se calcula la masa de azúcares reductores que corresponde a la masa de miel original de la muestra:

$$153.47 \text{ mg Azúcar red.} \left( \frac{100.0 \text{ mL de disolución}}{20.0 \text{ mL de disolución.}} \right) = 767.37 \text{ mg Azúcar red}$$

Al tomar en cuenta que la masa de miel total fue de 1.0135g que equivalen a 1013.5 mg, se calcula el porcentaje de azúcares reductores:

$$\left( \frac{767.37 \text{ mg Azúcar red.}}{1013.5 \text{ mg de miel}} \right) 100\% = 75.72\% \text{ Azúcar red.}$$

Debido a que en este caso los azúcares reductores incluyen a la sacarosa hidrolizada, si restamos el valor anteriormente calculado (numeral 8.1.1.1.) donde no ha ocurrido la hidrólisis, se obtendrá como resultado el porcentaje debido a la sacarosa:

$$\text{Porcentaje de sacarosa: } 75.72\% - 71.88\% = 3.84\%.$$

Con este último cálculo se obtiene un porcentaje de 3.90% de sacarosa invertida para la muestra 5 de miel.

Los resultados obtenidos para todas las muestras se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados obtenidos en la determinación de sacarosa.

Muestra	Disolución de miel (mg <sub>miel</sub> / mL <sub>disolución</sub> )	V <sub>(mL)</sub> en punto de equivalencia	Porcentaje de azúcares reductores (con hidrólisis)	Porcentaje de azúcares reductores libres	Porcentaje de sacarosa
1	1059.0/100	18.00	74.88	71.01	3.87
2	1016.3/100	19.15	73.34	70.51	2.83
3	1018.7/100	18.20	76.98	73.42	3.56
4	1033.9/100	28.80	47.93	45.90	2.03
5	1013.5/100	18.60	75.72	71.88	3.84
6	1019.7/100	18.50	75.66	72.72	2.94
7	1046.4/100	19.00	71.79	69.48	2.31
8	1061.1/100	26.80	50.19	48.10	2.09
9	1064.8/100	18.30	73.50	71.95	1.55

El porcentaje de sacarosa según la Norma Salvadoreña para Miel de Abejas no puede exceder el 5%. Por lo tanto, podemos observar con los resultados obtenidos que todas las muestras cumplen la norma de manera satisfactoria.

Es de considerar que la muestra que posee el menor porcentaje corresponde a la miel Duteda de España. Por el contrario, existen dos muestras de miel que prácticamente poseen el mismo porcentaje el cual se encuentra cerca al 4%. Dichas mieles corresponden a la muestra 1 (Naturamiel, de la zona costera) y a la muestra 5 (Miel del Colmenar).

#### **4.1.8 RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.**

A continuación se presenta en la Tabla 13 un resumen de todos los resultados obtenidos en la determinación de los diferentes parámetros fisicoquímicos. Se observa que todas las mieles cumplen con la Norma Salvadoreña. De igual manera, en el caso de cenizas, todas las mieles cumplieron con el valor límite establecido por la Norma Mexicana.



Tabla 13. Resumen de resultados de la determinación de parámetros fisicoquímicos.

Muestra	Porcentaje Azúcares Reductores	Porcentaje Cenizas	Porcentaje Fructosa	HMF (ppm)	Porcentaje Humedad	pH	Porcentaje Sacarosa
1	71.01	0.1369	28.26	00.04	18.79	4.12	3.87
2	70.51	0.0501	24.21	27.24	18.19	4.04	2.83
3	73.42	0.0403	30.63	07.45	18.39	3.90	3.56
4	45.90	0.0277	07.64	29.82	17.39	4.23	2.03
5	71.88	0.0840	29.49	01.50	19.79	4.15	3.84
6	72.72	0.0488	22.77	10.01	18.99	3.92	2.94
7	69.48	0.1373	26.04	-----	18.99	4.09	2.31
8	48.10	-----	07.23	38.77	17.59	4.06	2.09
9	71.95	0.0884	29.32	53.49	18.79	4.20	1.55

La miel con mayor contenido tanto de azúcares reductores como de fructosa fue la muestra 3. Por el contrario, si no tomamos en cuenta los preparados alimenticios, la muestra 2 es la que presenta menos contenido en ambos criterios.

El contenido de HMF presentó un resultado muy particular, ya que hasta este momento las mieles con mayores o menores valores en los diferentes parámetros habían sido de origen salvadoreño. En este caso, la miel con mayor contenido en HMF fue la muestra 9, la miel de origen español. Esto indica que esta miel ha sido calentada. Por otro lado, las muestras 1 y 7 presentan los mejores resultados, ya que para la primera la cantidad de HMF es cercana a cero, mientras en la segunda el valor se encuentra por debajo del límite de detección del método.

En el caso del contenido de cenizas, las muestras 1 y 7 mostraron el mayor contenido de cenizas (0.1369% y 0.1373% respectivamente). Sin considerar los preparados alimenticios, las muestras de miel 3 (0.0403%) y 6 (0.0488%) presentaron el menor contenido.

Para el porcentaje de humedad, los resultados fueron más homogéneos. La mayoría de las muestras presentaron un contenido alrededor del 18%. La muestras 4 y 8 mostraron los

contenidos más bajos con 17% y la muestra 5 presentó el porcentaje mayor con 19%, por lo que esta miel es propensa a la fermentación.

En las determinaciones de pH de las muestras los valores rondaron por 4.0. Las mieles con pH más ácido fueron las muestras 3 y 6 (3.90). Los valores de pH menos ácidos correspondieron a las muestras 4 y 9 (4.20).

Finalmente, en el contenido de sacarosa, la muestra 1 es la que presenta el mayor contenido (3.87%), mientras que a la muestra 9 (miel española) corresponde el menor contenido (1.55%).

#### **4.2 APLICACIÓN DE LA POLAROGRAFÍA EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.**

Tal como se mencionó en la metodología experimental, a medida que se desarrolló el procedimiento se realizaron diferentes modificaciones de los factores que podían afectar la determinación, dichos factores se resumen a continuación, con las condiciones que han presentado mejores resultados:

- a) Tamaño de la alícuota de Cu(II): en los diferentes ensayos se trabajaron con alícuotas desde 20 hasta 80  $\mu\text{L}$ . Se optó por trabajar con volúmenes mayores debido a que si se trabajan con alícuotas muy pequeñas, cualquier error durante la adición se ve intensificado, es decir, representa un porcentaje mayor de error.
- b) Dilución de la disolución de Cu(II): en los diferentes ensayos se tomaron volúmenes entre 3.0 a 5.0 mL de disolución de Cu(II) a una concentración aproximada de 0.30  $\text{mol.L}^{-1}$  para ser utilizados en la reacción con azúcares reductores. Además de adicionar la disolución de tartratos, se agregaba una cantidad de agua desionizada la cual cumplía con dos objetivos: disminuir el error debido a la pérdida de volumen y utilizar una concentración la cual permitiera que la magnitud de las señales de corriente en el polarograma no fueran tan elevadas y que los cambios en dichas magnitudes fueran apreciables a medida que se adicionaban los azúcares reductores.

- c) Pérdida de volumen en el reactor: para minimizar los cambios de volumen que podían producirse en la pérdida de vapor por el calentamiento, se utilizó un tapón de hule para cerrar el frasco Erlenmeyer. Adicionalmente, éste se recubría con papel parafilm buscando de esta manera disminuir en la medida de lo posible la salida de vapor. Los resultados obtenidos muestran que estas medidas eran necesarias y que son suficientes para tener reproducibilidad y exactitud en los resultados
- d) Calentamiento en baño de maría: debido a que el calentamiento directo en la parrilla no permitía que el reactor permaneciera tapado por la presión del vapor, se utilizó el baño de maría como alternativa. Al realizar pruebas se encontró que con 3 minutos de calentamiento en el baño, el reactor alcanza una temperatura de 87°C, la cual es suficiente para que la reacción de Fehling se llevara a cabo. Debido a que con un minuto más, la disolución del reactor alcanza una temperatura cercana a los 89°C, se decidió fijar un tiempo de 5 minutos en el reactor con cada adición de azúcares reductores.

Con base en todos estos factores se decidió aplicar el procedimiento presentado en la metodología experimental con el que se obtuvieron resultados satisfactorios.

Antes de realizar esta metodología, se determinó la concentración de la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (aproximadamente 40 g en 500.0 mL) a emplear, utilizando el método de adiciones patrón y la señal de reducción del Cu (II) en el polarógrafo. La disolución patrón se preparó disolviendo 0.01627 g de Cu electrolítico con unas gotas de  $\text{HNO}_3$  concentrado y se aforó en un balón de 25.0 mL con agua desionizada. La concentración del patrón es de  $1.0241 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Para la determinación se utilizó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y se hicieron cuatro adiciones de 100  $\mu\text{L}$  de la disolución patrón de Cu (II). Como electrolito soporte se añaden 5.0 mL de la disolución de tartratos que se utiliza en la determinación de azúcares reductores, diluida con 5.0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada.

Las curvas obtenidas por polarografía diferencial de impulsos se presentan en la Figura 24.

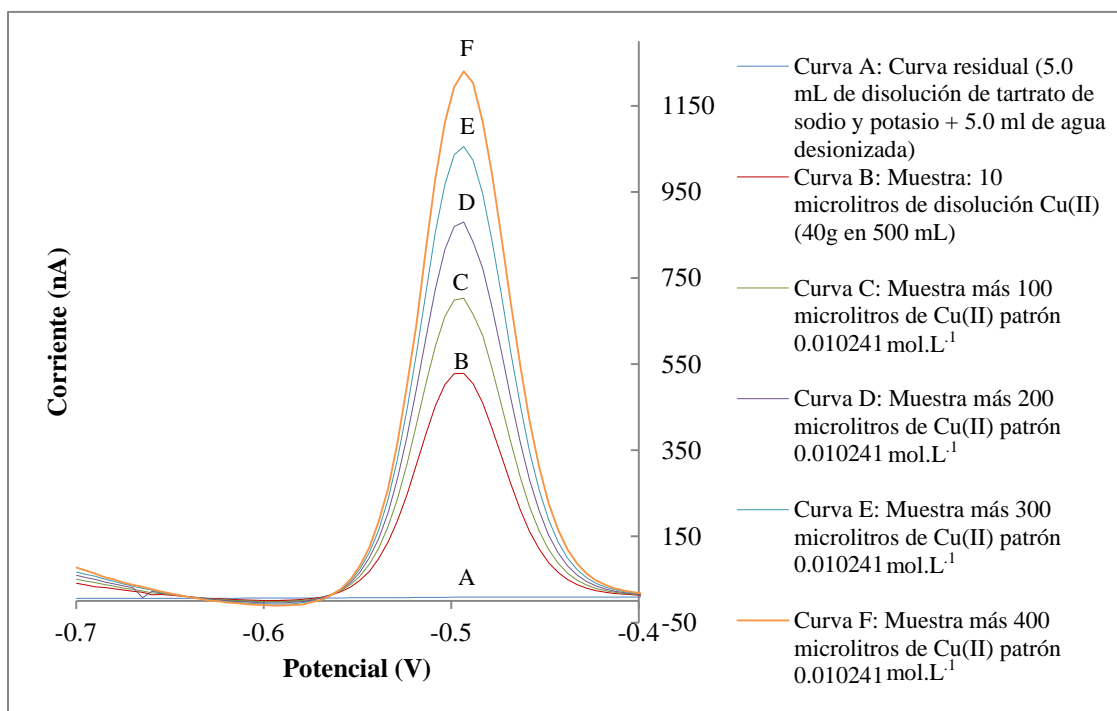


Figura 24. Polarogramas de determinación de concentración de Cu (II) por adiciones patrón.

Con los polarogramas obtenidos se midieron las alturas de los picos de las señales de reducción de Cu(II). De igual manera como se realizó en la determinación de fructosa y HMF, se calculó la cantidad de Cu (II) añadido con cada una de las adiciones patrón. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Magnitudes de corriente de las señales de Cu (II) a partir de adiciones patrón.

<b>V<sub>μL</sub> de patrón añadido.</b>	<b>μmoles de patrón añadido.</b>	<b>I (nA)</b>
0	0.0000	520
100	1.0241	695
200	2.0482	873
300	3.0723	1050
400	4.0964	1220

A partir de los resultados anteriores, se grafica la intensidad de corriente contra el volumen de Cu(II) patrón añadido según el método de adiciones patrón, como se presenta en la Figura 25.

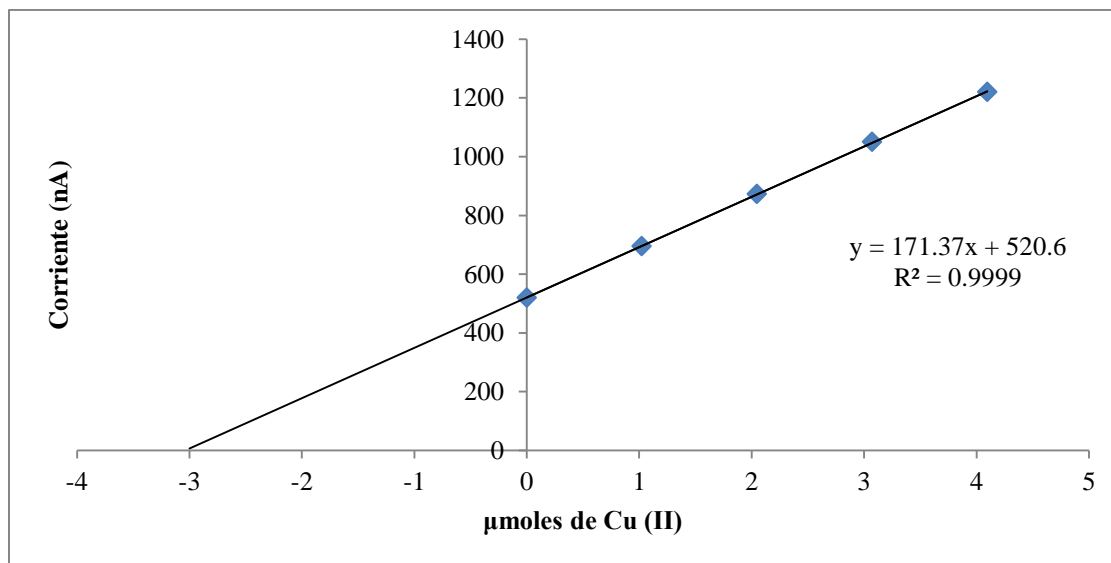


Figura 25. Intensidad de corriente contra volumen de Cu (II) patrón añadido.

A partir de la ecuación obtenida de la correlación lineal, se determina el contenido de Cu (II) en la muestra, que corresponde al de la abscisa al origen, el cual fue de 3.038 μmoles.

Por lo tanto, se obtiene que para la adición de 10 μL de la disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  corresponden 3.038 μmoles, teniéndose una concentración de  $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Tal como se describió en la metodología, se adicionaron en el reactor, 3.0 mL de la disolución de Cu(II), 5.0 mL de la disolución de tartrato de sodio y potasio y 22.0 mL de agua desionizada, de esta manera se diluye la concentración del Cu (II) a la décima parte (3.0 mL de Cu (II) en 30.0 mL totales). Con respecto a las alícuotas de glucosa provenientes del reactor, se tomaron 80μL tanto en el inicio como después de cada adición de glucosa; cada adición de glucosa fue de 2.0 mL. El volumen total de disolución de glucosa adicionado fue de 6.0 mL.

En la Figura 26 se presenta el polarograma obtenido por las adiciones de las alícuotas de 80 μL de disolución de Cu (II); el intervalo de potencial de trabajo fue de -0.70 a -0.35 V. Por otro lado, en la Tabla 15 se presenta el resumen de los cálculos para la determinación de glucosa.

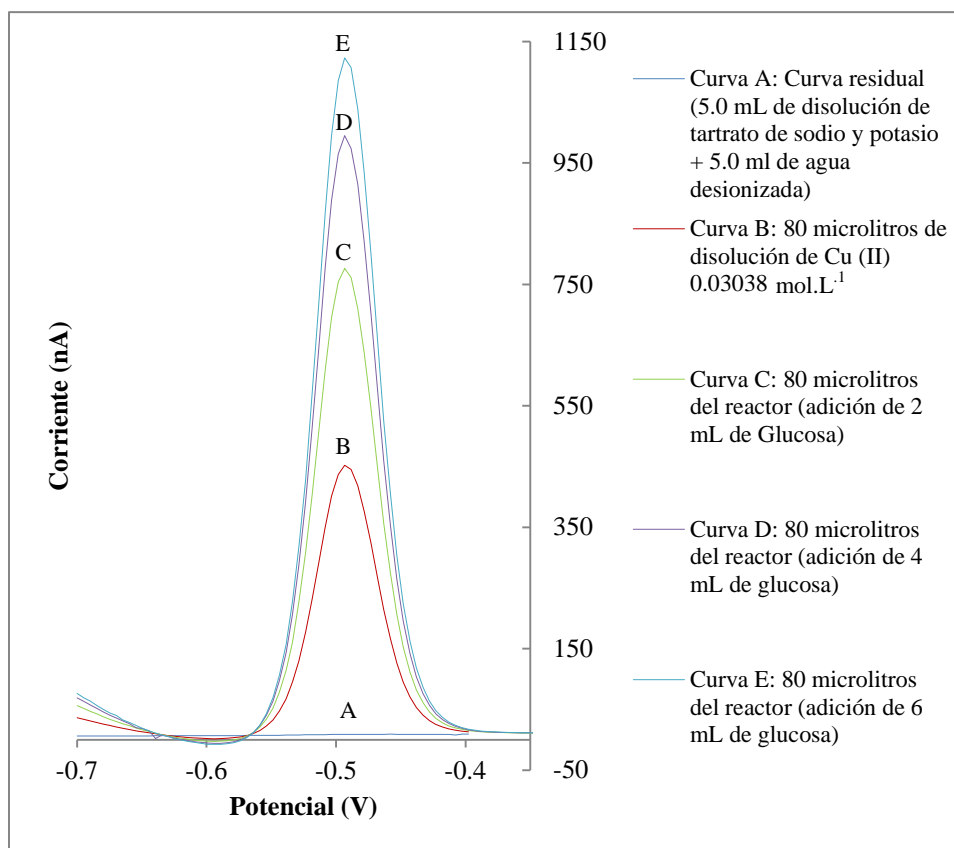


Figura 26. Polarograma obtenido en la determinación de glucosa.

Tabla 15. Resumen de los cálculos realizados en la determinación de glucosa

<b>V<sub>(mL)</sub> de Glucosa</b>	<b>V<sub>(μL)</sub> de alícuota de Cu (II)</b>	<b>I (nA)</b>	<b>Aumento de I (nA)</b>	<b>Corrección por dilución ((30+V<sub>Glucosa</sub>)/30)</b>
0	80	445.00	445.00	445.00
2	80	771.00	326.00	347.73
4	80	991.00	220.00	249.30
8	80	1120.00	129.00	154.80

La gráfica obtenida para la titulación amperométrica a potencial impuesto se presenta a continuación en la Figura 27.

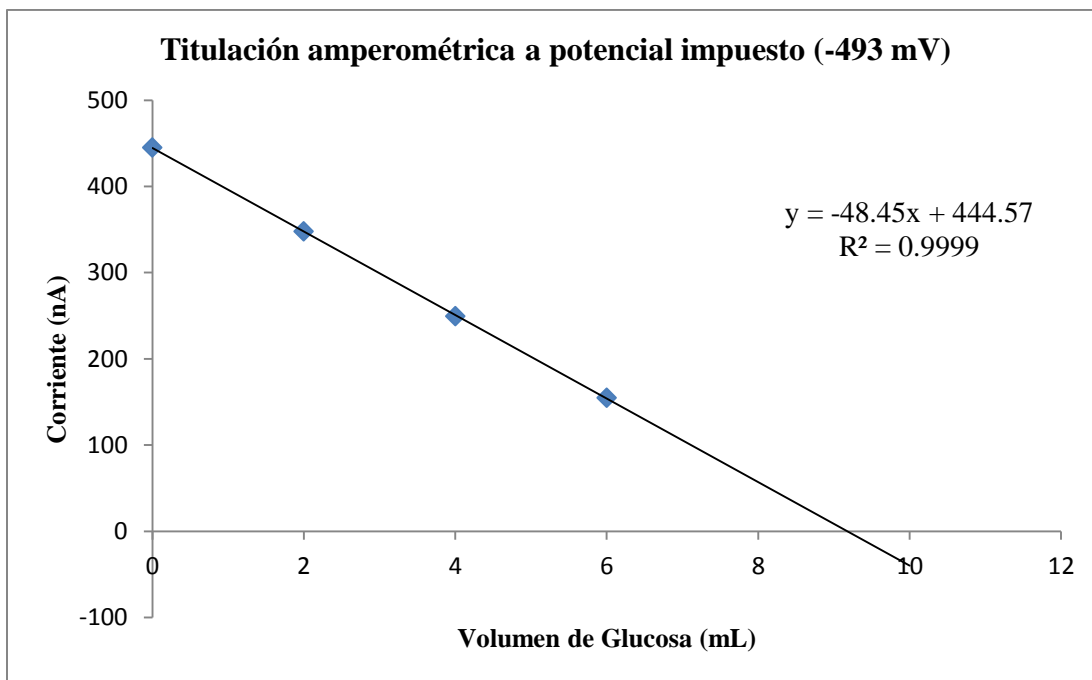


Figura 27. Titulación de 0.9194 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  (3.0 mL de disolución 0.3038  $\text{mol.L}^{-1}$ ) con disolución de glucosa 0.0200  $\text{mol.L}^{-1}$  (0.9008 g en 250.0 mL).

Debido a que se utilizaron 3.0 mL de la disolución de Cu (II) 0.3038  $\text{mol.L}^{-1}$ , los mmoles de glucosa que corresponden al volumen en el punto de equivalencia son 0.1823.

Al utilizar la ecuación de la relación que presenta la gráfica, se calculó que el volumen al punto de equivalencia es de 9.18 mL. Al dividir los 0.1823 mmoles de glucosa entre los 9.18 mL, obtenemos una concentración de 0.01987  $\text{mol.L}^{-1}$ . Si comparamos la concentración de la glucosa (la concentración de disolución de glucosa para esta prueba es de 0.02000  $\text{mol.L}^{-1}$ ), con la calculada experimentalmente, se tiene que el porcentaje de diferencia es únicamente de 0.67%.

Esta metodología además de presentar buenos resultados, también implica la utilización de Cu (II) en menores cantidades. Al tomar este último resultado como base, podrían buscarse las condiciones para llevar a cabo una titulación amperométrica de potencial impuesto para determinar azúcares reductores en miel. Si se hicieran adiciones de 1.0 mL de disolución de miel se esperaría que con 3.0 mL de disolución de Cu (II) de concentración 0.3038  $\text{mol.L}^{-1}$  pudieran titularse dos muestras a la vez, lo cual representa un gran ahorro de reactivo con respecto a la utilización de la titulación potenciométrica donde únicamente se determina una muestra con 5.0 mL de disolución de Cu (II). Mucho más ventajas pueden observarse

de ahorro de reactivo con respecto al método de Lane-Eynon que establece la norma oficial. Por otro lado, el tiempo de análisis es mucho más corto. La determinación para dos muestras podría hacerse en el tiempo en el cual se analiza únicamente una muestra por titulación potenciométrica. Además puede llegar a tenerse más certeza con esta metodología una vez realizado el análisis estadístico respectivo, obteniendo datos relevantes como el límite de detección.

Una vez encontradas las condiciones de trabajo con la disolución de glucosa, se procedió a hacer la prueba con una muestra de miel (muestra 3). Se utilizaron 3.0 mL de la disolución de Cu(II)  $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$ , 5.0 mL de la disolución de tartrato de sodio y potasio y 22.0 mL de agua desionizada en el reactor. En este caso se utilizó el Polarógrafo Radiometer, por lo que las magnitudes de las señales de corriente son diferentes al del caso anterior. Las curvas correspondientes se presentan en la Figura 28.

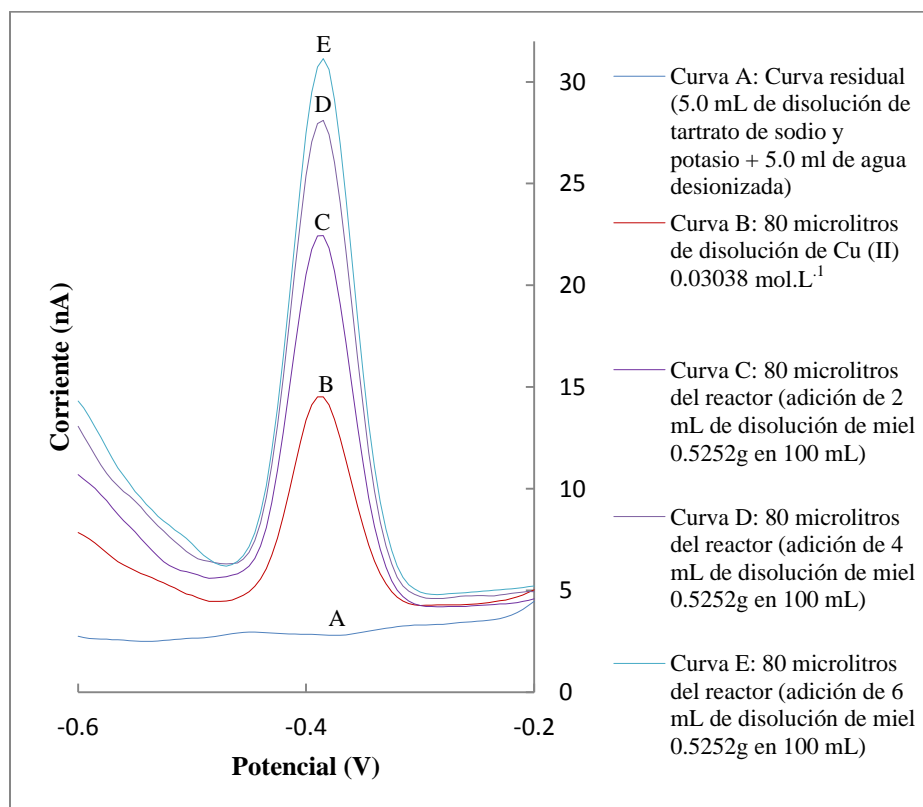


Figura 28. Polarogramas de la determinación de azúcares reductores de la muestra 3 de miel.



Las alícuotas tomadas fueron de 80 $\mu$ L y las adiciones de disolución de miel de 2.0 mL. El volumen total adicionado de disolución de miel fue de 6.0 mL.

Con base en los polarogramas obtenidos en la determinación (Figura 28) se presenta en la Tabla 16 el resumen de los cálculos para la determinación de azúcares reductores en la muestra de miel.

Tabla 16. Resumen de los cálculos realizados en la determinación de azúcares reductores en una muestra de miel por polarografía.

V <sub>(mL)</sub> de Glucosa	V <sub>(<math>\mu</math>L)</sub> de alícuota de Cu (II)	I (nA)	Aumento de I (nA)	Corrección por dilución ((30+V <sub>Glucosa</sub> )/30)
0	80	10.146	10.146	10.146
2	80	17.546	7.401	7.894
4	80	22.575	5.029	5.700
6	80	25.581	3.006	3.607

La gráfica para la titulación amperométrica a potencial impuesto se muestra a continuación en la Figura 29.

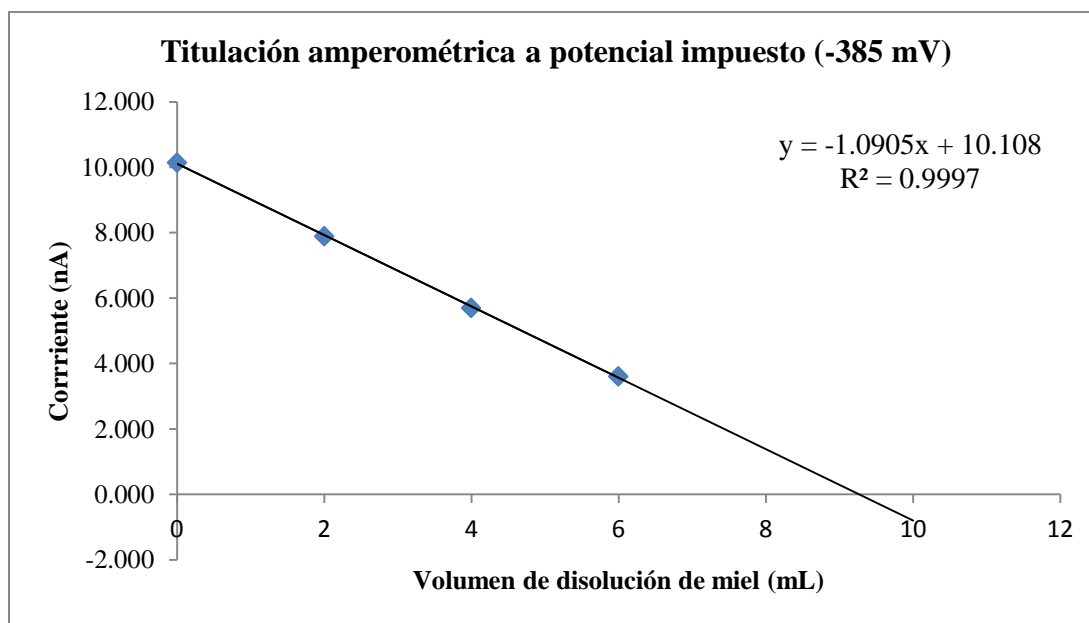


Figura 29. Titulación de 0.9114 mmoles de Cu<sup>2+</sup> (3.0 mL de disolución 0.3038 mol.L<sup>-1</sup>) con disolución de muestra de miel 3 (0.5252 g en 100.0 mL).

Al utilizar la ecuación que expresa la relación de la gráfica, se calculó que el volumen al punto de equivalencia es de 9.27 mL. Recordando que se utilizó la misma cantidad de Cu(II) que en el caso anterior ( $9.114 \times 10^{-1}$ )

Con los resultados anteriores y conociendo que la muestra se preparó disolviendo 0.5252 g de miel en 100 mL, se realizan los cálculos respectivos:

$$9.114 \times 10^{-1} \text{ mmol } Cu^{2+} \left( \frac{1 \text{ mmol Azúcar red.}}{5 \text{ mmol } Cu^{2+}} \right) = 1.823 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.}$$

$$1.823 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.} \left( \frac{180.16 \text{ mg Azúcar red.}}{1 \text{ mmol Azúcar red.}} \right) = 32.84 \text{ mg Azúcar red.}$$

$$32.84 \text{ mg Azúcar red.} \left( \frac{100 \text{ mL de disolución}}{9.27 \text{ mL de disolución.}} \right) = 354.29 \text{ mg Azúcar red}$$

$$\left( \frac{354.29 \text{ mg Azúcar red.}}{525.20 \text{ mg de miel}} \right) 100\% = 67.46\% \text{ Azúcar red.}$$

Para comparar resultados, se determinaron los azúcares reductores de la miel con la misma disolución de Cu (II) por titulación potenciométrica, y se obtuvo la curva de la Figura 30.

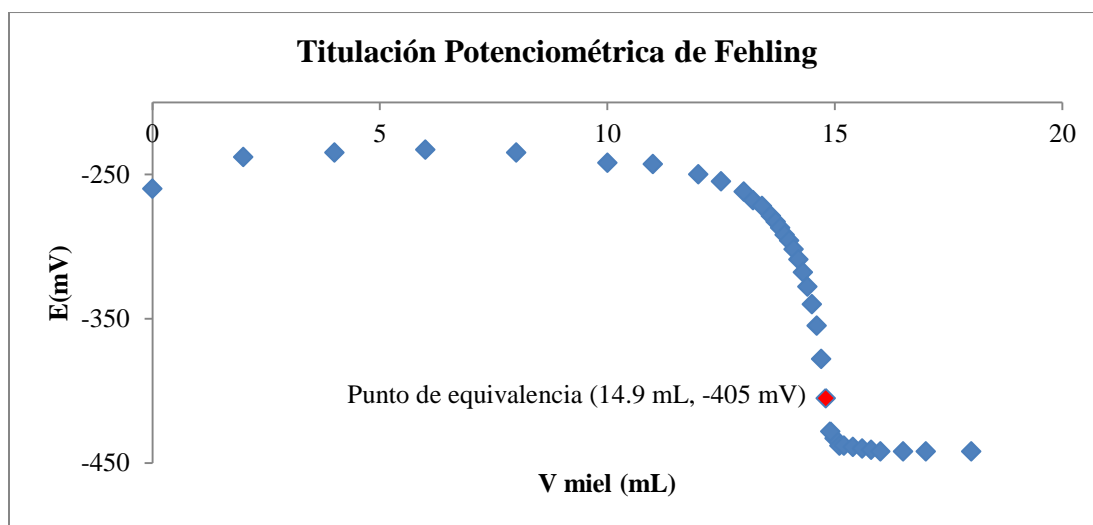


Figura 30. Titulación de 1.519 mmoles de  $Cu^{2+}$  (5 mL de disolución  $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$ ) con disolución de muestra 3 de miel (525.2 mg en 100 mL)

Como para la titulación se utilizaron 5.0 mL de disolución de Cu (II) 0.3038 mol.L<sup>-1</sup> (1.5190 mmoles) y que el volumen en el punto de equivalencia es de 14.9 mL se procede a realizar los cálculos respectivos:

$$1.5190 \text{ mmol Cu}^{2+} \left( \frac{1 \text{ mmol Azúcar red.}}{5 \text{ mmol Cu}^{2+}} \right) = 3.0380 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.}$$

$$3.0380 \times 10^{-1} \text{ mmol Azúcar red.} \left( \frac{180.16 \text{ mg Azúcar red.}}{1 \text{ mmol Azúcar red.}} \right) = 54.73 \text{ mg Azúcar red.}$$

$$54.73 \text{ mg Azúcar red.} \left( \frac{100 \text{ mL de disolución}}{14.8 \text{ mL de disolución.}} \right) = 369.80 \text{ mg Azúcar red}$$

$$\left( \frac{367.33 \text{ mg Azúcar red.}}{525.20 \text{ mg de miel}} \right) 100\% = 70.42\% \text{ Azúcar red.}$$

Se observa que los resultados obtenidos son cercanos en ambos métodos (67.46% por titulación amperométrica y 69.94% por titulación potenciométrica).

Con base en estos resultados puede concluirse que la titulación amperométrica a potencial impuesto puede en un futuro sustituir a la titulación potenciométrica en la determinación de azúcares reductores en miel, una vez que se hayan establecido las condiciones óptimas de trabajo que permitan inclusive minimizar aún más la cantidad de reactivo y tiempo de análisis, y por supuesto, un análisis estadístico más amplio para establecer sin dudas la reproducibilidad del método. Con esto último, es importante recalcar que en la mayoría de las pruebas realizadas, el porcentaje de error fue menor o cercano al 5% con respecto a la concentración de la glucosa.

## 5. CONCLUSIONES

- 1) Según la Norma Salvadoreña para Miel de Abeja (NSO 67.19.01:08), todas las muestras estudiadas cumplen con el requisito mínimo de contenido en azúcares reductores (60%). En el caso de los preparados alimenticios con base de miel, propóleos y polen, no es posible saber si cumplen con los requisitos ya que la Norma Salvadoreña para Preparados Alimenticios con Miel de Abejas (NSO 67.38.02:05) únicamente establece requisitos para las mieles utilizadas en su preparación.
- 2) La Norma Salvadoreña no contempla el contenido de cenizas en la miel de abeja. Sin embargo, si se emplea la Norma Mexicana para Miel (NMX-F-036-2006) la cual sí contempla este requisito, todas las muestras cumplieron al no superar el contenido máximo de cenizas de 0.60%.
- 3) El contenido de fructosa no está contemplado ni en la Norma Salvadoreña ni en la Mexicana, sin embargo, puede observarse que en las mieles, el porcentaje se encontró entre el 20 y 30%, el cual puede considerarse normal. Es de notar que las mieles a las cuales se les percibió un sabor muy dulce, son las que poseen un contenido de fructosa superior al 25%.
- 4) En esta investigación, debido a que las muestras de El Salvador provienen de una región tropical, la Norma Salvadoreña establece un límite máximo de 80 ppm para contenido de HMF, por lo que se concluye que todas las muestras cumplen dicho requisito, ya que la miel Salvadoreña con mayor contenido en HMF fue de 38.77 ppm. Sin embargo, la miel Española no cumpliría con la norma ya que al no provenir de una región tropical, el límite máximo permitido es de 40 ppm y esta miel tiene un contenido de 53.49 ppm. Esto nos indica que esta miel estuvo expuesta al calentamiento.
- 5) Todas las muestras cumplen con el requisito establecido por la Norma Salvadoreña para el contenido de humedad (20% máximo). Sin embargo, es de tomar en cuenta que la muestra 5 posee un porcentaje muy cercano (19.79%) por lo que es la más susceptible de fermentar.

- 6) El valor de pH no se encuentra establecido por ninguna de las normas utilizadas en este trabajo. Sin embargo, se observa que todas las muestras presentaron valores de pH cercanos a 4.0. Siendo los valores menores de 3.90. Es de tener en cuenta estos valores, ya que un pH muy ácido también contribuye a la fermentación.
- 7) Todas las mieles cumplen con el contenido máximo permitido de sacarosa establecido por la Norma Salvadoreña (5%). Los valores para todas las muestras oscilaron entre el 1 y 4%.
- 8) De manera general, podemos concluir que los métodos electroquímicos aplicados a la determinación de parámetros fisicoquímicos traen ventajas importantes respecto a los métodos convencionales establecidos. Estos nos llevan a la utilización de menor cantidad de reactivo y a la reducción del tiempo de análisis.
- 9) La polarografía diferencial de impulsos es una técnica electroquímica que se presenta como una gran herramienta con diversidad de aplicaciones en la determinación de los parámetros fisicoquímicos en miel.
- 10) La determinación de azúcares reductores al utilizar titulaciones amperométricas a potencial impuesto con la ayuda de la polarografía diferencial de impulsos se presenta como una gran oportunidad para mejorar dicho método. Actualmente, se han establecido condiciones para titular una miel con 3.0 mL de disolución de Cu (II), lo cual es un avance con respecto a los 5.0 mL que se utilizan en la titulación potenciométrica, normalmente. Sin embargo, al mejorar aún más las condiciones experimentales, se considera que en un futuro podrían analizarse 3 muestras con 5.0 mL utilizados para determinar una muestra por potenciometría. Un tratamiento estadístico podría dar mucha más seguridad de los resultados en esta determinación.

## 6. RECOMENDACIONES

- 1) En la determinación de azúcares reductores por potenciometría debe dejarse cierta cantidad de tiempo entre cada adición para que la reacción ocurra (especialmente al inicio, donde los volúmenes añadidos son hasta de 2.0 mL lo cual enfría la disolución). Sin embargo, no deben dejarse tiempos muy largos ya que el volumen de la disolución disminuye por la ebullición y por lo tanto trae problemas de lectura en el milivoltímetro.
- 2) En todas las determinaciones por polarografía que implican la adición volúmenes pequeños (microlitros), se recomienda probar las puntas antes de realizar las adiciones, asegurándose que estas no estén dañadas y depositen el líquido de manera adecuada.
- 3) Las metodologías presentadas en este trabajo podría ser utilizadas para conocer la composición promedio de miel producida en El Salvador, diferenciando tanto la zona como el tipo de floración. Por otro lado, podría tomarse la iniciativa de iniciar la determinación de parámetros fisicoquímicos con estos nuevos métodos para el control de calidad de miel a exportar.
- 4) Respecto a la propuesta de determinación de azúcares reductores aplicando la polarografía diferencial de impulsos, debe continuarse con su estudio para optimizar condiciones de trabajo. Por otro lado, para que esta prueba pueda utilizarse como un análisis de rutina en el futuro, debe realizarse la validación respectiva del método.

## 7. 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. Choto, D., Ruiz, M. (2012). *Capacitan a apicultores para mejorar producción de miel*. El Diario de Hoy. Revisado el 22 de abril de 2013. Tomado de <http://goo.gl/P03eK>
3. 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.
4. Juárez Mendoza, D. (2003). *Determinación electroquímica de HMF (5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído) en miel de abeja*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
5. Preza de la Vega, J. (2007). *Estudio electroquímico aplicando a la cuantificación de azúcares en mieles*. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Xolalpa Aroche, A. (2010). *Evaluación de características de inocuidad y calidad en mieles mexicanas*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
7. Echazarreta González, C.M., Arellano Rodríguez, J.A., Pech Moo, C. (2002). *Apicultura en Mesoamérica*. México. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.
8. Vásquez, L.E. (2006). *Plan de Negocio para el Proyecto de Producción y Comercialización de Miel de Abeja ejecutado por el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, en el Municipio de Moncagua, Departamento de San Miguel*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Economía. Universidad “Dr. José Matías Delgado”.
9. Pérez, G., Salcedo, D., Aris, R. (2004). *El Salvador. Estrategia de Crecimiento Económico Rural y Reducción de la Pobreza: Estudio de Casos de Cadenas de Valor Agrícolas y no Agrícolas. Tomo II*. El Salvador. Comité Interinstitucional: MAG – RUTA – DFID – IFAD – IICA-IFPRI-FORTALECE.
10. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2009). *Miel de Abejas. Especificaciones*. NSO 67.19.01:08. Segunda Actualización. El Salvador.

11. 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.
12. McMurry, J.(2008). *Organic Chemistry* (7<sup>th</sup> ed.). USA. Thomson.
13. Piazza, M., Accorti, M.G., Oddo, L.P. (1991). *Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys*. Apicultura 7.
14. International Programme on Chemical Safety (2004). *Fichas Internacionales de Seguridad Química: Fructosa*. Tomado de <http://goo.gl/cH12r>
15. DeMan, J.M. (1999). *Principles of Food Chemistry*. USA. Aspen Publishers.
16. 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.
17. Dirección General de Normas (1984). *Determinación del Grado Brix en Muestras de Meladura; Masas Conocidas; Mieles "A" y "B" de Refinería y Miel Final. Por método Hidrométrico*. NMX-F-274.1984. México.
18. International Programme on Chemical Safety (2004). *Fichas Internacionales de Seguridad Química: Sacarosa*. Tomado de <http://goo.gl/4LfRF>
19. Vargas Fogaça, J.R. *Sacarose ou Açúcar Comum*. Revisado el 15 de Junio de 2013. Tomado de <http://goo.gl/80EQM>
20. Charlot, G. (1975). *Curso de Química Analítica General: Métodos Electroquímicos y Absorciométricos. Cromatografía. Tomo II*. (2<sup>a</sup>. Ed). Barcelona: Toray-Masson.
21. Harris, D.C. (2003). *Análisis Químico Cuantitativo*. (3<sup>a</sup>. Ed.). Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
22. Skoog, D.A., West, D. M., Holler, F.J. (2001). *Fundamentos de Química Analítica* (4<sup>a</sup>. Ed). Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
23. Pingarrón Carrazón, J. M., Sánchez Batanero, P. (2003) *Química Electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*. Primera reimpresión. Editorial Síntesis. Madrid, España.
24. Rubinson, K.A., Rubinson, J.E. (2001). *Análisis Instrumental* (1<sup>a</sup>. Ed.). Madrid: Pearson Educación S.A.



25. Gazcón Orta, N.E. (2012). *Aplicación de la Electroquímica Analítica al Control de Calidad de Productos Apícolas*. Tesis de Doctorado. Departamento de Ciencias Analíticas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Educación a Distancia. España
26. Universidad de Salamanca *Práctica de Refractometría*. Salamanca. Revisado el 16 de junio de 2013. Tomado de <http://goo.gl/FRBM0>
27. Pickering, W.F. (1980). *Química Analítica Moderna*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
28. Martínez Rodríguez, F. *Control de la Calidad en Uroanálisis*. Revisado el 16 de junio de 2013. Tomado de <http://goo.gl/81OXM>

## 8. ANEXOS

### OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR POLAROGRAFÍA.

En la metodología experimental se presentó un procedimiento el cual se considera más adecuado debido a los factores de pérdida de volumen y tamaño de alícuota que fueron encontrados. Sin embargo, para llegar a establecer dichas condiciones se llevaron a cabo varios ensayos. A continuación se presenta en resumen los resultados obtenidos en dichas ensayos que llevaron a establecer las condiciones presentadas en la metodología experimental.

Inicialmente, en el primer ensayo, se trazó un polarograma para identificar el intervalo de potencial en el cual la señal de reducción de Cu (II) fuera apreciable. Debido a que en la titulación potenciométrica de Fehling el Cu (II) se compleja con disolución de tartratos, se utilizó esta última al 50% (5.0 mL de disolución de tartrato de sodio y potasio + 5.0 ml de agua desionizada) como electrolito soporte para que el medio en la celda no fuera muy diferente al medio en la valoración potenciométrica.

Una vez establecido el electrolito soporte, se trazó el polarograma para observar el comportamiento de la curva residual con un intervalo de potencial de -2.0 a 0.50 V.

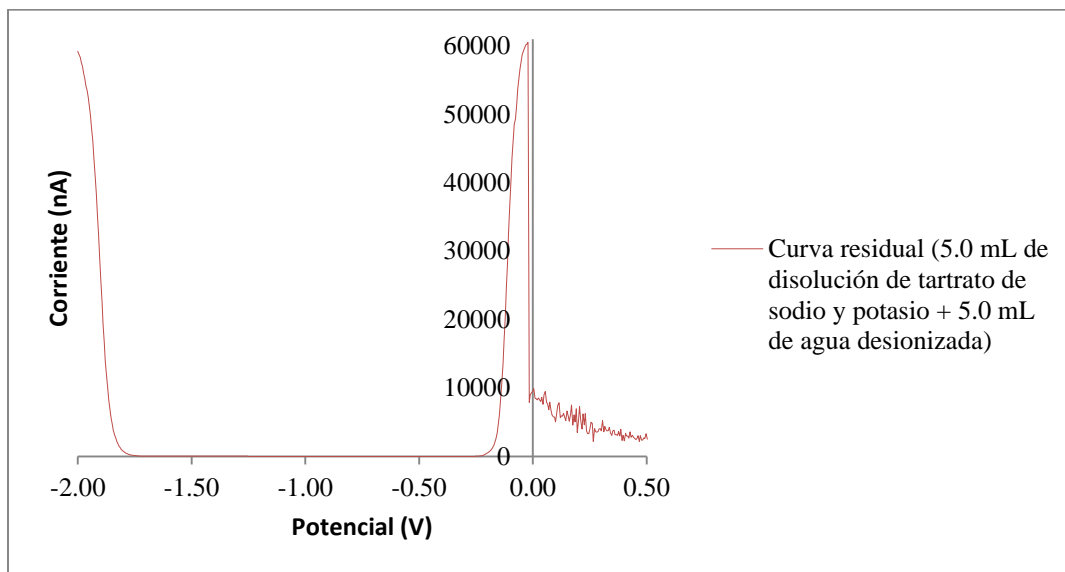


Figura 31. Polarograma de la disolución de tartrato de sodio y potasio como electrolito soporte.

Al observar el polarograma, se definió el intervalo de potencial de trabajo para determinar la señal de reducción de Cu (II), dicho intervalo se estableció entre -1.90 y -0.10 V. Además, este intervalo corresponde al dominio de electroactividad.

Con respecto a la disolución de Cu (II) en el reactor, se colocó en el matraz Erlenmeyer de 50.0 mL, 5.0 mL de disolución de Cu (II) de concentración  $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$  y 5.0 mL de disolución de tartratos. De la disolución del reactor se tomó una alícuota de  $20 \mu\text{L}$  y se adicionó a la celda electroquímica del polarógrafo, para identificar la señal de reducción de Cu (II). El polarograma obtenido se presenta a continuación en la Figura 32.

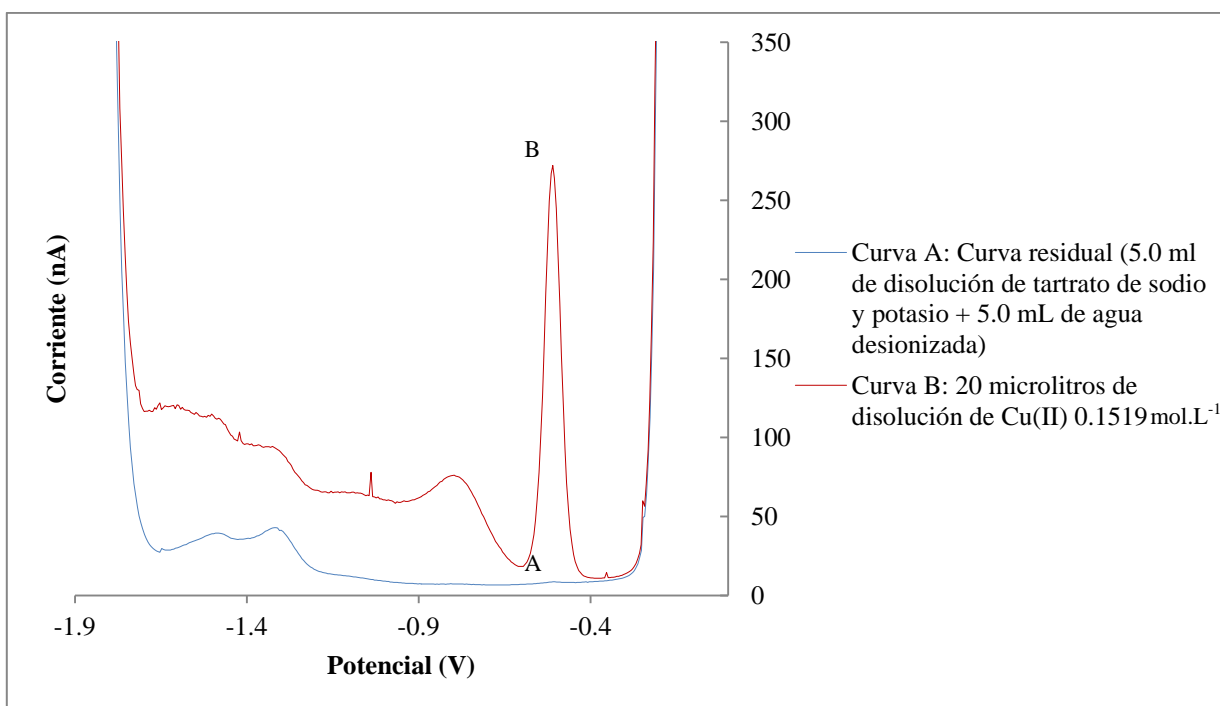


Figura 32. Polarogramas para la adición de una alícuota de disolución de Cu (II)

Entre -0.6 y -0.4 V se observa una señal la cual se espera fuera debida a la adición de Cu (II). Para comprobar que esta señal es debida a la reducción del Cu (II) se adicionó otra alícuota de  $20 \mu\text{L}$  con lo que se espera que esta señal se vea aumentada al doble de la anterior. La magnitud de corriente que corresponde a la altura del pico de la señal es de 272 nA. Para la siguiente medición se cambió el intervalo de potenciales para la exploración,

siendo este entre  $-1.10$  y  $-0.10$  V, pues no es necesario tener todas las señales debidas al medio. Los resultados obtenidos se presentan ejemplificados en la Figura 33.

Puede observarse en el polarograma que la nueva señal se ve aumentada precisamente en el mismo lugar que la anterior (entre  $-0.60$  y  $-0.40$  V). El hecho que la señal haya aumentado lleva a confirmar que se debe a la reducción de Cu (II).

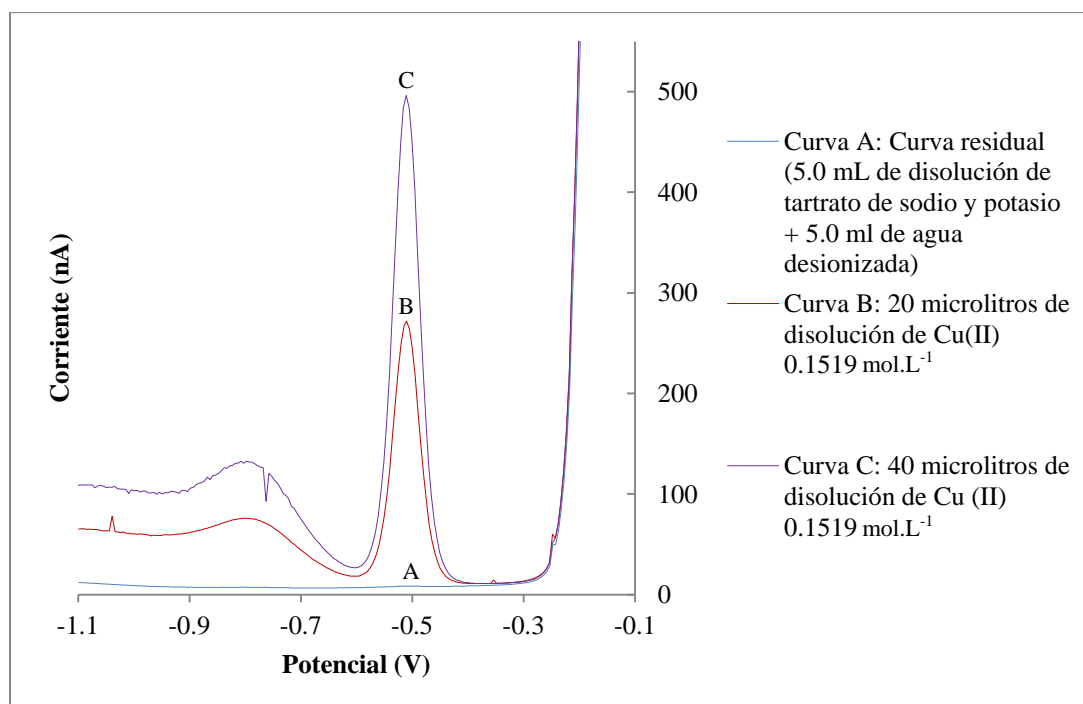


Figura 33. Polarogramas para la adición de dos alícuotas de disolución de Cu (II)

Una vez comprobado que puede determinarse la señal de reducción de Cu (II) se procedió con la determinación de la concentración de la disolución de glucosa como azúcar reductor. Se adicionaron al reactor 4.0 mL de disolución de glucosa y se tapó con la ayuda de un tapón de hule. El calentamiento se planifico desde un inicio con la ayuda de un baño de maría para que el calentamiento fuera uniforme y no de manera intensa. Al retirarlo del baño e intentar tomar la primera alícuota se observó que el líquido a esa temperatura no era retenido en la punta de la propipeta, razón por la cual se retiró del baño y se esperó un momento para que este se enfriara y poder tomar la alícuota. Este proceso de espera hacía que el procedimiento durara más tiempo de lo esperado.

La alícuota tomada del reactor fue de 20  $\mu\text{L}$  y se adicionó a la celda electroquímica del polarógrafo. Este procedimiento fue repetido para dos adiciones más de 4.0 mL de glucosa en el reactor, por lo que se obtuvieron 3 señales de corriente que corresponden a las adiciones de 4.0, 8.0 y 12.0 mL de disolución de glucosa. Para observar mejor los aumentos de corriente, en la adición de 8.0 mL de disolución de glucosa; la alícuota tomada fue de 40  $\mu\text{L}$  para las primeras y de 60  $\mu\text{L}$  para la adición de 12.0 mL. El siguiente polarograma muestra en su totalidad todas las adiciones de disolución de Cu (II) tomadas del reactor (Figura 34).

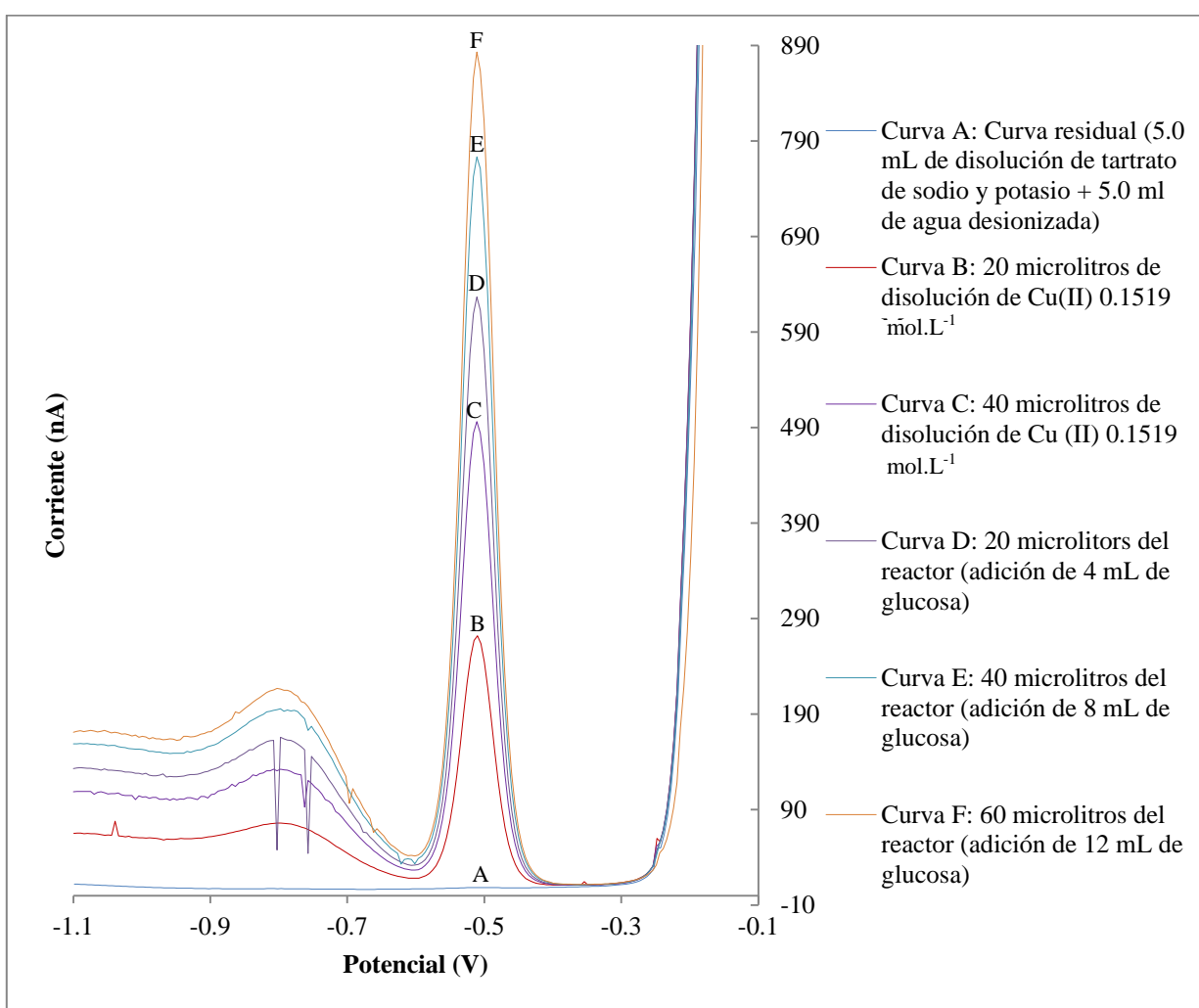


Figura 34. Polarogramas de la primera determinación de azúcares reductores.

A partir de los polarogramas se midieron las magnitudes de corriente correspondientes a la altura de cada uno de los picos de las señales. Los resultados se presentan en la Tabla 17:

Tabla 17. Magnitudes de corriente obtenidas en la primera determinación de azúcar reductor (glucosa) por polarografía.

<b>V<sub>(mL)</sub> de disolución de Glucosa</b>	<b>V<sub>(μL)</sub> de alícuota de Cu (II)</b>	<b>I (nA)</b>
0	20	272
0	20	496
4	20	627
8	40	773
16	60	883

Para trazar la gráfica de la titulación amperométrica a potencial impuesto, debemos de considerar los incrementos de corriente con respecto a la adición anterior, ya que esa diferencia será la que corresponda a la cantidad de Cu (II) que va quedando en la disolución a medida que reacciona con la glucosa. Sin embargo, para que la disminución de la corriente sea apreciable debido al consumo de Cu (II) por la reacción con glucosa, debe de corregirse el aumento de corriente en dos sentidos:

- a) Corregir el aumento de corriente por tamaño de la alícuota: Si en una adición se utilizó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  y en la siguiente 40  $\mu\text{L}$ , el aumento en la corriente que se apreciará no corresponderá a la disminución de moles de Cu(II) con respecto a la adición anterior ya que se está adicionando el doble de volumen y por consiguiente el doble de la cantidad de moles de Cu (II). Para realizar la corrección, dividimos ese aumento de corriente entre 2, de esa manera se obtiene el aumento de corriente si se hubiera adicionado únicamente 20 y no 40  $\mu\text{L}$ . En el caso de la alícuota de 60  $\mu\text{L}$  la magnitud del aumento de corriente deberá dividirse entre 3.
- b) Corregir el aumento de corriente por efecto de dilución: En cada una de las adiciones de glucosa, el volumen del reactor se varía considerablemente. En este caso, el reactor inicia con un volumen de 10.0 mL y finaliza con un volumen de 22.0 mL. Para corregir

el efecto que posee la dilución en el aumento de corriente se utilizó un factor de dilución. Para la primera adición (4.0 mL) de glucosa el factor es de (14.0/10.0), en la segunda adición (8.0 mL) es de (18.0/10.0) y en la tercera adición de glucosa (12.0 mL) de (22.0/10.0).

Con base a estas correcciones se proceden a realizar los cálculos respectivos:

- Para un volumen de 4.0 mL de disolución de glucosa añadido:

$$\text{Aumento de corriente: } 627.00 \text{ nA} - 496.00 \text{ nA} = 131.00 \text{ nA}$$

a) Corrección por tamaño de la alícuota:

No es necesario ya que la alícuota tomada fue de 20  $\mu\text{L}$  de igual manera que para la adición anterior.

b) Corrección por efecto de dilución:

$$131.00 \text{ nA} \left( \frac{14.0 \text{ mL}}{10.0 \text{ mL}} \right) = 183.40 \text{ nA}$$

- Para un volumen de 8.0 mL de disolución de glucosa añadido:

$$\text{Aumento de corriente: } 773.00 \text{ nA} - 627.00 \text{ nA} = 146.00 \text{ nA}$$

a) Corrección por tamaño de la alícuota:

$$146.00 \text{ nA} \left( \frac{20.0 \mu\text{L}}{40.0 \mu\text{L}} \right) = 73.00 \text{ nA}$$

b) Corrección por efecto de dilución:

$$73.00 \text{ nA} \left( \frac{18.0 \text{ mL}}{10.0 \text{ mL}} \right) = 131.40 \text{ nA}$$

- Para un volumen de 12.0 mL de disolución de glucosa añadido:

$$\text{Aumento de corriente: } 883.00 \text{ nA} - 773.00 \text{ nA} = 110.00 \text{ nA}$$

a) Corrección por tamaño de la alícuota:

$$110.00 \text{ nA} \left( \frac{20.0 \mu\text{L}}{60.0 \mu\text{L}} \right) = 36.67 \text{ nA}$$

b) Corrección por efecto de dilución:

$$36.67 \text{ nA} \left( \frac{22.0 \text{ mL}}{10.0 \text{ mL}} \right) = 80.67 \text{ nA}$$

Con estos cálculos se obtiene la cantidad de corriente producida por la reducción de Cu (II) a medida que se adicionan volúmenes de disolución de glucosa. Puede observarse

cómo dicha corriente va disminuyendo debido a la presencia de menos Cu (II) a medida que este va reaccionando con más glucosa en cada una de las adiciones (Tabla 18).

Tabla 18. Corrientes calculadas debidas a la presencia de Cu (II) con adiciones de diferentes volúmenes de disolución glucosa.

<b>V<sub>(mL)</sub> de disolución de glucosa</b>	<b>I (nA)</b>
0	272.00
4	183.40
8	131.40
12	80.67

Al graficar la magnitud de corriente calculada contra el volumen de glucosa añadido, se espera la gráfica de una línea recta. El punto de equivalencia se calcula cuando la magnitud de corriente es cero. Esto se debe a que si en el punto de equivalencia todo el Cu(II) ha reaccionado con glucosa, al añadir más glucosa y tomar una alícuota y trazar el polarograma, la magnitud de corriente debido a la señal de Cu (II) sería la misma ya que no se habría adicionado más Cu(II) y por lo tanto el aumento de corriente sería 0.

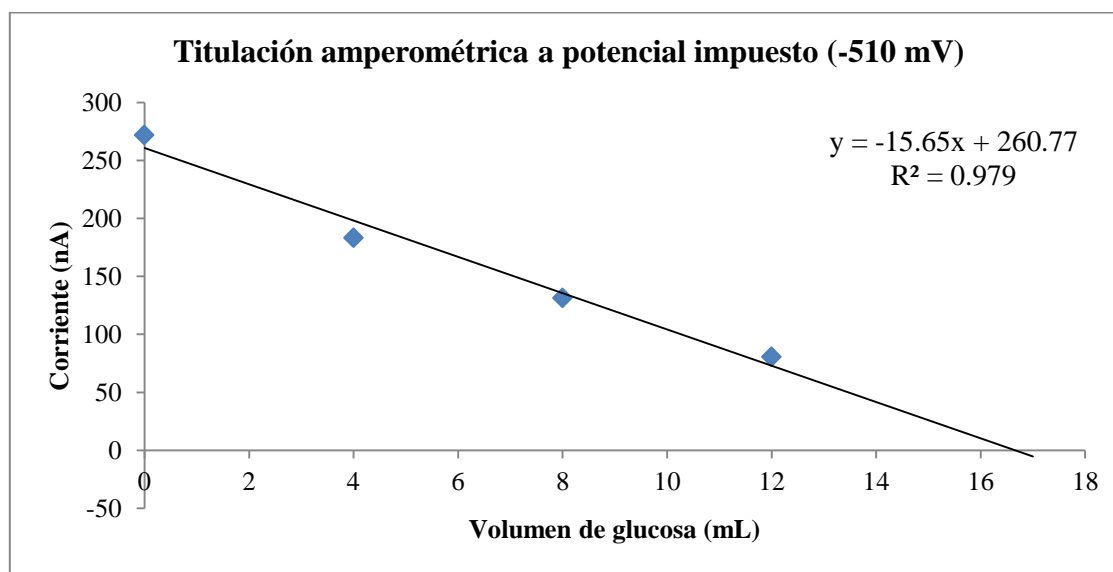


Figura 35. Titulación de 1.5190 mmoles de Cu<sup>2+</sup> (5.0 mL de disolución 0.3038 mol.L<sup>-1</sup>) con disolución de glucosa 0.0202 mol.L<sup>-1</sup> (0.9102 g en 250.0 mL).



Una vez trazado el gráfico, podemos observar que la tendencia lineal está presente, pero si se observa el coeficiente de correlación lineal, dicha tendencia lineal no es muy buena ( $R^2 = 0.979$ ), por lo que se concluye que hubo errores durante la determinación. El principal puede identificarse fácilmente, ya que como se vio al adicionar las dos alícuotas de 20 $\mu$ L de la disolución de Cu (II) a la misma concentración, se debió haber obtenido el doble de la señal de corriente; sin embargo, no se dio de esa manera. Esto nos indica el problema de la adición de volúmenes de alícuotas tan pequeños.

La ecuación lineal que expresa la tendencia de la gráfica está definida por:

$$y = -15.65x + 260.77$$

Donde “y” representa la magnitud de corriente en nA y “x” el volumen de glucosa añadido en mL. Como se mencionó anteriormente, el punto de equivalencia se encuentra cuando la magnitud de corriente es igual a cero:

$$0 = -15.65x + 260.77$$

$$-260.77 = -15.65x$$

$$\frac{-260.77}{-15.65} = x$$

$$16.66 = x$$

Una vez obtenido el volumen en el punto de equivalencia, se calculan los mmoles de glucosa que reaccionaron con los mmoles de Cu(II) los cuales pueden calcularse con facilidad, de igual manera como se realizó en la determinación de azúcares reductores:

$$5.0 \text{ mL} \left( \frac{0.3038 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1.0 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mmol Cu(II)}}{1 \text{ mmol CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} \right) = 1.5190 \text{ mmol Cu(II)}$$

$$1.5190 \text{ mmol Cu}^{2+} \left( \frac{1 \text{ mmol Glucosa}}{5 \text{ mmol Cu}^{2+}} \right) = 3.038 \times 10^{-1} \text{ mmol de Glucosa.}$$

Una vez encontrados los mmoles de glucosa que debieron estar presentes en los 16.66 mL se calculó la concentración:

$$[Glucosa] = \frac{3.038 \times 10^{-1} \text{ mmoles de Glucosa}}{16.66 \text{ mL}} = 0.01823 \text{ M}$$

Si comparamos la concentración de glucosa obtenida ( $0.01823 \text{ mol.L}^{-1}$ ) con la concentración teórica de la Glucosa ( $0.0202 \text{ mol.L}^{-1}$ ) se obtiene un error del 9.79%. Esto es de esperarse ya que como se observó anteriormente, la correlación lineal para esta titulación no fue la esperada. Por otro lado, pudo observarse que no todas las puntas de micropipeta depositaban el líquido de forma adecuada, formándose burbujas en las puntas.

De esta manera se realizan los cálculos para todas las pruebas realizadas en esta determinación por lo que en los resultados de las pruebas posteriores no se explicará tan detalladamente.

Para las siguientes pruebas se llevaron a cabo ciertas modificaciones, además de adicionar 5.0 ml de la disolución de Cu (II) y 5.0 mL de la disolución de tartrato de sodio y potasio, se adicionaron 5.0 ml de agua desionizada para buscar disminuir el error por evaporación. Otra medida tomada para disminuir este error fue recubrir alrededor del tapón de hule del matraz Erlenmeyer con papel parafilm para buscar que el escape de vapor fuera el mínimo. Por otro lado, las alícuotas tomadas en esta ocasión fueron de 50  $\mu\text{L}$ .

Con respecto a los polarogramas, observando todas las señales de reducción de Cu (II) se definió un nuevo dominio de electroactividad el cual fue de -0.70 a -0.40 V. Esto disminuye considerablemente el tiempo de trazado del polarograma.

Bajo estas condiciones, se obtuvo una segunda prueba con buenos resultados. A continuación se presenta en la Figura 36 el polarograma obtenido de dicha prueba:

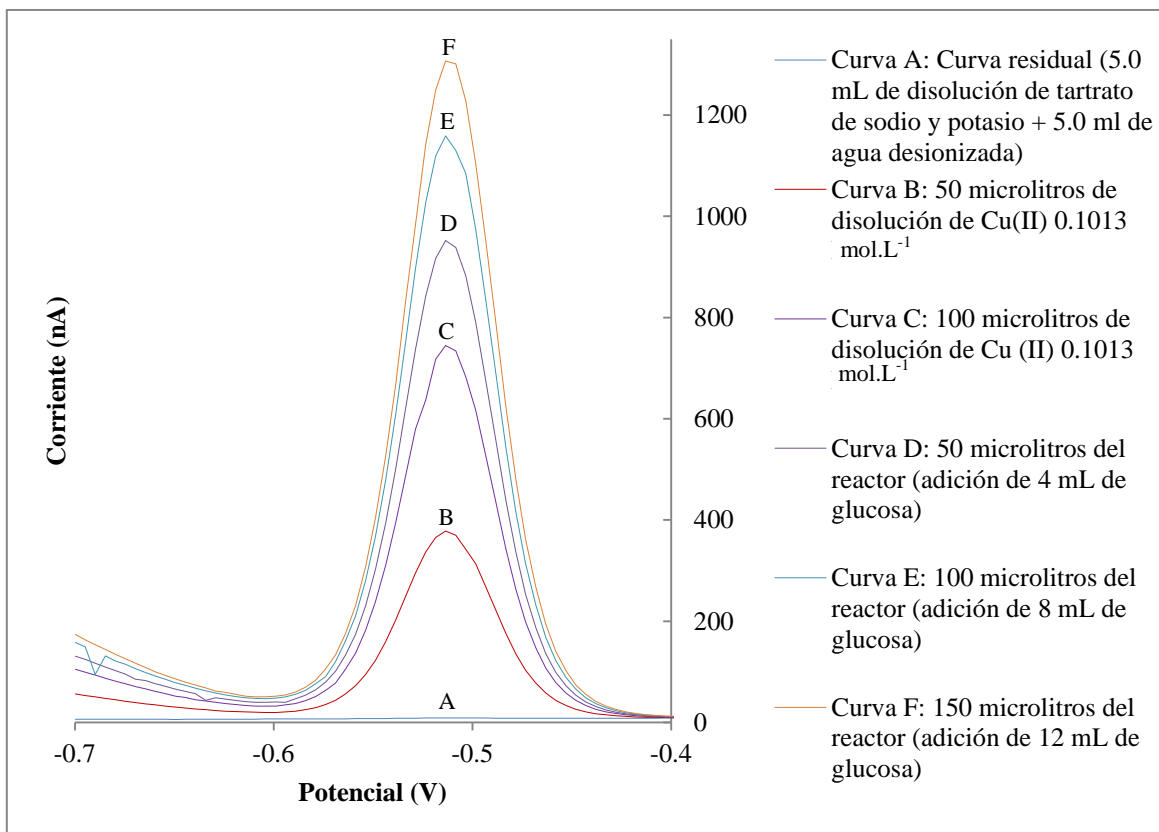


Figura 36. Polarogramas de la segunda determinación de azúcares reductores.

Con base a este polarograma se presenta un cuadro con la información obtenida, incluyendo en el caso de corrección por alícuota y por dilución, el factor por el cual se multiplica el aumento de corriente para obtener dicha corrección (Tabla 19).

Tabla 19. Resumen de los cálculos realizados en la segunda determinación de azúcares reductores.

V <sub>(mL)</sub> de Glucosa	V <sub>(μL)</sub> de alícuota de Cu (II)	I (nA)	Aumento de I (nA)	Corrección por alícuota (20/V <sub>Cu(II)</sub> )	Corrección por dilución ((15+V <sub>Glucosa</sub> )/15)
0	20	365.00	365.00	365.00	365.00
0	20	721.00	343.00	343.00	343.00
4	20	923.00	202.00	202.00	255.87
8	40	1130.00	207.00	103.50	158.70
12	60	1270.00	140.00	46.67	84.00

Con estos datos se obtiene la gráfica de la titulación amperométrica a potencial constante:

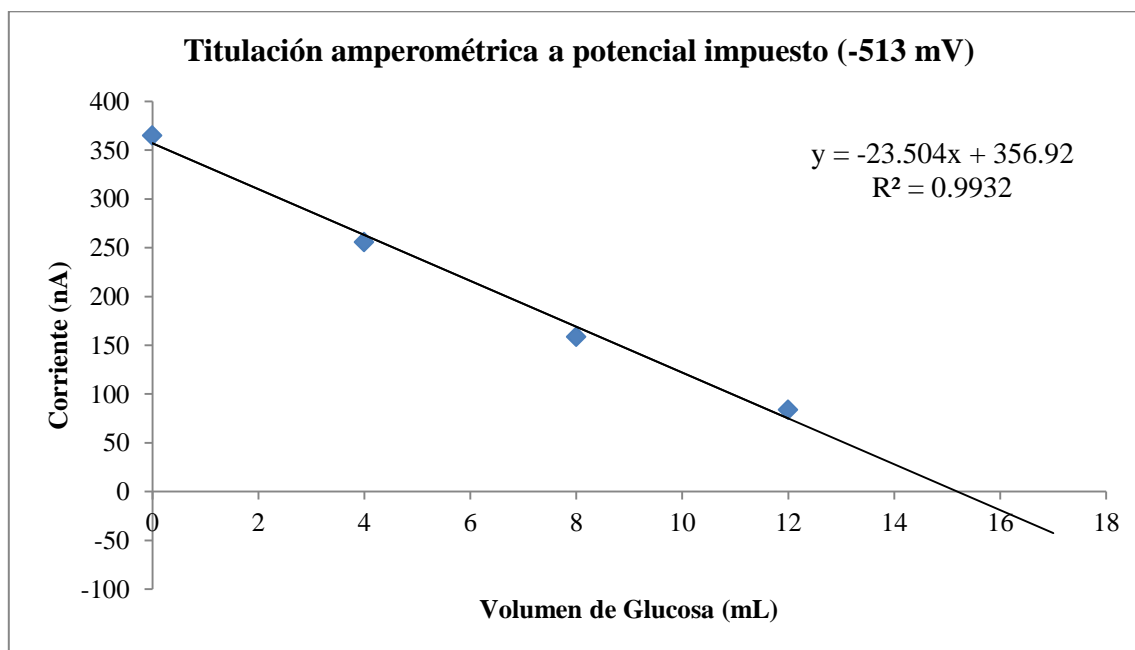


Figura 37. Titulación de 1.5190 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  (5 mL de disolución  $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$ ) con disolución de glucosa  $0.0202 \text{ mol.L}^{-1}$  (0.9102 g en 250.0 mL).

Nuevamente es evidente una tendencia lineal; si observamos el coeficiente de determinación ( $R^2=0.9932$ ), dicha tendencia es muy buena. La ecuación lineal que representa dicha tendencia es  $y = -23.504x + 356.92$ , al calcular el valor del volumen de glucosa (“x”) cuando el valor de la magnitud de corriente es 0 (“y”), se obtiene un valor de 15.19 mL. Por otro lado, debido a que se están utilizando 5.0 mL de la disolución de Cu (II) de la misma concentración que en la determinación anterior, conocemos que los mmoles de glucosa a los que corresponden los 15.18 mL son de 1.519. Por lo tanto al dividir los 1.519 mmoles de glucosa entre los 15.18 mL obtenemos que su concentración es de  $0.0200 \text{ mol.L}^{-1}$ . Este resultado concuerda con el valor teórico para la concentración de glucosa.

A pesar de obtener muy buenos resultados en esta determinación, se consideró el hecho de que las alícuotas tomadas de la disolución de Cu(II) eran grandes y generaban señales de magnitud de corriente altas (arriba de los 1000 nA), por lo que se pensó modificar el método para no tener que utilizar alícuotas tan grandes y así no obtener magnitudes de corriente tan alejadas de los 1000 nA.

Al resolver el factor de agitación, se utilizaron nuevamente alícuotas más pequeñas (20 $\mu$ L). A medida que se llevaron a cabo las adiciones de 4.0 ml de disolución de glucosa se duplicó el volumen de la alícuota para que el cambio en la corriente fuera más apreciable. Por lo tanto, se adicionaron alícuotas de 20, 40 y 80 $\mu$ L. Bajo estas condiciones fue posible obtener el siguiente polarograma que se presenta a continuación en la Figura 38.

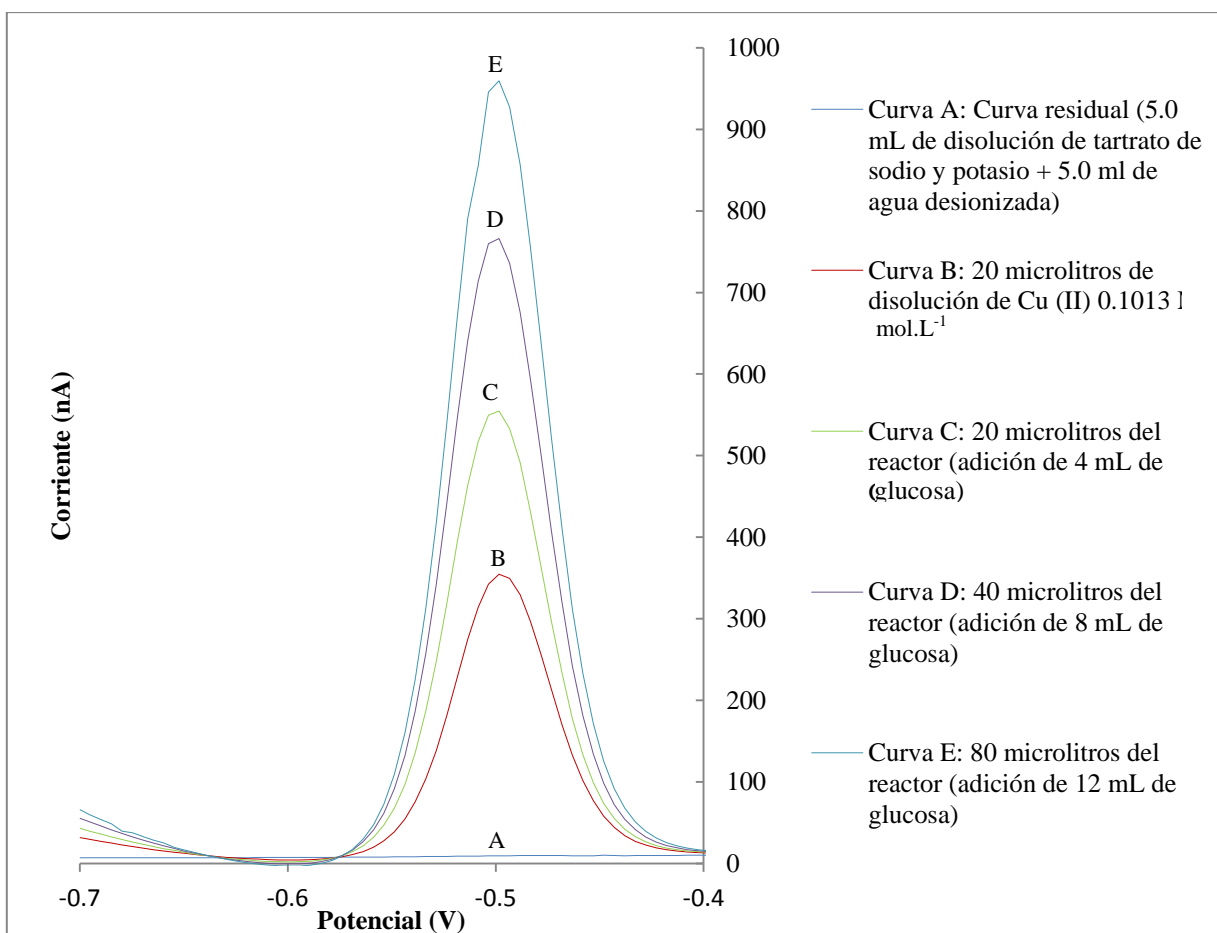


Figura 38. Polarogramas obtenidos en la tercera determinación de azúcares reductores.

Nuevamente, se presenta en la Tabla 20 la información obtenida y el resumen de resultados obtenidos de los cálculos. Posteriormente, se presenta en la Figura 39 la gráfica de la titulación amperométrica a potencial constante.

Tabla 20. Resumen de los cálculos realizados en la tercera determinación de azúcares reductores.

$V_{(\text{mL})}$ de Glucosa	$V_{(\mu\text{L})}$ de alícuota de Cu (II)	I (nA)	Aumento de I (nA)	Corrección por alícuota ( $20/V_{\text{Cu(II)}}$ )	Corrección por dilución ( $((15+V_{\text{Glucosa}})/15)$ )
0	20	346.00	346.00	346.00	346.00
4	20	547.00	201.00	201.00	254.60
8	40	759.00	212.00	106.00	162.53
12	80	954.00	195.00	48.75	87.75

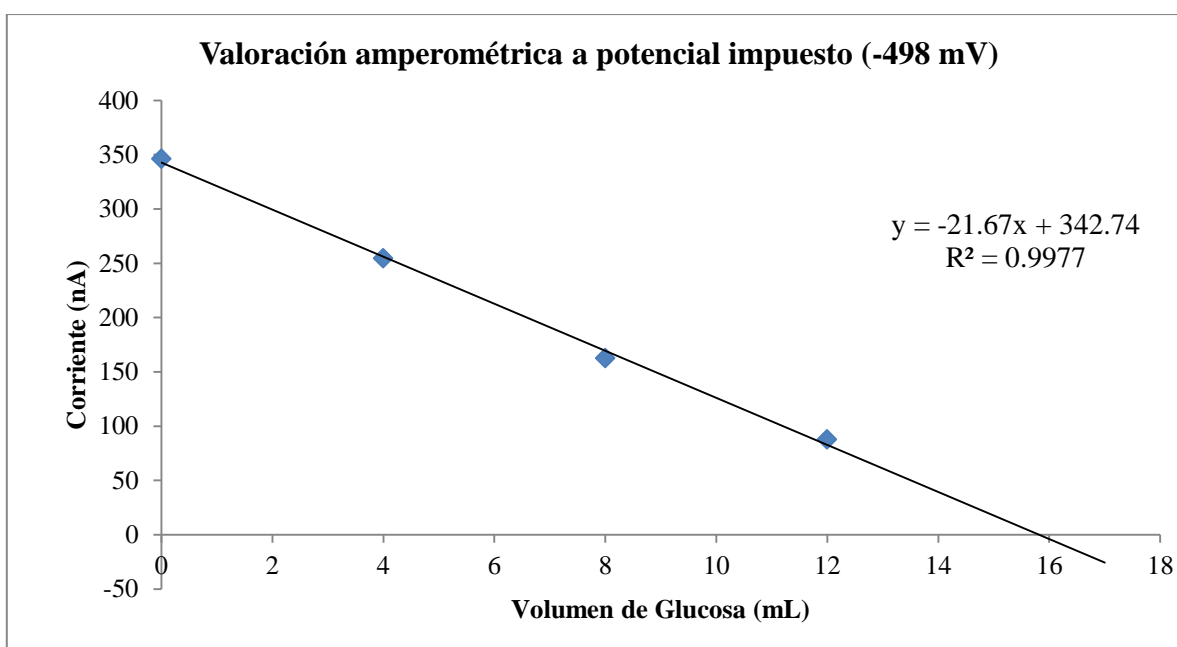


Figura 39. Titulación de 1.5190 mmoles de  $\text{Cu}^{2+}$  (5 mL de disolución  $0.3038 \text{ mol.L}^{-1}$ ) con disolución de glucosa  $0.0202 \text{ mol.L}^{-1}$  (0.9102 g en 250.0 mL):

Con el coeficiente de determinación se observa que la correlación lineal es mejor que en la determinación anterior. La ecuación lineal que representa dicha tendencia es  $y = -21.67x + 342.74$ , con esta expresión se calcula el volumen de glucosa en el punto de equivalencia el cual corresponde a 15.82 mL. Los mmoles de glucosa siguen siendo los mismos para esta determinación, por lo que la concentración está dada por el cociente de 1.519 mmoles de glucosa entre 15.82 mL, lo cual da como resultado una concentración de  $0.01921 \text{ mol.L}^{-1}$ . Este resultado posee un porcentaje de error del 4.0% con respecto a la concentración teórica de la glucosa. Esto nos lleva a concluir que aunque se tenga una

buena correlación, siempre estarán presentes los errores experimentales durante el procedimiento. Esto pudo comprobarse ya que se hicieron más pruebas con estas condiciones y en una de ellas, aunque se tuvo un buen coeficiente de determinación ( $R^2=9964$ ) se tuvo un error del 10% con respecto a la concentración teórica de glucosa.

A pesar de que para la determinación anterior se tomó en cuenta el factor de las puntas de las micropipetas al hacer adiciones (Por ejemplo, que el líquido se deposite en la celda sin formar burbujas en la punta o utilizar una punta distinta para cada adición), no puede eliminarse el hecho de que al ser alícuotas pequeñas puede generarse un error considerable si la manipulación no es adecuada. Para disminuir esta situación, se decidió diluir la disolución del reactor para que las alícuotas que se tomen sean grandes y se genere una señal de corriente muy similar a cuando se hacen adiciones de alícuotas más pequeñas de disolución más concentrada. Para este experimento se adicionaron en el reactor, 3.0 mL de la disolución de Cu(II), 5.0 mL de la disolución de tartrato de sodio y potasio y 22.0 mL de agua desionizada, de esta manera se diluye la concentración del Cu (II) a la décima parte (3 mL de Cu (II) en 30.0 mL totales). Con respecto a las alícuotas se tomaron 80 $\mu$ L tanto en el inicio como para todas las adiciones de glucosa, las cuales fueron de 2.0 mL. Debido a que los volúmenes de las alícuotas tomadas en todas las adiciones son iguales, no se llevará a cabo la corrección por tamaño de alícuota en la magnitud de corriente al momento de realizar los cálculos. El volumen total de disolución de glucosa adicionado fue de 6.0 mL. Estas son las condiciones que se presentaron en los resultados y discusión para la determinación de glucosa y con las cuales se obtuvieron resultados satisfactorios.