

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y PERFIL
CROMATOGRAFICO POR TLC DE PROPOLEOS PROCEDENTES DE
CINCO LOCALIDADES DE EL SALVADOR**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
GERMAN ROMAN MENDEZ RAMIREZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

SEPTIEMBRE 2020

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICENCIADA REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORAS DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES**

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

MSc. Ana Miriam Santamaría de Campos

DOCENTE ASESOR

Dr. David Francisco Torres Romero

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que todo a Jehová Dios, quien me llevo de su mano por todo el recorrido durante este proceso de formación académica. Me mostró su poder inagotable al poner en mi camino ayudadores y soluciones cuando pensaba que no iba a ser capaz. Por ello para Jehová es la gloria por este logro conseguido, pues sin la sabiduría y fe no habría podido culminar esta etapa de mi vida.

A mi Madre Medarda Ramírez Miranda y mi padre Amadeo Méndez Rodríguez, porque siempre me apoyaron económicamente, a pesar de los días malos y duros de nuestras vidas; por ser el mejor ejemplo a seguir. A los miembros que componen mi familia, Manuel, Cecilia, Carlos, Mario, Carmen, Guadalupe, Hernán, Víctor, Silvia y mi cuñada María Mancía, que siempre creyeron en mí, dándome fortalezas y su inmenso apoyo incondicional. Gracias hermanos por todo.

A mi Novia Marjorie Ramos, que me ha dedicado 3 hermosos años de su vida, brindándome lo mejor de ella, su inmenso apoyo y amor en todo momento sin esperar nada a cambio, gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu vida y por los ánimos que siempre me diste para seguir adelante en esta lucha, y por enseñarme a nunca rendirme para dar lo mejor de mí siempre, muchas gracias Marjorie por estar ahí siempre cuando te necesité.

A mi asesor Doctor David Francisco Torres Romero por apoyarme siempre de la mejor manera y por su paciencia, brindándome su conocimiento y experiencia para optimizar el desarrollo del trabajo de investigación. Finalmente, a todos los docentes y al tribunal calificador que me formaron y transmitieron sus conocimientos a lo largo de mi formación profesional.

Germán Román Méndez Ramírez

DEDICATORIA

A Jehová Dios; Por darme la fortaleza cada día de seguir adelante sin importar la dificultad y por guiar mi camino por el bien y la sabiduría.

A mi mamá Medarda Ramirez y mi papá Amadeo Méndez por los sacrificios hechos para sacarme adelante y hacer de mí la persona que soy hoy en día, por el apoyo y amor incondicional, muchísimas gracias.

A mi estimado docente asesor Doctor David Francisco Torres por su ayuda invaluable, gracias por brindarme sus conocimientos para la realización de este trabajo.

A mi amiga Nury Saray Escalante, quien ha sido un gran apoyo en momentos difíciles de mi vida, por su compañía, respaldo y por darme ánimos durante este tiempo.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me encantaría dedicarles este trabajo por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunos están aquí conmigo y otros en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

“Nunca desistas de un sueño. Sólo trata de ver las señales que te lleven a él.”

(Paulo Coelho)

GRACIAS TOTALES

Germán Román Méndez Ramírez

INDICE

	Pág N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xx
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	26
3.1 La apicultura	26
3.2 Organización de las abejas	26
3.2.1 La Reina	26
3.2.2 Obreras	27
3.2.3 Clases de Obreras	27
3.2.4 Zánganos o Machos	28
3.3 La flora apícola	28
3.4 Propóleos	28
3.5 Recolección y procesamiento del propóleos por las abejas (<i>Apis mellifera</i>)	29
3.6 Función del propóleos dentro de la colmena	29
3.7 Composición química del propóleos	29
3.7.1 Las resinas del propóleos	31
3.7.2 Las ceras del propóleos	32
3.8 Compuestos fenólicos	32
3.8.1 Flavonoides	32
3.8.2 Estructura del flavonoide	33
3.9 Diterpenos	34
3.10 Propiedades terapéuticas y actividad biológica del propóleos	35
3.10.1 Actividad antioxidante	35

3.10.2 Actividad antiinflamatoria	36
3.10.3 Actividad antimicrobiana	36
3.10.4 Actividad antiviral	36
3.10.5 Actividad antifúngica	37
3.10.6 Actividad anestésica	37
3.11 Generalidades de producción del propóleos	37
3.12 Métodos de recolección	38
3.13 Industria apícola en El Salvador	38
3.14 Productos en el mercado internacional elaborados con propóleos	39
3.15 Producción de propóleos en El Salvador	39
3.16 Generalidades de los sitios de recolección de las muestras	40
3.16.1 Municipio Chilanga	40
3.16.2 Municipio Jocoaitique	40
3.16.3 Municipio El Rosario	41
3.16.4 Municipio Huizúcar	41
3.16.5 Municipio Juayúa	42
3.17 Normativa nacional y regional	43
3.18 Parámetros de calidad del propóleos	43
3.19 Conservación del propóleos	44
3.20 Determinaciones fisicoquímicas	45
3.20.1 Determinación de humedad	45
3.20.2 Determinación de cenizas	46
3.20.3 Determinación de ceras	46
3.20.4 Determinación de resinas	47
3.21 Metales pesados	47
3.22 Generalidades del plomo (Pb)	48
3.22.1 Efectos tóxicos del plomo en el ser humano	49
3.22.2 El mecanismo tóxico del plomo está dado por tres modalidades	49
3.23 Generalidades de cadmio (Cd)	50

3.23.1 Formas de exposición por cadmio	50
3.23.2 Efectos en la salud humana	51
3.24 Método de espectroscopia de absorción atómica	52
3.24.1 Características de la absorción atómica	52
3.24.2 Fundamento del método (horno de grafito)	52
3.24.3 Cuantificación de metales pesados por método seco	53
3.25 Métodos cromatográficos	53
3.25.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	54
3.25.2 Determinación del R _f	55
3.25.3 Estándares de referencia	56
3.25.4 Ubicación de los componentes	57
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	59
4.1 Tipo de estudio	59
4.2 Investigación bibliográfica	59
4.3 Investigación de campo	60
4.4 Parte experimental	62
4.4.1 Determinación de las características sensoriales del propóleos	62
4.4.2 Determinaciones fisicoquímicas del propóleos	63
4.4.3 Determinación de plomo y cadmio por espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito	66
4.4.4 Determinación del perfil cromatográfico por TLC	68
4.5 Diseño estadístico	72
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
5.1 Características organolépticas y fisicoquímicas de las seis matrices de propóleos	76
5.2 Cuantificación de metales pesados (plomo y cadmio) por método de absorción atómica	89

5.3 Análisis del perfil cromatográfico por TLC de seis muestras de propóleos	92
5.4 Análisis estadístico	103
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	109
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	112
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág N°
1	Estructura básica de los flavonoides.	33
2	Promedio del porcentaje de humedad de las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”).	80
3	Promedio del porcentaje de cenizas en las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”).	82
4	Promedio del porcentaje de resinas en las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”).	85
5	Promedio del porcentaje de ceras en las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”).	88
6	Grafico lineal del contenido de resina contra el contenido de cera de las seis muestras de propóleos.	89
7	Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de β -amirina en las seis muestras de propóleos.	93
8	Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de quercetina en los propóleos.	95
9	Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de kukulkanin-A en los propóleos.	97

10	Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de ácido isocuprésico en los propóleos.	99
11	Gráfico de medias para el contenido de resinas de cada muestra de propóleos.	107

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág N°
1	Composición química del propóleos.	30
2	Familias de metabolitos secundarios presentes en los propóleos.	31
3	Clasificación de los flavonoides	34
4	Requisitos de calidad fisicoquímicos recomendados por la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03).	44
5	Resultados obtenido del análisis organoléptico de las seis muestras de propóleos salvadoreños.	76
6	Resultados obtenidos del porcentaje de humedad de las seis muestras de propóleos.	79
7	Resultados obtenidos del porcentaje de cenizas en las seis muestras de propóleos.	81
8	Resultados obtenidos del porcentaje de resinas en las seis muestras de propóleos.	83
9	Resultados obtenidos del porcentaje de ceras en las seis muestras de propóleos.	86
10	Lecturas promedios del análisis de plomo para cada muestra de propóleos recolectados en cinco localidades de El Salvador.	90
11	Lecturas promedios del análisis de cadmio para muestras de propóleos recolectados en cinco localidades de El Salvador.	91
12	Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (β -amirina) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica.	94

13	Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (quercetina) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica.	96
14	Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (kukulkanin-A) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica.	98
15	Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (ácido isocuprésico) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica.	100
16	Resumen de los resultados del perfil cromatográfico en capa fina (TLC) de los propóleos estudiados.	101
17	Resultados del análisis del contenido de resinas en las muestras de propóleos evaluados.	104
18	Análisis de varianza para el contenido de resinas en las muestras de propóleos de diferentes localidades.	105
19	Resultados del test de Fisher (LSD) para el contenido de resinas.	105

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Organización de las abejas.
- 2 Formatos de etiquetas
- 3 Ubicación y recolección de las muestras de propóleos crudo.
- 4 Cristalería, equipos y reactivos.
- 5 Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03, Calidad de propóleos crudo).
- 6 Hoja de cotejo de las características sensorial.
- 7 Esquemas de las determinaciones fisicoquímicas y el perfil cromatográfico por TLC.
- 8 Preparación de la solución Stock (100 ppm) y las soluciones estándar de plomo y cadmio.
- 9 Preparación de la fase móvil y los marcadores de referencia para la cromatografía en capa fina (TLC).
- 10 Características organolépticas de las muestras de propóleos.
- 11 Cuadro de datos para el cálculo en la determinación de las propiedades fisicoquímicas.
- 12 Cuadro de datos para el cálculo de la concentración de plomo y cadmio de las seis muestras de propóleos.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
Cha	Chalconas
Dit	Diterpenos
E.E.U.U	Estados Unidos de América
EAA	Espectroscopia de Absorción Atómica
Fla	Flavonoides
LSD	Diferencia Mínima Significativa
MAG	Ministerio de Agronomía y Ganadería
OMS	Organización Mundial de la Salud
R_f	Factor rate
ST	Estándar
TLC	Cromatografía en capa fina
Tr	Triterpenos
UV	Ultravioleta

SIMBOLOGÍAS

°C	Grados Celsius
μm	Micrómetros
As	Arsénico
C	Carbono
Cd	Cadmio
Cm	Centímetros
g	Gramos
Hg	Mercurio
mg	Miligramos
mL	Mililitros
OH	Grupos Hidroxilos
Pb	Plomo
Rpm	Revoluciones por minuto
β	Beta
α	Alfa
λ	Longitud de onda

RESUMEN

El propóleo es el producto originado de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, colectadas por abejas melíferas, de brotes y exudaciones de corteza, hojas y otras partes de las plantas. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar las características fisicoquímicas y perfil cromatográfico por TLC de propóleos procedentes de cinco localidades de El Salvador. Las muestras se recolectaron en seis apiarios, ubicados en los departamentos de Sonsonate, La Libertad y Morazán, durante los meses de marzo a mayo de 2019 por dos métodos: raspado y malla plástica. Se determinaron propiedades organolépticas (aspecto, consistencia, olor, color y sabor) y fisicoquímico (humedad, cenizas, resinas, ceras y contenido de plomo y cadmio). La caracterización fisicoquímica del propóleo se realizó de acuerdo con las especificaciones de la Norma (NSO 65.19.02:03); a excepción con el contenido de cadmio que fue comparado con estudios previos de metales pesados en propóleos de Turquía. ⁽³¹⁾ En la evaluación del perfil cromatográfico por TLC, se identificó indirectamente grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, chalconas, diterpenos y triterpenos utilizando para tal fin marcadores de referencia: quercetina, kulkkanin-A, ácido isocuprésico y β -amirina. Los resultados de las propiedades organolépticas revelaron diferencias en los perfiles sensoriales de las seis muestras. Las propiedades fisicoquímicas: humedad, ceniza, plomo y cadmio cumplieron la norma, mientras que en el parámetro de resina las muestras evaluadas (3 y 5) cumplieron y el contenido de cera ninguna cumplió. Los resultados del perfil cromatográfico revelan que los propóleos estudiados se identificaron flavonoides, chalconas, diterpenos y triterpenos. Por lo tanto los resultados obtenidos en los parámetros establecidos por la norma, no cumplieron pero son de gran valor, ya que se puede relacionar la composición química con su actividad biológica. Se aconseja incentivar a los apicultores por medio de capacitaciones y apoyo para promover las buenas prácticas de apicultura y así mejorar la calidad en la producción de los mismos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La apicultura es una actividad agropecuaria orientada a la crianza de abejas, que representa una gran fuente de riqueza por los múltiples beneficios que se pueden obtener a través de la explotación artesanal o industrial. La colmena proporciona como productos principales la miel, polen, cera, jalea real, apitoxina, pan de abejas y propóleos. La demanda de todos estos productos ha estado creciendo en el mercado mundial, El Salvador produce, más de 1,881 toneladas de productos apícolas, exportando principalmente a Europa, Australia y Asia.

El propóleos de *Apis mellifera* se define como el producto originado de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, colectadas por abejas melíferas, de brotes y exudaciones de corteza, hojas y otras partes de las plantas, a las cuales las abejas agregan secreciones salivales y cera, para la elaboración final del propóleos.

El estudio de MONICA realizado en 1989 por la OMS, ha contribuido al interés por los flavonoides al comprobar que las tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Francia eran mucho menores que en otros países industrializados como EE.UU. Algunos flavonoides de tipo ésteres de ácidos fenólicos, flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides se les atribuye propiedades antitumorales. Estos compuestos tienen importantes propiedades antioxidantes, estos minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyendo de esta manera a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los flavonoides más comunes en las plantas y en los propóleos en general son: apigenina, quercetina, kaempferol, pinocebrina, galangina, crisina y hesperidina.

En la industria cosmética a nivel mundial son incontables las aplicaciones que pueden tener los productos a base de propóleos, dentro de las que podemos mencionar: como filtro solar, regeneradores de daño celular, reguladores de secreciones sebáceas, antiséptico, cicatrizantes entre otras. En la industria alimenticia como preservantes de origen natural y en la industria farmacéutica para la producción de productos naturales, como principio activo en jarabes, cremas y soluciones orales.

En el presente trabajo se muestra el interés de “identificar compuestos bioactivos y sus propiedades fisicoquímicas de seis matrices de propóleos salvadoreños”, con el fin de conocer cualitativamente su respectiva composición química, identificando componentes bioactivos de tipo: flavonoides, chalcona, diterpenos y triterpenos. Las seis matrices de propóleos fueron recolectadas en cinco localidades que pertenecen a los departamentos de Sonsonate, La Libertad y Morazán, haciendo uso de los métodos de raspado y malla plástica, en la época de verano e inicio de invierno, durante los meses de marzo a mayo de 2019.

La investigación de laboratorio, comprendió el análisis organoléptico y fisicoquímico de las muestras de propóleos, donde se identificaron las características sensoriales como: aspecto, consistencia, olor, color, sabor y en el análisis fisicoquímico se determinó el porcentaje de humedad, cenizas, ceras y resinas. Además, se cuantificó el contenido de metales pesados (plomo y cadmio) por el método de Espectrofotometría de Absorción Atómica a las seis matrices de propóleos crudo. Los resultados obtenidos en cada determinación fueron comparados con las especificaciones de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03). Los resultados de cadmio fueron comparados con estudios previos de bio-monitoreo de metales pesados en matrices de propóleos, encontrados en Turquía. Dado que la Norma Salvadoreña para propóleos no contempla límites para cadmio ⁽³¹⁾.

La segunda etapa del estudio comprendió el perfil cromatográfico por TLC, donde se identificó indirectamente grupos de metabolitos secundarios como: flavonoides, chalconas, diterpenos y triterpenos que son característicos de los propóleos. Lo cual se utilizó marcadores de referencia a los compuestos quercetina (flavonol), kukulkanin-A (chalcona), ácido isocuprésico (diterpeno) y β -amirina (triterpeno).

Los resultados organolépticos, fisicoquímicos e identificación de metabolitos secundarios de la presente investigación, servirán como indicadores de calidad para corregir procesos de producción e intentar aumentar el valor agregado de los propóleos, como materia prima para la elaboración de diversos productos a base de propóleos. Además, los parámetros fisicoquímicos determinados, servirán como información complementaria de estudios previos de propóleos Salvadoreños.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Evaluar las características fisicoquímicas y perfil cromatográfico por TLC de propóleos procedentes de cinco localidades de El Salvador.

2.2. Objetivo específicos:

- 2.2.1 Determinar indicadores de calidad de seis matrices de propóleos, mediante pruebas organolépticas (aspecto, consistencia, olor, color, sabor) y fisicoquímicas como: humedad, cenizas, resinas y ceras establecidas en la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03).
- 2.2.2 Cuantificar plomo y cadmio por método de absorción atómica, en seis matrices de propóleos procedentes de cinco localidades de El Salvador.
- 2.2.3 Identificar chalconas, flavonoides, diterpenos y triterpenos de seis muestras de propóleos mediante cromatografía en capa fina (TLC), haciendo uso de marcadores de referencias.
- 2.2.4 Establecer si existe diferencia estadística en las muestras de propóleos entre el contenido de resinas y el lugar de recolección.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 La apicultura

La apicultura es una actividad agropecuaria orientada a la crianza de abejas del género *Apis*, que representa una gran fuente de riqueza por los múltiples beneficios que se pueden obtener a través de la explotación artesanal o industrial. Además de proporcionar miel como producto principal, la *Apis mellifera* también produce polen, cera, jalea real, propóleos y apitoxina. ⁽⁴⁰⁾

3.2 Organización de las abejas ⁽²⁾

Un enjambre puede contener un número variado de individuos desde cinco hasta treinta mil, pero estrictamente hablando. Todos y cada uno de los miembros de una colonia de abejas dependen de los otros y no pueden existir por separado. En una colmena existen tres clases de individuos: abeja reina, obreras y zánganos, a continuación, se describen cada uno de ellos:

3.2.1 La Reina

Es de vital importancia para el mantenimiento de un enjambre, ya que por muy grande que sea este, resulta inútil a menos que tenga una reina fértil. Es la única hembra fecundada por lo que se convierte en el centro y vida de la familia. Si se muere, la colonia tendrá que crear otra o de lo contrario desaparecerá. No toma parte del gobierno de la colonia y su función principal es poner huevecillos que aseguren la continuidad y supervivencia de la sociedad. ⁽⁴⁰⁾

3.2.2 Obreras

Las obreras son hembras que constituyen la mayor cantidad de población y cumplen diversas funciones en la colmena. Son el elemento productor y directivo de la colmena. Se llaman así porque son las que realizan el trabajo: producen miel y cera, fabrican panales, colectan polen, limpian la colmena y mantienen el orden. Son infecundas y también son las más pequeñas del enjambre. ⁽⁴⁰⁾

3.2.3 Clases de Obreras ⁽²⁾

Cada una de las obreras durante todo el ciclo de su vida desempeña diferentes actividades para el funcionamiento de la colonia, las que van cambiando según su edad.

- Nodrizas: Alimentan los hijos o larvas de la colmena, al principio con una sustancia glandular lechosa conocida como jalea real y más tarde con una mezcla de miel y polen que se llama papilla.
- Limpiadoras: Limpian la colmena, sacan las larvas y abejas muertas, eliminan de la colmena cualquier objeto raro que en ella encuentren.
- Ventiladoras: Ventilán la colmena para mantener estable la humedad, la temperatura interna de la colmena. Las crías para desarrollarse necesitan entre 34 y 36 °C y humedad de 65 a 75 %.
- Constructoras: Fabrican panales, la construcción de panales tiene dos etapas: Operculado a cargo de las obreras constructoras jóvenes y la construcción de panales a cargo de obreras más viejas. La cera de construcción de panales es producida por el cuerpo de las abejas.
- Guardianas: Protegen la colmena. Es una etapa previa al pecoreo, su función es evitar la entrada de abejas de otras colmenas, insectos y otros animales ajenos a la colmena.

- **Pecoreadoras:** El pecoreo consiste en salir de la colmena a colectar polen, néctar, agua y propóleos. El polen y los propóleos lo acarrearán en una cestilla ubicada en las patas traseras y el néctar en su estómago.
- **Exploradoras:** Buscan fuentes de alimento y nuevas casas, son las obreras más viejas de la colmena. Cuando encuentran alimento, agua o nueva morada, regresan a la colmena y avisan a sus semejantes por medio de danzas.

3.2.4 Zánganos o Machos

Carecen de aguijón, su única función es aparearse con las nuevas reinas y ayudar a calentar las crías cuando están dentro de la colonia. Los zánganos nacen de huevos sin fecundar, son de mayores dimensiones que las obreras, abdomen más cuadrado, ojos grandes y contiguos (ver anexo N° 1). ⁽⁴⁰⁾

3.3 La flora apícola

La flora apícola se conoce como el conjunto de especies vegetales que producen o segregan sustancias o elementos que las abejas recolectan para su provecho. Generalmente estas son néctar, polen, propóleos y de ellas depende el rendimiento, calidad y diferenciación que pueden tener los productos de la colmena. ⁽⁴³⁾

3.4 Propóleos

Es el producto originado de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, colectadas por abejas melíferas, de brotes y exudaciones de corteza, hojas y otras partes de las plantas, a las cuales las abejas agregan secreciones salivales y cera para la elaboración final del propóleos. ⁽¹²⁾

3.5 Recolección y procesamiento del propóleos por las abejas (*Apis mellifera*.)

La recolección responde a un patrón específico de forrajeo, las pecoreadoras extraen el propóleos de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y con ayuda del primer par de patas, la secreción de las glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenóico) permite el ablandamiento para triturarlo y transportarlo a las cestillas. Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, permitiendo a las abejas propolizadoras, tomar algunas partículas de la sustancia, comprimirlas y agregarles cera para proceder al propolizado. ⁽³⁷⁾

3.6 Función del propóleos dentro de la colmena

El propóleos cumple diversas funciones dentro de la colmena. Una de ellas, es de tipo estructural, es decir, cubrir grietas y orificios, reparar las paredes, recubrir la entrada de la piquera y fijar los cuadros. También es usado como una sustancia embalsamante para cubrir los pequeños animales invasores, que las abejas han eliminado y no pueden transportarlos fuera de la misma. Esta sustancia recubre la colmena protegiéndola de bacterias y hongos. ⁽³⁵⁾

3.7 Composición química del propóleos

La composición química del propóleos varía debido a diferentes factores como: fuente de exudados, condiciones medioambientales, clima, vegetación circundante y tiempo de recolección. De manera general se puede indicar que el propóleos está compuesto macroscópicamente de resinas y bálsamos, ceras, aceites esenciales, polen, compuestos orgánicos, minerales y otros como polen, mucílagos, gomas y látex (ver tabla N° 1). ⁽³⁹⁾

Tabla N° 1. Composición química del propóleo⁽⁴⁸⁾

Componente	(%)	Contenido
Resinas y bálsamo	50-60	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	30-40	Ácidos grasos de cadena larga
Aceites esenciales	7-10	Aceites volátiles
Polen	5.0	Proteínas
Compuestos orgánicos	4.0	Polifenoles, cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, ácido benzoico y azúcares.
Minerales	1.0	14 trazas de minerales, Fe y Zn (más comunes),

En cuanto al contenido en materia orgánica, el propóleo contiene polifenoles, ésteres, flavonoides en todas sus formas (flavonoles, flavonas, flavononas y chalconas), ácidos fenólicos, ferúlico, cinámico y cumarinas.

El flavonoide crisína proporciona el color amarillo característico al propóleo y ceras.

Adicionalmente se encuentran terpenos, sesquiterpenos, β -esteroides, aldehídos aromáticos y vitamina B3 (ver tabla N° 2).

Tabla N° 2. Grupos de metabolitos secundarios ⁽¹⁴⁾

Ácidos orgánicos	Ácido benzoico, ácido gálico.
Ácidos fenólicos	Ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido fenílico, ácido isofenílico, ácido cumarínico.
Aldehídos aromáticos	Vainillina, Isovainillina.
Cumarinas	Esculetol, escopoletol.
Flavonas	Acacetina, crisina, pectolinarigenina, tectocrisina, apigenina.
Flavonoles	Galangina, izalquinina, kaempferol, quercetina, ramnocitrina.
Flavanonas	Pinocembrina, sakuranetina, naringenina.
Dihidroflavononas	Pinobanksina.
Terpenoides	Limoneno, cimeno y estireno.
Diterpenos	Totarol, ácido isocuprésico, ácido imbricatólico, manool.
Triterpenos	α - amirina, β - amirina, Lupeol, Lupenona.

3.7.1 Las resinas del propóleos

Las resinas son altamente solubles en etanol, metanol, cloroformo y prácticamente insoluble en agua, dependiendo del origen botánico del propóleos. Dentro de esta fracción se encuentran compuestos de tipo fenólicos, con intensa actividad biológica. Esta fracción está muy relacionada con las plantas que lo originaron.

Se puede encontrar también otros compuestos con actividad biológica como los aceites esenciales (compuestos volátiles), que se pueden degradar, principalmente por oxidación ya sea por acción del tiempo o temperaturas altas. ⁽²⁾

3.7.2 Las ceras del propóleos

La fracción denominada “cera” (cera de abeja) es insoluble en agua y alcohol en frío, pero muy soluble en *n*-hexano o éter de petróleo y normalmente es considerada como inerte. ⁽²⁾

3.8 Compuestos fenólicos

La amplitud de compuestos fenólicos en la naturaleza, da como resultado propóleos con características fisicoquímicas y propiedades variables. Son elementos de interés biológico que se valoran en el propóleos, donde la mayoría de las propiedades son atribuidas a los flavonoides y ácidos fenólicos. ⁽⁴⁸⁾

3.8.1 Flavonoides ⁽⁴⁸⁾

Los flavonoides son pigmentos y compuestos aromáticos presentes en la constitución de las plantas superiores. Se encuentran en las partes verdes y coloreadas, pero también en la savia y resinas, lo cual “constituye un mecanismo de defensa vegetal contra parásitos, bacterias, virus y hongos”.

La coloración del propóleos depende en gran parte de la cantidad de flavonoides del mismo, aunque la cera influye y disminuye la calidad de este producto. Sin embargo, los flavonoides son componentes clave del propóleos, dado que se responsabilizan de su actividad biológica, siendo los más frecuentes: kaempferol, naringenina, acetina, apigenina, pinocembrina, galangina. Sus diversas bioactividades, están en función de sus mínimas diferencias estructurales y que han ayudado a clasificarlos como: flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, catequinas y antocianinas.

En la naturaleza, los flavonoides se pueden encontrar glicosilados o como agliconas, es decir que pueden estar ligados a una molécula de carbohidratos o no, respectivamente. El propóleos no es la excepción y se pueden presentar de ambas maneras, lo cual influye en su funcionamiento.

3.8.2 Estructura del flavonoide

Los flavonoides poseen como unidad básica un esqueleto de quince átomos de carbono. Son estructuras del tipo C₆-C₃-C₆ con dos anillos aromáticos (A y B) unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada a través de un oxígeno (anillo C).

Todos los flavonoides poseen un grupo carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C₃ y en el anillo B, son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y por lo tanto son estructuras polifenólicas (ver figura N° 1). (7)

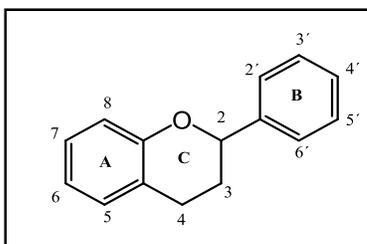
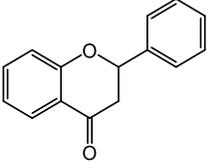
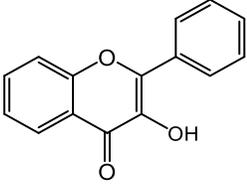
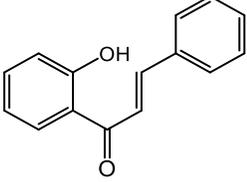


Figura N° 1. Estructura básica de los flavonoides (3)

3.8.3 Clasificación de los flavonoides (7)

Los flavonoides se pueden clasificar dependiendo de la estructura de su esqueleto base (ver tabla N° 3).

Tabla N° 3. Clasificación de los flavonoides (7)

<p style="text-align: center;">Flavanona</p>	<p>Cuando la estructura base posee un grupo carbonilo en la posición cuatro. Son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos y son las responsables en muchos casos de su sabor amargo.</p>
	<p>Cuando se introduce un doble enlace entre las posiciones dos y tres de la flavanona. Son amarillas y pueden estar en algunas flores o frutos. Son frecuentes en los tejidos jóvenes, se encuentran tanto en estado libre como en forma de heterósidos. La intensidad de su color amarillo aumenta con el número de grupos hidroxilos y el incremento del pH.</p>
<p style="text-align: center;">Flavona</p>	<p>Se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C2 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Dentro de éste grupo encontramos la quercetina, y tiene como función principal dar color a las flores, frutas y la protección de los rayos UV.</p>
	<p>Están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que inducen el desarrollo de colores en el espectro de lo visible y en el UV que atraen a insectos (mariposas y abejas). La característica principal de las chalconas es la ruptura del anillo "C".</p>
<p style="text-align: center;">Chalconas</p>	
	

3.9 Diterpenos ⁽³⁴⁾

Diterpenos son compuestos orgánicos compuestos por cuatro unidades de isopreno y son conocidos por sus características biológicas y farmacológicas, tales como antibacteriano, anticancerígeno, y anti-inflamatorio. En la composición

química de los propóleos se encuentran los diterpenos y han mostrado una amplia gama de efectos biológicos, tales como antibacterianos, antioxidantes, antiinflamatorios, antifúngicos y anticancerígenos.

Los diterpenos pertenecen a la clase de terpenos basados en tener el esqueleto C₂₀, compuesto de cuatro unidades de isopreno, se originaron a partir de mevalonato o desoxi-celulosa fosfato (no mevalonato). Más de 3,000 diterpenos han sido explorados desde la naturaleza, pero solo un pequeño número de ellos han sido reconocidos como clínicamente eficaz. Uno de los ricos recursos de diterpenos farmacológicamente activos en la naturaleza son los que provienen de propóleos y los cuales podrían usarse directamente en el tratamiento de enfermedades por sus efectos menos tóxicos. Los diterpenos con propiedades antibacterianas y antifúngicas son: totarol, totarolone, 13-*epi*-torulosol, ácido isocuprésico, ácido imbricatólico, el que presentan actividad citotóxicas es el manool entre otros.

3.10 Propiedades terapéuticas y actividad biológica del propóleos

El propóleos es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antiinflamatorios, antioxidantes, inmunoestimulantes, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos. Los flavonoides quercetina, apigenina, galangina y los ácidos fenólicos caféico, isoferúlico, cinámico y benzoico son los responsables de la actividad biológica. ⁽⁶⁾

3.10.1 Actividad antioxidante

Es una excelente fuente natural de antioxidantes, por su alto contenido en flavonoides. Los flavonoides absorben radiación electromagnética en la zona del

ultravioleta-visible y de esta forma representan una protección natural para las plantas contra la radiación UV, al contener en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, lo que les confiere una capacidad antioxidante. Los antioxidantes impiden la oxidación lipídica, reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y además, neutralizan los radicales libres, que son los responsables del envejecimiento celular. ⁽²⁾

3.10.2 Actividad antiinflamatoria

Algunos de los componentes fenólicos del propóleo, como el ácido caféico y el éster del ácido fenil-etil caféico, la quercetina y la naringenina, ejercen efectos anti-inflamatorios. ⁽⁴⁷⁾ El propóleo rojo de Consolación del Sur, Cuba, a dosis de 50 mg/kg (vía oral) mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de granuloma por algodón en ratas, así como en la prueba de permeabilidad capilar en el peritoneo de ratas en la dosis de 10 mg/kg.

3.10.3 Actividad antimicrobiana

Los principales responsables de esta propiedad son los flavonoides galangina y pinocembrina y derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y caféico. Los componentes cinámicos y flavónicos del propóleo, que alteran las membranas e inhiben la motilidad bacteriana, contribuyen a esta acción y al sinergismo observado con algunos antibióticos. En conjunto, el propóleo muestra una buena actividad antimicrobiana, dosis dependiente frente a *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. ⁽³⁴⁾

3.10.4 Actividad antiviral ⁽³⁴⁾

El propóleo ejerce efectos inhibidores frente a los virus de la viruela vacuna, la influenza, la enfermedad de Newcastle, el herpesvirus. Esta actividad se atribuye al contenido en compuestos fenólicos, principalmente ácido caféico, ésteres de los ácidos caféico y ferúlico (3-metilbut-2-enil cafeato, 3-metilbutil ferulato) y agliconas flavónicas (luteolina y quercetina), muy activas frente al virus del herpes.

3.10.5 Actividad antifúngica

El propóleo tiene, en distintos grados, efectos fungicidas frente a numerosas especies como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Ascosphaera apis* y *Plasmopara viticosarla*. El propóleo a una concentración del 4% inhibe el desarrollo de *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum*. ⁽³⁴⁾

3.10.6 Actividad anestésica

Los extractos alcohólicos de propóleo poseen una acción anestésica local, atribuible a sus contenidos en pinocembrina y ésteres de cafeato, efectos citostáticos que dependen de su composición. ⁽⁶⁾

3.11 Generalidades de producción del propóleo

En primer lugar, hay que considerar que la cantidad de propóleo que produce una colmena dependerá de la raza de abeja, así como de su ubicación. Se ha observado que las colmenas situadas en bosques o al lado de ríos donde hay álamos contienen más propóleo que las situadas en zonas llanas. La cantidad media que se puede producir por colmena al año oscila entre los 150 y los 300 gramos, mientras que el método de malla puede alcanzar hasta los 500 gramos, mejorando la calidad sin incrementar demasiado los costos de producción. Las abejas propolizan durante todo el año, pero a final de verano y otoño son las de

mayor cantidad. El apicultor deberá recolectar el propóleos pasado el invierno. Si bien la calidad de propóleos depende del tipo de flora y ambiente; es decisivo en este sentido el trabajo del apicultor. La calidad del producto resultante estará directamente relacionada con los métodos de extracción, almacenamiento y conservación. ⁽²⁷⁾

3.12 Métodos de recolección

Existen dos métodos de recolección:

- Método artesanal o método de raspado: La recolección se efectúa mediante una espátula, desprendiendo el propóleos de aquellas zonas donde se encuentra adherido: ángulos, marcos, piezas metálicas, piqueras. Es recomendable utilizar una espátula de acero inoxidable sin mucho filo para reducir el riesgo de arrastrar virutas de maderas. Cuidar de no raspar donde haya pintura sobre madera, pues éste es uno de los mayores responsables de la contaminación de propóleos. ⁽²⁷⁾

- Método malla: El método de rejilla o malla, las cuales se colocan debajo de la tapa. Consiste en una lámina de plástico con ranuras que las abejas se apresuran a rellenar con propóleos, lo que permite su fácil retirada y recolección.
El propóleos obtenido mediante este procesamiento posee una calidad superior que el colectado mediante el sistema de raspado. ⁽⁶⁾

3.13 Industria apícola en El Salvador

De acuerdo al anuario estadístico Agropecuario efectuado en El Salvador en el año 2017-2018, por el Ministerio Agricultura y Ganadería (MAG) en el país se

produjo 1, 881,000 kilogramos de miel de abeja y el costo por botella de miel tenía un valor de aproximadamente \$ 5.00. ⁽³²⁾

En los últimos datos registrados por el IV censo agropecuario efectuado en El Salvador por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en 2007-2008 había en el país un total de 1,070 apicultores distribuidos en todo el país y existía 68,902 colmenas distribuidas en 2,050 apiarios, los cuales los departamentos de mayor producción de miel son La Libertad, Sonsonate, Chalatenango y Santa Ana. ⁽⁴⁰⁾

3.14 Productos en el mercado internacional elaborados con propóleos

En el comercio, se puede encontrar el propóleos puro bajo diferentes formas galénicas: pasta, granulado, cápsulas, tintura madre y extracto seco, también combinado con otros productos naturales como la miel, la jalea real, diferentes plantas medicinales y aceites esenciales. A partir del propóleos crudo se generan varios productos: caramelos, shampoos, enjuague bucal, crema dental, cremas para la piel y extracto de propóleos. Estos productos son usados como cosméticos, golosinas o medicamentos, debido a las virtudes del mismo. No obstante, es importante aclarar que para la generación de estos productos debe usarse alcohol etílico apto para consumo humano y es permitido incorporar el propilenglicol en cosméticos. ⁽⁶⁾

3.15 Producción de propóleos en El Salvador

En El Salvador no hay registro que verifique la producción de propóleos, por lo que no hay datos que estimen la producción. Se estima que entre el 1 al 2% de los apicultores nacionales, están utilizando el propóleos para la venta en bruto o preparado. Este porcentaje tan bajo, los técnicos y productores lo justifican por la falta de mercado y por el precio tan bajo del propóleos que fluctúa entre US \$10 a

US \$30 por libra, precios que se verificó en negocios de productos apícolas como en procesadores de propóleos. También hay que destacar, que falta de caracterización de los propóleos salvadoreños, hacen que los precios no sean competitivos, frente a propóleos bien estudiados y caracterizados como por ejemplo los propóleos brasileños. ⁽⁶⁾

3.16. Generalidades de los sitios de recolección de las muestras

3.16.1 Municipio Chilanga

Chilanga es un municipio del departamento de Morazán en El Salvador. Limita al norte con Gualococti, Osicala, Delicias de Concepción y Yoloaiquín; al este con Lolotiquillo y San Francisco Gotera; al sur con Sensembra, Yamabal; al oeste con San Simón. Para su administración Chilanga se encuentra dividido en 5 cantones y 47 caseríos. Siendo sus cantones: Chaparral, Joya del Matazano, Lajitas, Pedernal, Piedra Parada. ⁽²⁰⁾

La Flora constituye bosque húmedo tropical, bosque húmedo subtropical. Las especies arbóreas más notables son: “conacaste” (*Enterolobium cyclocarpum*) “morro” (*Crescentia alata* Kunth), “cedro” (*Cedrela salvadorensis* Standl), “nance” (*Byrsonima crassifolia*), “mango” (*Mangifera indica*), “marañón” (*Anacardium occidentale*) y “mangollano” (*Pithecellobium dulce*), “Carreto” (*Pithecellobium saman* Jacq.). ⁽²⁵⁾

3.16.2 Municipio Jocoaitique

Jocoaitique es un municipio del departamento de Morazán en El Salvador. Limita al norte con Perquín y Arambala; al este con Arambala y Meanguera; al sur con El Rosario y Meanguera y al oeste con El Rosario y Torola. Para su administración

Jocoaitique se encuentra dividido en 2 cantones y 15 caseríos. Siendo sus cantones: El Rodeo, Volcancillo. ⁽²²⁾

La vegetación está constituida por bosque húmedo tropical y bosque muy húmedo subtropical. Las especies arbóreas más notables son: “cedro” (*Cedrela salvadorensis* Standl), “copinol” (*Hymenaea courbaril* L.), “quebracho” (*Lysiloma acapulcense*), “ceiba” (*Ceiba pentandra*), “laurel” (*Cordia alliodora*), “madrecacao” (*Gliricidia sepium*), “chaparro” (*Curatella americana*), “conacaste” (*Enterolobium cyclocarpum*) y “nance” (*Byrsonima crassifolia*). ⁽⁴¹⁾

3.16.3. Municipio El Rosario

El rosario es un municipio del departamento de Morazán en El Salvador. Limita al norte con Torola; al este con Jocoaitique y Meanguera; al sur con Osicala, Gualococti y San Simón; al oeste con San Isidro y Torola. Para su administración El Rosario se encuentra dividido en 2 cantones y 12 caseríos. Siendo sus cantones: La Laguna, Ojos de Agua. ⁽²¹⁾

La flora constituye bosque conformado por árboles y enredaderas. Existen algunas gramíneas en las laderas rocosas, “ramadillo” (*Senna reticulata*), “flor de mayo” (*Plumeria rubra*), “conacaste” (*Enterolobium cyclocarpum*), “izcanal” (*Acacia hendís* Benth), “almendro de río” (*Andira inermis*), “jiote” (*Bursera simaruba*) y “amate” (*Ficus* sp). Se encuentra “cola de caballo” (*Aster spinosus*), “zorra, cenicero o carrito” (*Samanea saman*), “pepeto de río” (*Inga vera*), “tecomasuche” (*Chlorospermum vitifolium*), “ramadillo” (*Senna reticulata*) y enredaderas como “chupa miel” (*Combretus farinosum* H. B. K.) entre otros. ⁽²⁶⁾

3.16.4 Municipio Huizúcar

Huizúcar: es un municipio del departamento de La Libertad en El Salvador. Limita al norte con Nuevo Cuscatlán, Antiguo Cuscatlán y San Marcos, al sur con La Libertad, al este con Panchimalco y Rosario de Mora y al oeste con San José Villanueva. Para su administración Huizúcar se encuentra dividido en 6 cantones y 32 caseríos. Siendo sus cantones: Analquito, La Lima, Nazareth, Ojos de Agua, San Juan Buenavista, Tilapa. ⁽¹⁹⁾

La población de Huizúcar goza de un clima tropical debido a su cercanía a las costas del litoral salvadoreño y a su vez posee cantones a sus alrededores que por situarse en cadenas montañosas son bastante frescos como por ejemplo el cantón “Ojo de agua”. A nivel de flora cuenta con amplia vegetación, que es de tipo bosque húmedo subtropical, encontrándose arboles como “pino ocote” (*Pinus oocarpa*), “chaparro” (*Curatella americana*), “nance” (*Byrsonima crassifolia*), “roble” (*Quercus corrugata*), “pepeto” (*Inga vera*) y “café” (*Coffea arabica* L). ⁽⁸⁾

3.16.5 Municipio Juayúa

Juayúa es un municipio del departamento de Sonsonate en El Salvador. Limita al norte con Atiquizaya y Chalchuapa, al sur con Nahuizalco y Salcoatitán. Para su administración Juayúa se encuentra dividido en 10 cantones y 35 caseríos. Siendo sus cantones: Buenos Aires, La Fuente, La Unión, Los Apantes, Los Cañales, Los Naranjos, Ojo de Agua, San José la Majada, San Juan de Dios, Valle Nuevo. ⁽²³⁾

El clima es fresco y agradable, pertenece a los tipos de tierra caliente, tierra templada y tierra fría. La flora constituye bosque húmedo tropical, bosque húmedo subtropical y bosque muy húmedo montano bajo. Las especies arbóreas más notables, son: “cedro” (*Cedrela salvadorensis* Standl), “bálsamo” (*Myroxylon pereirae*), “copinol” (*Hymenaea courbaril* L.), “papaturro” (*Coccoloba caracassana*), “conacaste” (*Enterolobium cyclocarpum*), “morro” (*Crescentia*

alata), “Pepeto” (*Inga vera*), “madrecacao” (*Gliricidia sepium*), “chaparro” (*Curatella americana*), “nance” (*Byrsonima crassifolia*), “roble” (*Quercus corrugata*).⁽¹⁸⁾

3.17 Normativa nacional y regional

En Latinoamérica, Argentina, Brasil y Cuba tienen normativas nacionales para la verificación de la calidad de los propóleos; en cambio, a nivel mesoamericano, sólo El Salvador y Honduras poseen éste tipo de normativas. La ausencia de mecanismos de regulación en la mayoría de países probablemente se debe a que este producto aún no ha alcanzado niveles de consumo y exportación altos, por lo tanto, la norma salvadoreña de propóleos crudo, que según se menciona en ella, es, “una adaptación del Reglamento Técnico Brasileño para la Calidad de Propóleos”, constituye una normativa pionera en la región. Sin embargo, varios de los parámetros e indicadores de calidad son meramente cualitativos y por lo tanto se deben realizar estudios fundamentales que generen criterios adecuados que sean reflejo de la calidad del producto.⁽¹¹⁾

3.18 Parámetros de calidad del propóleos⁽¹²⁾

Se ha planteado normas de calidad regional y nacional para garantizar las propiedades del propóleos y su actividad biológica, es así que citando se hace referencia a la Norma salvadoreña (NSO 65.19.02:03, calidad de propóleos crudo).

Los parámetros fisicoquímicos más importantes que se encuentran en la Norma salvadoreña se muestran en la tabla N° 4.

Tabla N° 4. Requisitos de calidad fisicoquímicos recomendados por la Norma salvadoreña (NSO 65.19.02:03) ⁽¹²⁾

Requisitos de calidad	Máximo
Humedad	8.0 %
Cenizas	5.0 %
Cera	30.0 %
Impurezas	5.0 %
Índice oxidación	22 segundos
Solubilidad en etanol (Resinas)	30-35 %
Compuestos fenólicos	Reacción positiva
Flavonoides	Reacción positiva
Plomo (Pb)	5.0 ppm
Cadmio (Cd)	0.60-1.80 ppm* ⁽³¹⁾

* Matin, G., Kargar, N., y Buyukisik, HB (2016). Biomonitorio de cadmio, plomo, arsénico y mercurio en los distritos industriales de Esmirna, Turquía, mediante el uso de miel de abeja, propóleos y hojas de pino. *Ingeniería Ecológica*, 90, 331–335. doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.01.035.

En la fracción resinosa de los propóleos es donde se encuentran compuestos biológicamente activos, por lo tanto, un mayor porcentaje de esta fracción puede indicar mejor calidad por las posibles propiedades y usos potenciales en la industria. ⁽¹⁴⁾

El propóleos crudo en definitiva debe estar “libre de contaminantes tóxicos (metales pesados); contener bajos niveles de cera, impurezas mecánicas y cenizas”. Asimismo, es recomendado determinar la fuente vegetal circundante de la colmena para conocer los componentes activos presentes en sus resinas y de igual forma, estimar la proporción de éstos compuestos activos en el propóleos crudo. ⁽¹⁴⁾

3.19 Conservación del propóleos ⁽⁶⁾

Para que las propiedades del propóleos no se pierdan o alteren, se debe de mantener en recipientes herméticos de plástico y guardar dentro de cajas de cartón, madera o un recipiente apropiado que lo proteja por largo tiempo, se debe de conservar a temperatura que oscilan entre -10 y 20 °C durante 48 horas, se puede utilizar los refrigeradores de uso doméstico, una vez retirado del mismo, no se debe dejar expuesto al aire ya que tiende a condensar la humedad del ambiente.

El almacenamiento se realiza en locales limpios, fuera de plagas y roedores, secos, ventilados, separados del piso y de las paredes. Nunca se debe almacenar el propóleos en la intemperie, ni cerca de fuentes de contaminación. Los propóleos son en sí bastantes estables, pero es conveniente que sean conservados en las condiciones que favorezca la estabilidad de los compuestos activos.

3.20 Determinaciones fisicoquímicas

3.20.1 Determinación de humedad

El parámetro de humedad, que es un indicador del manejo y ambiente en que se ha producido y cosechado del propóleos. Los valores de humedad deben estar por debajo del 8.0 %, según lo recomendado por la Norma salvadoreña (NSO 65.19.02:03). Un porcentaje alto de humedad es un indicativo del deterioro del propóleos por crecimiento de hongos u otros microorganismos. ⁽¹¹⁾

Fundamento: Se entiende por humedad a la pérdida de masa durante el proceso de desecación; es decir, el agua de las muestras se pierde por volatilización a causa del calor. La cantidad de material residual después de eliminar la humedad, constituye la materia seca. ⁽³⁸⁾

3.20.2 Determinación de cenizas

Las cenizas son un indicativo del contenido de sales minerales presentes en la muestra. El porcentaje de ceniza debe estar por debajo del 5.0 %, según lo recomendado por la Norma salvadoreña. Un contenido alto de cenizas es indicativo de presencia de impurezas mecánicas, tierra y minerales entre otros. ⁽¹¹⁾

Fundamento: La determinación del contenido de cenizas se basa en que una muestra pesada inicialmente y sometida a un proceso de calcinación a 500 °C, pierde los materiales o componentes orgánicos, obteniéndose un residuo inorgánico al que se le denomina cenizas. ⁽³⁸⁾

3.20.3 Determinación de ceras

La presencia de ceras resta pureza al propóleo. Se consideran propóleos de calidad aquellos en los cuales el porcentaje de ceras no supere el 30%, según lo recomendado por la Norma salvadoreña. Desde el punto de vista de calidad un alto contenido de ceras no es favorable porque estas no presentan actividad biológica. ⁽¹¹⁾

Es posible que al presentar un alto contenido de ceras en las muestras sea un reflejo de la mala manipulación de la muestra durante la recolección o que la abeja se ve forzada a mezclar mayor cantidad de ceras con las resinas colectadas, para poder cubrir los orificios de las mallas empleadas. ⁽³⁰⁾

Fundamento: El contenido de cera se determina por extracción con *n*-hexano (intervalo de destilación 60-80 °C) en un extractor Soxhlet por 4 horas. Se evapora a sequedad a 50 °C hasta un peso constante. Se expresa en % (g/g). ⁽⁴⁶⁾

3.20.4 Determinación de resinas

La fracción resina es un indicativo de calidad, ya que contienen los compuestos biológicamente activos. El porcentaje de resina deben estar en el rango 30-35%, según lo recomendado por la Norma salvadoreña, cuanto mayor sea el valor de esta fracción mayor será también la calidad del producto final, es aquí donde se encuentran todos los compuestos polifenólicos. ⁽¹¹⁾

Fundamento: La determinación del contenido de resinas se basa en que una muestra pesada inicialmente y sometido a un proceso de extracción con etanol al 96° a 40°C, con agitación por 45 minutos, se filtra para retener las ceras e impurezas mecánicas. Se elimina el solvente del filtrado por evaporación suave y se determina el contenido de resinas por gravimetría, que se expresa en porcentaje (g/g). ⁽⁴⁶⁾

3.21 Metales pesados

Entre los contaminantes químicos, los metales pesados son seriamente tóxicos y la exposición de los organismos vivos (humanos, animales y plantas) afecta negativamente su salud. La contaminación ambiental provoca la existencia de metales pesados en la cadena alimentaria, se clasifican como el grupo principal de los contaminantes inorgánicos, estos tienen presencia a largo plazo y se acumulan en el medio ambiente debido a su liberación rápida y sostenida, tienen capacidad para la movilización y la dispersión, no son biodegradables y de larga vida media. ⁽³¹⁾

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano; entre los más

importantes tenemos: arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb), estaño (Sn) y cinc (Zn). ⁽¹⁵⁾

El contenido de metales pesados en los alimentos tanto de origen vegetal como animal, depende de muchos factores, entre los cuales se encuentran las condiciones medioambientales, los métodos de producción, el procesamiento y el lugar de origen del alimento, especialmente en relación a la composición del suelo. ⁽¹⁶⁾

3.22 Generalidades del plomo (Pb)

El plomo es un elemento químico de la tabla periódica cuyo símbolo es Pb y su número atómico es 82. Es un metal pesado, de densidad relativa 11,4 a 16°C, de color azulado, que se empaña para adquirir un color gris mate. Es flexible, inelástico y se funde con facilidad. Su fundición se produce a 327,4°C y hierve a 1725°C. Las valencias químicas normales son 2 y 4. Es relativamente resistente al ataque de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, aunque se disuelve con lentitud en ácido nítrico y ante la presencia de bases nitrogenadas. El plomo es anfótero, ya que forma sales de plomo de los ácidos, así como sales metálicas del ácido plúmbico. Tiene la capacidad de formar muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos. Industrialmente, sus compuestos más importantes son los óxidos de plomo y el tetraetilo de plomo. ⁽¹⁵⁾

Entre los metales pesados, el plomo es uno de los más utilizado en las industrias. Su uso diversificado se atribuye principalmente a su maleabilidad y resistencia a la corrosión. A pesar de la introducción de medidas de higiene industrial, el plomo sigue siendo responsable de la alta incidencia de intoxicación entre los trabajadores. El más alto nivel de exposición se produce principalmente entre las personas que trabajan en el moldeado de plomo. Los diversos procesos que intervienen en el resultado de refinación de plomo, en la generación de vapores de metal y la deposición del polvo de óxido de plomo en el ambiente. ⁽¹⁾

Las principales rutas de la absorción de plomo son el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio. Pequeñas cantidades de plomo también pueden ser absorbidas de la ingesta o piel erosionada cuando se aplica en alta concentraciones. ⁽¹⁾

3.22.1 Efectos tóxicos del plomo en el ser humano ⁽¹⁷⁾

El plomo puede causar varios efectos no deseados, como son:

- Perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia.
- Incremento de la presión sanguínea.
- Daño a los riñones.
- Abortos.
- Perturbación del sistema nervioso.
- Daño al cerebro.
- Disminución de la fertilidad del hombre a través del daño en el espermatozoide.
- Disminución de las habilidades de aprendizaje de los niños.
- Perturbación en el comportamiento de los niños, como es agresión,
- Comportamiento impulsivo e hipersensibilidad.

El organismo acumula este metal durante toda la vida y lo libera lentamente, por lo que incluso dosis pequeñas pueden producir, con el transcurso del tiempo, una intoxicación por plomo, pues de la carga corporal total de plomo depende el riesgo de efectos adversos. Los efectos biológicos del plomo son los mismos, independientemente de que entre en el organismo por inhalación o ingestión. El plomo interfiere con la función celular normal y con varios procesos fisiológicos.

3.22.2 El mecanismo tóxico del plomo está dado por tres modalidades

- Compite con metales esenciales, especialmente el calcio y el zinc, en sus sitios de inserción.
- Afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas, lo que significa alteración de la forma y función de ellas.
- Alteración del transporte de iones esenciales.

El envenenamiento por plomo puede ser tratado por terapia de quelación que es una técnica que consiste en la administración intravenosa de EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) u otra sustancia como por ejemplo la penicilamina, más complejos polivitamínicos, poliminerales y anti-oxidantes en el organismo para el tratamiento de las diversas enfermedades causadas por los depósitos de calcio y la acumulación de metales pesados en las arterias. ⁽¹⁷⁾

3.23 Generalidades de cadmio (Cd)

El cadmio es un metal que forma parte del grupo IIB de la tabla periódica, con un peso atómico de 112.41 U; la forma iónica del cadmio (Cd^{2+}) esta usualmente combinada con formas iónicas del oxígeno óxido de cadmio (CdO_2), cloruro (cloruro de cadmio, CdCl_2) o sulfuros (sulfato de cadmio CdSO_4); se ha estimado que 300,000 toneladas de cadmio son liberadas al medio ambiente cada año de las cuales 4,000 a 13,000 toneladas son derivadas de las actividades humanas. ⁽⁵⁾

3.23.1 Formas de exposición por cadmio

En general, la población está expuesta al cadmio principalmente por dos vías: la oral a través del agua e ingesta de comida contaminada con cadmio (hojas de vegetales, granos, cereales, frutas, vísceras animales y pescado); la segunda vía es a través de la inhalación de partículas de cadmio durante las actividades industriales en personas laboralmente expuestas, mientras que en la población

general, la inhalación es principalmente debida al humo de cigarro que contiene cadmio; la exposición e inhalación del humo de cigarro en fumadores activos y pasivos es considerado altamente peligroso ya que el cadmio se absorbe fácilmente por los pulmones. ⁽⁵⁾

3.23.2 Efectos en la salud humana ⁽⁵⁾

En humanos la absorción del cadmio se lleva a cabo a través de un proceso similar al de la absorción de metales esenciales como el hierro y zinc; esta absorción es potenciada cuando existen deficiencias de calcio y hierro en la dieta o dietas bajas en proteínas, el cadmio es transportado por la sangre y distribuido inicialmente al hígado y al riñón.

El cadmio afecta diversos órganos y tejidos como: riñón (produciendo insuficiencia renal tubular, proteinuria e insuficiencia renal crónica), corazón (produciendo arterosclerosis aórtica y coronaria, incremento en colesterol y ácidos grasos), huesos, testículos, placenta, y sistema nervioso central y periférico. El pulmón es un órgano muy susceptible a la exposición a cadmio, la inhalación crónica subaguda, puede producir bronquitis con daño progresivo alveolar, fibrosis secundaria y enfisema.

El cadmio afecta al sistema nervioso central en niños debido principalmente a que el desarrollo de la barrera hematoencefálica todavía no alcanza su madurez, es posible que el cadmio pase a través de ella con más facilidad, produciendo cambios neuropatológicos tales como: edema cerebral, piconosis, hemorragias, y necrosis en corteza parietal, cerebelo, putamen y núcleo caudado, datos similares fueron reportados en la autopsia de un niño de 2 años de edad que presento una elevada concentración de cadmio en el cerebro. El cadmio puede alterar el

metabolismo humano compitiendo con el hierro, cobre, cinc, manganeso y selenio por ligantes en los sistemas biológicos.

3.24 Método de espectroscopia de absorción atómica ⁽⁴⁾

La absorción atómica es el proceso que ocurre cuando átomos de un elemento en estado fundamental absorben energía radiante a una longitud de onda específica y luego la pierden en forma de calor.

Las muestras se vaporizan y se convierten en átomos libres, en un proceso denominado atomización. Sobre el vapor atómico originado se hace incidir la radiación electromagnética que será absorbida parcialmente por el analito.

3.24.1 Características de la absorción atómica ⁽⁴⁾

- Es un excelente método para la determinación de elementos a nivel de trazas.
- El método está basado en la absorción de radiación electromagnética, cumpliéndose la ley de Beer.
- Sensibilidad se define como la concentración en solución del elemento a determinar que origina una absorbancia de 0,004 (1 % de absorción) unidades a la longitud de onda usada, respecto al disolvente (blanco).
- Límite de detección es la más baja concentración que estadísticamente puede distinguirse del cero (blanco).

3.24.2 Fundamento del método (horno de grafito) ⁽¹⁶⁾

La espectroscopia de absorción atómica por horno de grafito se basa en el mismo principio de atomización directa a la llama, con la diferencia de que en este caso

se emplea un atomizador calentado eléctricamente o un horno de grafito en lugar de una cabeza de quemador estándar. Se introduce un volumen adecuado de muestra en el tubo de muestras de grafito (o cubilete).

Normalmente, la determinación se realiza por calentamiento de la muestra en tres o más etapas. Primero, una corriente de baja intensidad calienta el tubo para secar la muestra. En la segunda etapa, o carbonización, se destruye la materia orgánica y se volatilizan otros componentes de la matriz a una temperatura intermedia. Por último, una corriente de elevada intensidad calienta el tubo hasta la incandescencia y atomiza el elemento cuya concentración se determina en una atmósfera inerte. El vapor atómico elemental resultante absorbe la radiación monocromática de la fuente. Un detector fotoeléctrico mide la intensidad de la radiación transmitida, que es inversamente proporcional a la cantidad de átomos elementales en el trayecto óptico en un intervalo limitado.

3.24.3 Cuantificación de metales pesados por método seco ⁽¹⁶⁾

El método seco consiste en calcinar la muestra tras su desecación, a 500 °C en la mufla. Al residuo inorgánico obtenido (cenizas), se disuelve en ácido clorhídrico concentrado con el fin de formar los clorhidratos de los metales pesados, donde pueden ser cuantificados en el equipo de espectrofotómetro de absorción atómica.

3.25 Métodos cromatográficos ⁽¹⁷⁾

La cromatografía consiste en método por el cual se da la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria cuando la mezcla es transportada por una fase móvil.

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

- a) Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- b) Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original. La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por diferencia de polaridad de una mezcla y su identificación respectiva.

3.25.1 Cromatografía en capa fina (TLC) ⁽¹⁷⁾

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un adsorbente, placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta

que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas.

La placa se coloca en una lámpara de luz UV, con el objetivo de determinar los grupos cromóforos presentes en las manchas. Se procede luego utilizar un agente revelador químico que es específico para cada metabolito secundario.

3.25.2 Determinación del R_f ⁽¹⁰⁾

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de:

- La polaridad del compuesto.

Determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.

- Naturaleza del disolvente.

Un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa. La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones Cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

Para calcular el R_f se aplica la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo del R_f . Se recomienda elegir un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f medio en torno a 0.3-0.5.

Para valores de R_f menores que 0.3 la mancha estará muy concentrada y para valores mayores de 0.7 muy difusa. Para compuestos poco polares, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, requieren disolventes más polares como mezclas de diclorometano /metanol en distintas proporciones.

3.25.3 Estándares de referencia ⁽¹⁰⁾

Mediante la aplicación sobre el adsorbente en capa delgada o el papel, de soluciones de la sustancia que se desea identificar, la muestra auténtica y una mezcla de cantidades prácticamente iguales de la sustancia que se desea identificar en una línea recta, paralela al borde de la placa cromatográfica.

Cada aplicación de muestra contiene aproximadamente la misma cantidad, en peso, del material a cromatografiar. Si la sustancia que se quiere identificar y la muestra auténtica son idénticas, entonces todos los cromatogramas concuerdan en color y en valor R_f .

3.25.4 Ubicación de los componentes ⁽¹⁰⁾

Las manchas producidas mediante la cromatografía en capa delgada o en papel se pueden ubicar de las siguientes maneras:

- Por inspección directa, si los compuestos son visibles bajo luz blanca o luz UV de longitud de onda corta (254 nm) o larga (360 nm)
- Por inspección bajo luz blanca o luz UV después del tratamiento con reactivos que hacen que las manchas sean visibles (los reactivos se aplican de manera más conveniente con un atomizador).

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo de estudio

- **Experimental de laboratorio:** Se realizaron evaluaciones organolépticas, fisicoquímicas y perfil cromatográfico por TLC, a seis muestras de propóleos crudo en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Química y Farmacia. Se cuantificó el contenido de plomo y cadmio en las instalaciones del Laboratorio de Química Agrícola en la Facultad de Ciencias Agronómicas, ambos de la Universidad de El Salvador.
- **Transversal:** La toma de muestra fue única y se realizó en entre los meses de marzo a mayo de 2019.

4.2. Investigación bibliográfica

Se realizó:

- Datos de página oficial del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG)
- Revistas científicas
- Norma de calidad de propóleos crudo Nacional

Bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ciencia Naturales y Matemáticas de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Doctor José Matías Delgado.
- Internet

4.3. Investigación de campo

- **Universo:** Todas las colmenas de los apiarios que se encuentran en los catorce departamentos del El Salvador.
- **Muestra:** Para el muestreo se tomó el siguiente criterio: Por cada Apiario se identificó el número total de colmenas y se seleccionó al azar de 6 a 7 colmenas, que contaran con abundancia de propóleos hasta alcanzar un peso aproximado de 60.0 a 70.0 g; que posteriormente se homogenizó, obteniendo de esta manera seis muestras representativas listas para ser analizadas, embaladas en recipientes plásticos transparentes con tapadera hermética y colocadas en cajas de cartón limpias para la protección de la luz solar y rotuladas según el lugar de procedencia (ver anexo N° 2) y manteniéndolas en refrigeración en el transporte y almacenamiento.
- **Tipo de muestreo:** Dirigido y puntual, se recolecto la muestra de propóleos en un lugar específico en la época de verano e inicio de invierno, durante los meses de marzo a mayo de 2019.

4.3.1 Ubicación y recolección de muestras de propóleos crudo

Los departamentos de El Salvador seleccionados para la recolección de las muestras de propóleos crudo fueron: Morazán, La Libertad y Sonsonate, basado en el interés de seis apicultores interesados en conocer la calidad de sus propóleos crudos. Las cuales se codificaron (ver anexo N° 3) de acuerdo a:

- Dos apicultores del Cantón La Laguna del municipio de El Rosario (Finca los Claros y Quinta Neftaly), y los otros dos residen en el municipio de Jocoaitique

(Apiario Mauricio Castro) y Cantón Las Joyas del municipio de Chilanga (Apiario Carlos Vargas), los cuales pertenecen al departamento de Morazán.

- Un apicultor del Municipio de Huizúcar en el departamento de la Libertad (Apiario Leonardo).
- Un apicultor reside del Cantón Los Naranjos del municipio de Juayúa en el departamento de Sonsonate (Apiario Mario Calzadilla).

4.3.2. Recolección de las muestras de propóleos crudo

Las muestras de propóleos crudo se recolectaron en seis apiarios diferentes, ubicados en las zonas antes mencionadas y se codificó según su procedencia (ver cuadro N° 1).

Cuadro N° 1. Codificación de las muestras de propóleos de acuerdo a los lugares de recolección

Apiario	Código	Lugares de recolección de la muestra.	Departamento
1	M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna del Municipio de El Rosario.	Morazán
2	M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna del Municipio de El Rosario.	Morazán
3	M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	La Libertad
4	M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos. Municipio de Juayúa.	Sonsonate
5	M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas. Municipio de Chilanga.	Morazán
6	M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Morazán

4.3.3. Recolección de muestra

La recolección se realizó en época de verano e inicio de invierno, durante los meses de marzo a mayo de 2019. Se llevó a cabo con los siguientes métodos:

- **Método de raspado:** Consiste en raspar con una espátula de acero inoxidable en las partes superior de los marcos en donde las abejas almacenan el propóleos.
- **Método de malla plástica:** Consiste en un dispositivo plástico con ranuras donde la abeja deposita el propóleos.

Cabe destacar que se recolectó propóleos hasta obtener una muestra representativa para el análisis por cada apiario y en cantidad suficiente para el análisis.

4.4. Parte experimental

Materiales, equipos, reactivos y cristalería (ver anexo N° 4).

4.4.1. Determinación de las características sensoriales del propóleos ^(9, 6)

El análisis sensorial se realizó utilizando como guía la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03, Calidad de propóleos crudo), la cual se determinó las siguientes características organolépticas más representativas: aspecto, consistencia, olor, sabor y color (ver anexo N° 5).

- Evaluar el aspecto y el color, se coloca la muestra de propóleos sobre una superficie blanca y con buena iluminación, para describir el aspecto se le da el siguiente rango cualitativo: masa redonda con brillo, masa irregular con poco brillo, trozos irregulares opacos, trozos irregulares con brillo,

polvo o granulado, se identifica la característica observada y se documenta el resultado, de la misma forma se hace con el color.

- Evaluar el olor y sabor, se retira una porción de la muestra a fin de que el recipiente no interfiera en la percepción olfativa, posteriormente la muestra se coloca a unos centímetros de los orificios nasales por unos segundos, para describir el olor se le da el siguiente rango cualitativo: inodoro, resinoso, resinoso suave, resinoso aromático, resinoso muy aromático, se identifica la cualidad y se documenta el resultado, de la misma forma se hace con el sabor.
- Evaluar la consistencia, se retira una porción de la muestra y se palpa con las yemas de dedos, se describe según su rango cualitativo: muy blanda, blanda, poco blanda, dura, se identifica la cualidad y se documenta el resultado.

NOTA: Las características sensoriales se realizó por cada muestra y se utilizó una hoja de cotejo (ver anexo N° 6).

4.4.2. Determinaciones fisicoquímicas del propóleos

El análisis fisicoquímico se realizó utilizando como guía la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03, Calidad de propóleos crudo), la cual se determinó por duplicado el porcentaje de humedad, cenizas, resinas y el contenido de metales pesados (plomo y cadmio). Además, se realizó una única cuantificación para el porcentaje de ceras, (ver anexo N° 7). ⁽¹²⁾

4.4.2.1. Acondicionamiento de muestras de propóleos

- Identificar las muestras de propóleos.

- Eliminar las impurezas visibles (viruta de madera, partes de abejas, partículas de cera, restos de vegetales).
- Fraccionar la muestra de propóleos aproximadamente en 2 cm.
- Enfriar en ultra refrigeración a -30 °C por 48 horas.
- Moler la muestra de propóleos con una licuadora industrial hasta tener el tamaño de partícula uniforme y retirar rápidamente antes de que se descongele.
- Colocar la muestra molida en un recipiente hermético previamente pesado y tapar el recipiente.
- Pesar el recipiente con la muestra molida en una balanza analítica.
- Calcular el peso de la muestra por diferencia y anotar el peso.
- Rotular la muestra y almacenar en un lugar fresco y libre de la luz.

4.4.2.2. Determinación del porcentaje de humedad por el método gravimétrico

- Tarar la caja de aluminio mediante el siguiente procedimiento: Lavar y secar bien la caja de aluminio, colocarla en la estufa a 105 °C por 1 hora, enfriar en un desecador y pesar.
- Pesar 2.0 g de muestra de propóleos en la caja de aluminio previamente tarada y anotar el peso.
- Colocar la muestra con la caja de aluminio en la estufa a 103-105 °C durante 5 horas y retirar una vez transcurrido el tiempo. Colocar en el desecador hasta que enfríe.
- Pesar la muestra seca y anotar el peso.
- Seguir el mismo proceso hasta que el peso sea constante.
- Calcular el porcentaje de humedad.

4.4.2.3. Determinación del porcentaje de cenizas por el método gravimétrico

- Tarar el crisol de la siguiente manera: colocar el crisol en la mufla a 500 °C durante una hora, dejar enfriar en desecador a la temperatura ambiente. Se pesa rápidamente para evitar la absorción de humedad siempre usando pinza para manejar el crisol.
- Pesar 1.0 g de propóleos en el crisol previamente tarado.
- Colocarlo en la mufla a 500 °C durante 5 horas.
- Sacar de la mufla el crisol con la muestra calcinada y dejar en el desecador por 45 minutos.
- Pesar la ceniza con el crisol y anotar el peso.
- Calcular el porcentaje de cenizas.

4.4.2.4. Determinación del porcentaje de resinas por el método gravimétrico

- Pesar 2.0 g de propóleos en una balanza analítica.
- Agregar la muestra en un vaso de precipitado de 100 mL.
- Agregar 50 mL de etanol 95°.
- Extraer las resinas mediante ultrasonido por 45 minutos.
- Filtrar la solución y recibir en un balón de fondo redondo de 100 mL previamente tarado.
- Evaporar el etanol hasta obtener un extracto seco (resinas), haciendo uso del rotaevaporador a 50 °C con una velocidad de 60 rpm.
- Dejar que enfríe el matraz y pesar en la balanza analítica.
- Seguir evaporando solvente hasta que el peso sea constante.
- Almacenar el matraz fuera de la luz para posteriores análisis del perfil cromatográfico por TLC del punto 4.4.4.1.

- Calcular el porcentaje de resinas.

4.4.2.5. Determinación del porcentaje de cera por el método gravimétrico

- Pesar en un dedal de celulosa previamente tarado 1.5 g de muestra de propóleos.
- Agregar 125 mL de *n*-hexano en un balón de fondo redondo de 250 mL previamente tarado.
- Extraer las ceras con el extractor soxhlet durante 4 horas a una temperatura de 60-80 °C.
- Evaporar el solvente que contiene el matraz has obtener un extracto seco (ceras), haciendo uso del rotaevaporador a 50 °C con una velocidad de 60 rpm.
- Dejar que enfríe el matraz y pesar en la balanza analítica.
- Seguir evaporando el solvente hasta que el peso sea constante.
- Calcular el porcentaje de cera.

4.4.3. Determinación de plomo y cadmio por espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito ^(4,5)

4.4.3.1. Procedimiento para la cuantificación de Plomo y Cadmio

- a) Preparación de solución madre de las muestras de propóleos a partir de las cenizas obtenidas en el procedimiento descrito anteriormente (ver 4.4.2.3).

La ceniza se trata con ácido clorhídrico concentrado con el fin de formar los clorhidratos de los metales pesados.

- Humedecer las cenizas con 3 mL de agua osmotizada.
- Agregar 2.5 mL de ácido clorhídrico concentrado para disolver las sales.
- Calentar en hot-plate hasta observar vapores blancos.
- Enfriar hasta temperatura ambiente.
- Filtrar las cenizas con Microdisc 0.45 μm .
- Recibir el filtrado en un balón volumétrico de 25.0 mL
- Hacer dos lavados a los crisoles con agua osmotizada y transferirlos al balón volumétrico.
- Llevar a volumen con agua osmotizada.

b) Preparación del blanco para la cuantificación de plomo y cadmio

- Añadir 2.5 mL de ácido clorhídrico concentrado en el crisol rotulado como "blanco".
- El blanco debe llevar todo menos la muestra.

c) Preparación de solución stock y soluciones estándares de plomo y cadmio

Las formas de preparación, cálculos de la solución stock y estándares de referencias se puede ver en anexo N° 8.

d) Plomo (Espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito)

- Colocar en el equipo de Espectroscopia de Absorción Atómica (Shimadzu AA-7000) un volumen de 50 mL de solución de nitrato de paladio (II) 10 ppm, 50 mL de ácido nítrico (1:1), 10 mL de cada solución estándar de plomo (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm y 20 ppm) y 2 mL de solución de cada muestra.

- Correr el blanco y ajustar a cero el equipo EAA, a una longitud de onda de 283 nm.
- Elaborar la curva de calibración con los estándares 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm y 20 ppm de plomo.
- Hacer la lectura de la concentración en ppm de cada muestra para plomo.
- Realizar dos lecturas de cada muestra a una longitud de onda de 283 nm.

e) Cadmio (Espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito)

- Colocar en el equipo de Espectroscopia de Absorción Atómica (Shimadzu AA-7000) un volumen de 50 mL de solución de nitrato de paladio (II) 10 ppm, 50 mL de ácido nítrico (1:1), 10 mL de cada solución estándar de cadmio (0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm) y 2 mL de solución de cada muestra.
- Correr el blanco y ajustar a cero el equipo EAA, a una longitud de onda de 228.8 nm.
- Elaborar la curva de calibración con los estándares 0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm de cadmio.
- Hacer la lectura de la concentración en ppm de cada muestra para cadmio.
- Realizar dos lecturas de cada muestra a una longitud de onda de 228.8 nm.

4.4.4. Determinación del perfil cromatográfico por TLC

El análisis del perfil cromatográfico en capa fina (TLC), se realizó con el fin de conocer de manera indirecta y cualitativa las familias de metabolitos secundarios presentes en los propóleos muestreados (flavonoides, chalconas, diterpenos y triterpenos). Para tal fin se usó quercetina (flavonol), kukulkanin-A (chalcona),

ácido isocuprésico (diterpeno) y β -amirina (triterpeno) como marcadores de referencia y determinar grupos de compuestos con actividad biológica.

4.4.4.1. Desengrasado del extracto hidroalcohólico y preparación del extracto diclorometánico

Las resinas del extracto hidroalcohólico obtenidas en el punto 4.4.2.4 por duplicado, se le hacen el siguiente tratamiento:

- Disolver las dos muestras de resinas obtenidas en el punto 4.4.2.4 con 25 mL de Etanol 95°.
- Unir los dos extractos hidroalcohólicos en un solo balón de fondo redondo de 100 mL.
- Proteger el balón de la luz UV o cualquier fuente luminosa.
- Hacer el desengrasado con dos extracciones con 15 mL de *n*-Hexano en una ampolla de separación de 100 mL.
- Descartar la fase orgánica (*n*-Hexano/Cera) y seguir ocupando la fase acuosa (extracto hidroalcohólico).
- Hacer tres extracciones en la fase acuosa (extracto hidroalcohólico) con 15 mL de diclorometano en la ampolla de separación de 100 mL.
- Se recibe la fase diclorometánica en un balón de fondo redondo de 100 mL. Llevar el extracto diclorometánico a un volumen aproximado de 5.0 mL, con ayuda del rotaevaporador.
- Colocar el extracto diclorometánico desengrasado en un vial de vidrio.
- Rotular y almacenarlo en un lugar seco fuera de la luz.

Nota: Hacer el mismo procedimiento de extracción con las otras cinco muestras restantes.

4.4.4.2. Marcha analítica del método cromatográfico en capa fina (TLC)

Con el método cromatográfico en capa fina (TLC), se pretende identificar indirectamente metabolitos secundarios como diterpenos, triterpenos, chalconas y flavonoides.

- Preparar el eluyente compuesta por *n*-Hexano y Éter etílico (1:1).
- Saturar la cámara cromatográfica con la respectiva fase móvil por 1 hora.
- Preparar los marcadores de β -amirina (triterpeno), quercetina (flavonol), kukulkanin-A (chalcona) y ácido isocuprésico (diterpeno) con la concentración de 0.50 mg/mL (ver anexo N° 9).
- Medir 2.0 cm. de altura de base a la placa cromatográfica y 1.0 cm. en el borde superior con suavidad sin levantar el adsorbente.
- Aplicar con un capilar el marcador β -amirina preparado anticipadamente y también los seis extractos diclorometánicos obtenidos en el punto 4.4.4.1.
- Colocar la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica previamente saturada.
- Observar que el frente del solvente llegue a las tres cuartas partes de la placa y marcar su posición.
- Sacar la placa cromatográfica y dejar evaporar.
- Observar a la luz UV a una longitud de onda corta ($\lambda = 254$ nm) y a una longitud de onda larga ($\lambda = 365$ nm), marcar las manchas observadas.
- Rociar la placa cromatográfica con el respectivo reactivo revelador (Óleum) y calentar en placa calefactora a 105 °C.
- Medir el desplazamiento de las muestras y el marcador β -amirina.
- Documentar los resultados obtenidos del desplazamiento de cada una de las muestras y el marcador β -amirina.

- Utilizar la siguiente fórmula para determinar el coeficiente de reparto (R_f) y así identificar los componentes presentes a través del marcador con su respectiva coloración.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

Nota: Hacer el mismo procedimiento del punto 4.4.4.2 con los otros tres marcadores quercetina (flavonol), kukulkanin-A (chalcona) y ácido isocuprésico (diterpeno).

Condiciones:

- La fase estacionaria: Cromatoplasmas de Aluminio recubiertas de Sílica Gel GF₂₅₄ Marca Merck 20 x 20 cm.
- Fase móvil: *n*-Hexano/Éter etílico (1:1).
- Revelador: reactivo de óleum con calor.
- Evidencias: manchas de color ocre (triterpenos), manchas de color violeta (diterpenos), manchas de color amarillo (chalconas), manchas de color naranja a rojo (flavanonas y flavonas) después de calentar a 105 °C.

4.5. Diseño estadístico

En el diseño estadístico se analizaron los parámetros fisicoquímicos de cada muestra de propóleos, utilizando la desviación típica estándar para obtener resultados confiables de humedad, cenizas, resinas, contenido de plomo y cadmio. Con el contenido de cera no se realizó por ser única determinación.

4.5.1. Desviación típica estándar ⁽⁷⁾

Es la más importante de las medidas de dispersión; puede definirse como la raíz cuadrada de la media aritmética del cuadrado de las desviaciones de cada valor de la variable con respecto a la media. Es útil para obtener el intervalo de confianza y se representa con la siguiente ecuación:

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

Donde:

S = Desviación típica estándar.

X_i = Muestra individual.

\bar{X} = Promedio de muestras.

n = Numero de muestras.

Σ = Sumatoria desde muestra 1 a “n” número de muestras.

La desviación típica estándar se calculará mediante Microsoft Office Excel.

4.5.2. Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ⁽²⁸⁾

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) es de utilidad para comprobar si hay diferencia significativa en la media de los resultados obtenidos, en este caso nos

referimos al contenido promedio de resinas de los propóleos de cada muestra analizada; una vez que se ha determinado que existen diferencias entre las medias, la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) determina qué medias difieren contrastando la diferencia entre cada pareja de medias y generando una matriz donde los asteriscos indican las medias de grupo significativamente diferentes a un nivel alfa de 0,05.

Se evaluaron los resultados con el software STATGRAPHICS centurión XVI.I. Con los resultados se pretende identificar si el contenido de resina son diferentes entre cada muestra de las distintas áreas analizadas, se evaluó mediante el análisis de la varianza, utilizando el test de Fisher para un $p \leq 0.05$.

Para la comprobación se plantea las siguientes hipótesis:

$$H_0 = M_1 = M_2 = M_3 = M_4 = M_5 = M_6$$

$$H_1 = M_1 \neq M_2 \neq M_3 \neq M_4 \neq M_5 \neq M_6$$

La hipótesis nula indica que los contenidos promedios de resina del propóleos son similares entre cada sitio estudiado y la hipótesis alternativa indica que el contenido promedio de resinas del propóleos, al menos un sitio es diferente; el criterio de aceptación en el que se basara si existe diferencia significativa a un 95% de confianza fue el valor-p (un valor- P menor a 0.05 confirma la hipótesis alternativa e invalida la hipótesis nula). Si el P valor en la tabla ANOVA es bajo, entonces la media de la muestra debe ser examinada, para determinar qué medias son significativamente diferentes unas de otras.

A los resultados obtenidos de la investigación se les aplicó el análisis estadístico de un factor (ANOVA), el cual se presentó los datos en una tabla resumen. Lo cual se observó que el contenido promedio de resinas de cada propóleos analizado

presento diferencia significativa, se utilizó el test de Fisher (diferencia mínima significativa) para conocer según el sitio de recolección que contenido promedio de resinas difieren entre sí.

Para identificar que medias son significativamente diferentes, se evaluó por Intervalos LSD de Fisher (diferencia mínima significativa): Estos intervalos están escalados de modo que un par de muestras tiene medias significativamente diferentes si los intervalos no se solapan en la dirección vertical. Mientras la posibilidad de declarar incorrectamente dos muestras con media diferente con este método se fija en el 5.0 %.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Características organolépticas y fisicoquímicas de las seis matrices de propóleos.

5.1.1 Determinación de las características sensoriales del propóleos.

A continuación, se detallan los resultados (ver tabla N° 5) obtenidos del análisis sensorial de las seis muestras de propóleos recolectadas en cinco localidades de El Salvador. ⁽⁴⁶⁾

Tabla N° 5. Resultados obtenido del análisis organoléptico de las seis muestras de propóleos salvadoreño.

Código	Método de recolección	Aspecto	Consistencia	Olor	Sabor	Color
M1 El Rosario, Finca Los Claros	Malla	Granulado	Dura	Resinoso aromático	Picante	Café
M2 El Rosario, Quinta Neftaly	Raspado	Masa irregular con poco brillo	Poco blanda	Resinoso aromático	Picante	Café
M3 Huizúcar, Apiario Leonardo	Raspado	Trozos irregulares opacos	Blanda	Resinoso aromático	Dulce	Café
M4 Juayúa, Apiario Mario Calzadilla	Raspado	Masa irregular con poco brillo	Poco blanda	Resinoso suave	Insípido	Café
M5 Chilanga, Apiario Carlos Vargas	Malla	Granulado	Dura	Resinoso aromático	Insípido	Verde
M6 Jocoaitique, Apiario Mauricio Castro	Raspado	Trozos irregulares con brillo	Blanda	Resinoso aromático	Insípido	Café

Como se puede observar en la tabla N° 1. Las muestras de propóleos recolectadas por el método de malla con código “M1” y “M5” proveniente de El Rosario y Chilanga respectivamente, presentan consistencia dura y aspecto granulado debido a la implementación de recolecta por rejillas plásticas, la cual tienen pequeños orificios que las abejas rellenan con propóleos; cuando el apicultor extrae el propóleos de las rejillas plásticas estos tienden a tener aspecto granulado (ver anexo N° 10). ⁽²⁸⁾

Las otras muestras de propóleos recolectadas por el método de raspado o tradicional como las muestras “M2” (municipio El Rosario), “M3” (municipio Huizúcar), “M4” (municipio Juayúa) y “M6” (municipio Jocoaitique); se obtiene propóleos con aspecto opaco o carencia de brillo, se observa principalmente en aquellas obtenidas por el método de raspado. La ausencia de brillo en algunas de las muestras puede estar relacionada con la fitogeografía y la oxidación externa que sufre la resina. ⁽⁶⁾

De manera general las características organolépticas están en función del origen botánico y geográfico de la zona de recolección, debido a que la flora contribuye en algunas de las propiedades físicas como el color, olor y sabor. Por un lado, algunos investigadores han reportado que los propóleos pueden presentar coloración verde, debido a que las abejas recolectan la clorofila y aceites esenciales de brotes y hojas de diferentes géneros de especies vegetales. ⁽¹³⁾ En la presente investigación llama enormemente la atención que los propóleos de la zona de Chilanga (M5) presentan coloración verdosa y amarillenta, lo cual podrían estar relacionado con especies propias de bosques caducifolios de la zona como el conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*), laurel (*Cordia alliodora*), mangollano (*Pithecellobium dulce*) y tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora*).

Por otro lado, se observó que la mayoría de muestras de propóleos presentaron olor resinoso aromático, debido a la relación con las especies vegetales empleadas en el pecoreo de las abejas, con buen contenido de aceites esenciales principalmente aquellas zonas donde hay presencia de hierbas aromáticas, como el bálsamo (*Myroxylon balsamum*), eucalipto (*Eucaliptus sp.*) y pino (*Pinus sp.*).⁽⁶⁾

5.1.2 Análisis fisicoquímico del propóleos (ver anexo N° 11)

5.1.2.1. Determinación del porcentaje de humedad de las seis muestras de propóleos.

Se entiende por humedad a la pérdida de masa durante el proceso de desecación; es decir el agua de las muestras se pierde por volatilización a causa del calor. La cantidad de material residual después de eliminar la humedad, constituye la materia seca. Se detallan los resultados (ver tabla N° 6) obtenidos del porcentaje de humedad para cada muestra de propóleos.⁽²⁷⁾

Todas las muestras de propóleos se encuentran por debajo del valor límite que establece la Norma Salvadoreña, que permite un máximo de 8.0 % de humedad; el parámetro de humedad es considerado como un indicativo de calidad de los propóleos y está relacionada con las condiciones ambientales, manipulación y almacenamiento.⁽¹²⁾

A pesar del cumplimiento del parámetro de humedad de las seis muestras, las que presentan mayor humedad son las que provienen del municipio de Chilanga y Jocoaitique con humedad del 7.53% y 5.01% respectivamente, aproximándose al límite permitido. Cabe la posibilidad que esto se deba a que las abejas melíferas para elaborar el propóleos, se incorpore la clorofila de los árboles, aumentando el contenido de humedad,⁽¹³⁾ además hay que tener en cuenta la época de

recolección del propóleos, debido a que las muestras fueron recolectadas al inicio del invierno.

Tabla N° 6. Resultados obtenidos del porcentaje de humedad de las seis muestras de propóleos.

Código	Localidad	Método de recolección	% Humedad ($\bar{X} \pm S$)	Especificación NSO 65.19.02:03 (Máximo: 8.0 %)
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	Malla	3.80 ± 0.16	Cumple
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	Raspado	4.90 ± 0.03	Cumple
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	Raspado	4.77 ± 0.04	Cumple
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	Raspado	4.32 ± 0.14	Cumple
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	Malla	7.53 ± 0.16	Cumple
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Raspado	5.01 ± 0.16	Cumple

Se graficaron los porcentajes promedios de humedad de las seis muestras de propóleos según la zona de recolección (ver figura N° 3). La línea roja indica el límite máximo establecido por la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03) que es 8.0 % y las barras de color azul corresponde a cada muestra analizada, con ello se puede visualizar gráficamente que todas las muestras cumplen con el parámetro de humedad según la Norma salvadoreña, pero el propóleos de Chilanga (M5) contiene mayor porcentaje de humedad y en principio estaría más propensa al deterioro por microorganismos.

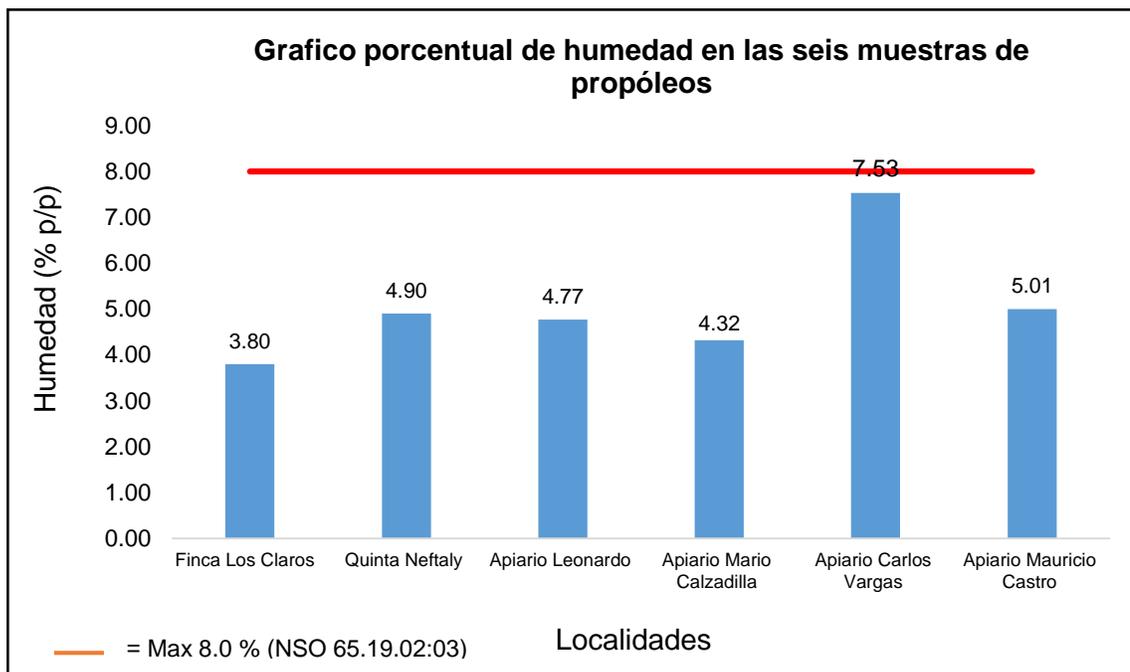


Figura N° 2. Promedio del porcentaje de humedad de las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”)

5.1.2.2. Determinación del porcentaje de cenizas de las seis muestras de propóleos.

La determinación del contenido de cenizas se basa en que una muestra pesada inicialmente y sometida a un proceso de calcinación a 500 °C, pierde los materiales o componentes orgánicos, obteniéndose un residuo inorgánico al que se le denomina cenizas. Se detallan los resultados (ver tabla N° 7) obtenidos del porcentaje de cenizas para cada muestra de propóleos. (3)

Tabla N° 7. Resultados obtenidos del porcentaje de cenizas en las seis muestras de propóleos

Código	Localidad	Método de recolección	% Cenizas ($\bar{X} \pm S$)	Especificación NSO 65.19.02:03 (Máximo: 5.0 %)
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	Malla	2.07 ± 0.10	Cumple
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	Raspado	2.80 ± 0.07	Cumple
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	Raspado	2.36 ± 0.01	Cumple
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	Raspado	2.24 ± 0.01	Cumple
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	Malla	1.93 ± 0.13	Cumple
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Raspado	2.11 ± 0.16	Cumple

Como se puede observar en la Tabla N° 7 todas las muestras de propóleos se encuentran por debajo del valor que propone la Norma, que permite un máximo de 5.0% de cenizas; por lo tanto, las seis muestras de propóleos cumplen satisfactoriamente con la norma. ⁽¹²⁾

El parámetro de cenizas es muy importante, por estar relacionado con impurezas mecánicas, minerales, arcilla, tierra, residuos de vegetales y contaminantes ambientales como los metales pesados; a pesar de que todas las muestras cumplen con la Norma salvadoreña, las muestras que presentaron mayor contenido de cenizas fueron aquellas recolectadas por el método de raspado (M2: 2.80%, M3: 2.36%, M4: 2.24%, M6: 2.11%) y las que presentaron menor contenido de cenizas fueron las que se recolectaron por el método de malla (M1:2.07%, M5:1.93%); de manera general la variación del contenido de cenizas entre las muestras es mínimo. Los valores de cenizas de todas las muestras están dentro

de la especificación, sugiere que durante el manejo apícola, se cumple la buena práctica de la no incorporación de impurezas mecánicas en el propóleo⁽³⁾

Se graficaron los porcentajes promedios de cenizas de las seis muestras de propóleos según la zona de recolección, en la gráfica de barra (ver figura N° 4), el eje vertical representa el porcentaje de cenizas (% p/p) y el eje horizontal el código de cada muestra analizada.

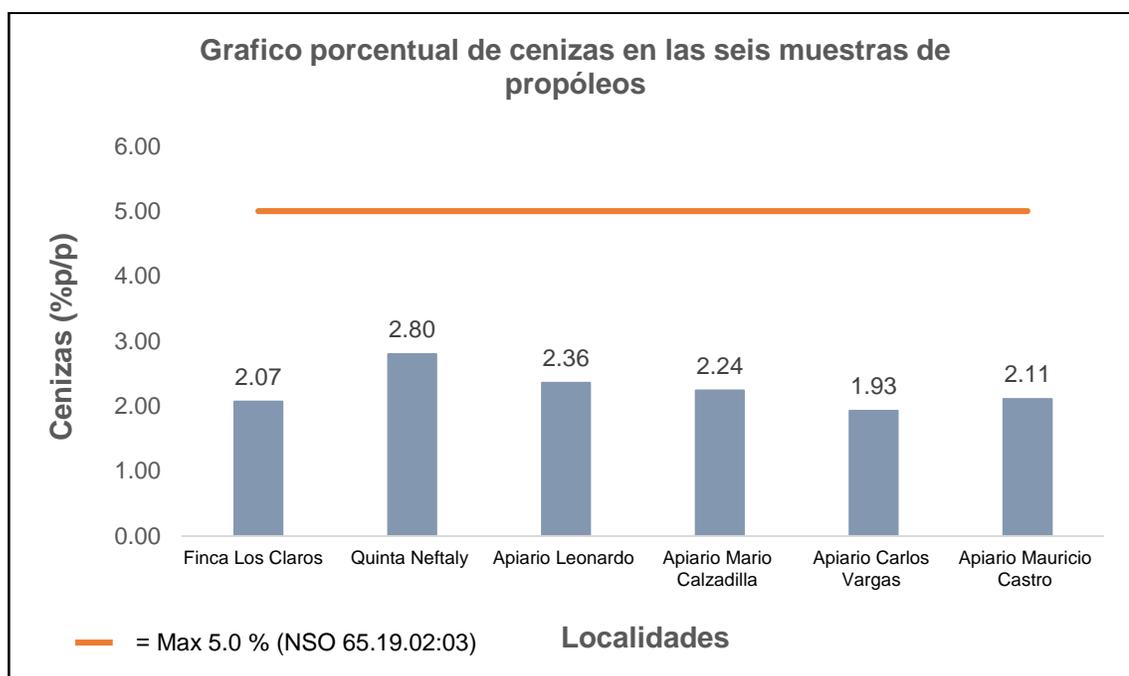


Figura N° 3. Promedio del porcentaje de cenizas en las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”)

5.1.2.3. Determinación del porcentaje de resinas de las seis muestras de propóleos

Las resinas constituyen como el principal elemento de calidad de propóleos, debido que esta fracción contiene los compuestos bioactivos de interés, pero su contenido puede variar debido a diferentes factores como: la fuente de exudados,

vegetación circundante, época de recolección y método de recolección. Se detallan los resultados (ver tabla N° 8) obtenidos del porcentaje de resinas para cada muestra de propóleos, la cual fueron recolectados por el método de raspado y malla plástica. ⁽⁴⁸⁾

Tabla N° 8. Resultados obtenidos del porcentaje de resinas en las seis muestras de propóleos

Código	Localidad	Método de recolección	% Resinas ($\bar{X} \pm S$)	Especificación NSO 65.19.02:03 30-35%
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	Malla	14.27 \pm 0.24	No cumple
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	Raspado	18.06 \pm 0.74	No cumple
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	Raspado	30.30 \pm 0.82	Cumple
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	Raspado	21.11 \pm 0.96	No cumple
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	Malla	50.45 \pm 2.01	Cumple
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Raspado	27.68 \pm 1.75	No cumple

Como se puede observar en la tabla N° 8 los porcentajes de resina obtenidos para cada muestra de propóleos, muestran diferencias entre sí. Los propóleos que presentaron mayor contenido de resina fueron de Chilanga (50.45 \pm 2.01%) colectado por el método de malla y Huizúcar (30.30 \pm 0.82%) colectado por el método de raspado, estos datos están conformes al establecido a la Normativa salvadoreña (NSO 65.19.02:03), que establece un mínimo de 30.0% de resinas; en el resto de muestras de propóleos (M1, M2, M4 y M6) presentaron un contenido

de resinas menor al valor mínimo exigido por la norma, demostrándose la calidad inferior del propóleo. ⁽¹²⁾

El parámetro de resinas es determinante en la calidad de propóleos, este se encuentra relacionado con el rendimiento de compuestos orgánicos, cuanto mayor sea el valor de esta fracción, mejor será en términos de calidad del producto final, puesto que, en los compuestos solubles en etanol se encuentran las sustancias con actividad biológica como los polifenoles, flavonoides, chalconas y los terpenos polares.

El porcentaje relativamente bajo de resina para los propóleos (M1:14.27%, M2:18.06%, M4:21.11% y M6:27.68%), se debe probablemente, al alto contenido de ceras que fueron agregadas por las abejas con el fin de darle mayor consistencia al propóleo, por otra parte se puede pensar que las especies vegetales circundantes al colmenar, no son muy ricas en resinas; o que durante la recolección, especialmente por el método de raspado, se presente un manejo pos cosecha inapropiado por parte del apicultor, mezclando el propóleo con ceras de la colmena. En nuestro caso, también la época de recolección influye en el contenido de resinas, según Vilorio y Col, este parámetro aumenta significativamente final del verano. ⁽⁴⁶⁾

Se graficaron los porcentajes promedios de resinas de las seis muestras de propóleos según la zona de recolección, en la gráfica de barra (ver figura N° 5).

La línea roja indica el límite mínimo establecido por la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03) que es 30.0% de resinas y las barras de color amarillo corresponde a cada muestra analizada, con ello se puede visualizar gráficamente que solamente dos muestras (M3 y M5) cumplen con el parámetro de resina según la Norma Salvadoreña, donde la muestra proveniente de Chilanga (M5: 50.45%) presentó el mayor porcentaje de resinas a comparación con las demás muestras.

Estos resultados reflejan la alta capacidad que tienen las abejas melíferas de recolectar propóleos con grandes cantidades de metabolitos secundarios provenientes de resinas del bosque caducifolio. La extracción con etanol al 90° y la utilización del equipo de ultrasonido para tal fin, permite extraer de los propóleos compuestos sumamente polares como los flavonoides y polifenoles.

El resto de muestras de propóleos (M1, M2, M4 y M6) presentaron un contenido de resinas menor al valor mínimo exigido por la norma; a pesar del incumplimiento de este parámetro, sería muy interesante seguir analizando espectroscópicamente estos propóleos, con el fin de identificar metabolitos secundarios de interés biológico.

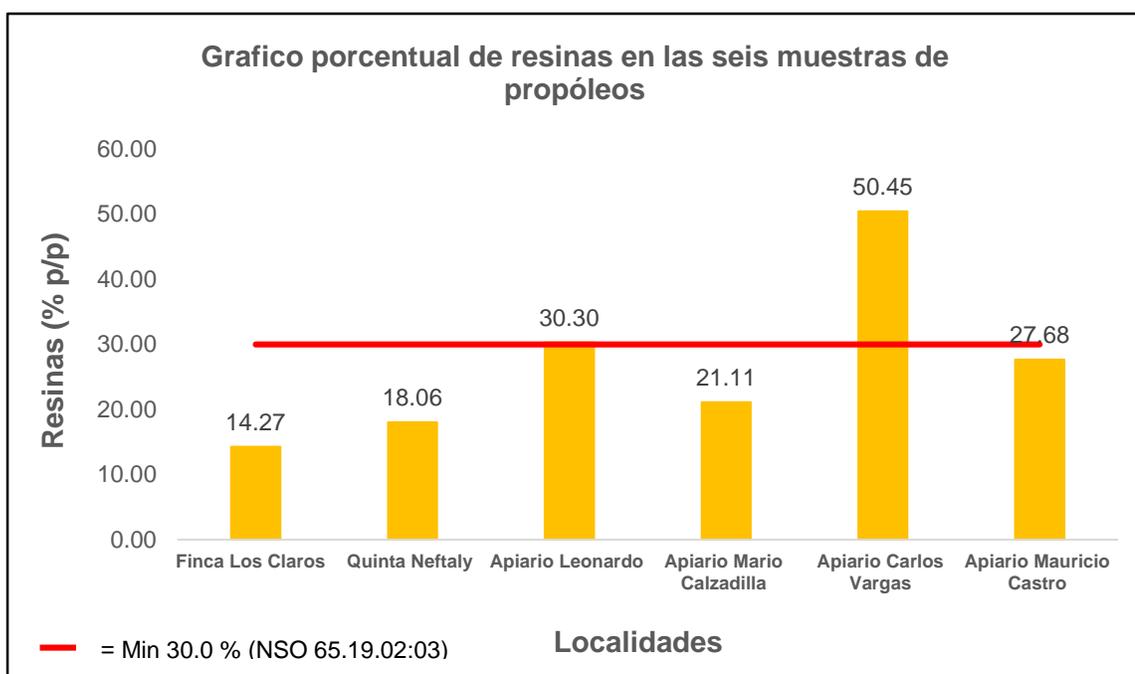


Figura N° 4. Promedio del porcentaje de resinas en las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”)

5.1.2.4. Determinación del porcentaje de cera de las seis muestras de propóleos.

Desde el punto de vista de calidad un alto contenido de cera no es favorable porque esta no presenta actividad biológica; la cantidad de cera puede variar debido a diferentes factores como el tipo de vegetación circundante, época de recolección y método de recolección. Se detallan los resultados (ver tabla N° 9) obtenidos del porcentaje de cera para cada muestra de propóleos, la cual fueron recolectadas por el método de raspado y malla plástica.

Tabla N° 9. Resultados obtenidos del porcentaje de ceras en las seis muestras de propóleos

Código	Localidad	Método de recolección	% Ceras ($\bar{X} \pm S$)	Especificación NSO 65.19.02:03 Máximo: 30%
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	Malla	63.74	No cumple
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	Raspado	60.98	No cumple
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	Raspado	52.15	No cumple
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	Raspado	68.64	No cumple
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	Malla	37.55	No cumple
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Raspado	49.58	No cumple

Como se puede observar en la tabla N° 9, todas las muestras de propóleos presentaron altos contenidos de ceras (M1:63.74%, M2:60.98%, M3:52.15%, M4:68.64%, M5:37.55% y M6:49.58%), valores superiores al valor máximo permitido por la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03), que permite un máximo

de 30.0% de ceras; por lo tanto, las seis muestras de propóleos no cumplen satisfactoriamente la Norma. ⁽¹²⁾

Las abejas con sus mandíbulas tienden a elaborar propóleos con diferentes proporciones de resina-cera. Un alto contenido de ceras es desfavorable para el propóleos, restándole calidad al mismo. ⁽⁴⁸⁾ Se graficaron los porcentajes de ceras de las seis muestras de propóleos según la zona de recolección, en la gráfica de barra (ver figura N° 6).

La línea roja indica el límite máximo establecido por la NSO 65.19.02:03, que es 30.0% de ceras y las barras de color amarillo corresponde a cada muestra analizada, con ello se puede visualizar gráficamente que todas las muestras analizadas no cumplen con el parámetro de ceras según la norma.

En parte, esto se debe a que estos propóleos tienen una consistencia resinosa, rica en terpenos de tipo triterpenos y diterpenos solubles en *n*-hexano, los cuales fueron arrastrados por dicho solvente y se agregaron al contenido de ceras, esto se pudo corroborar con una inyección por TLC de los residuos de ceras de las muestras, haciéndolas eluir en una fase móvil, *n*-hexano acetato de etilo (8:2), que al ser revelada con oleum, se evidenciaron una buena proporción de ese tipo de metabolitos.

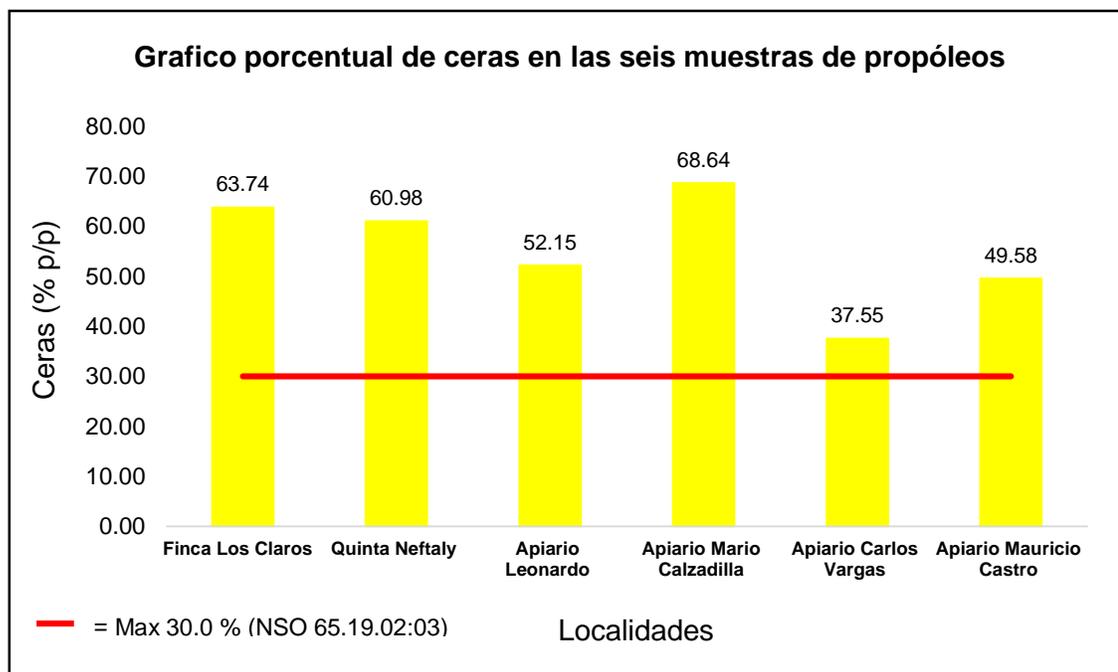


Figura N° 5. Promedio del porcentaje de ceras en las seis muestras de propóleos comparado con la especificación de la Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03 “Calidad de propóleos crudo”)

El dato que destaca, es el propóleos de Chilanga, con la menor proporción de ceras, esto concuerda con el alto contenido de humedad y la identificación indirecta de terpenos, flavonoides y chalconas identificados por TLC. ⁽¹³⁾

Por otra parte, se graficaron los porcentajes de ceras contra resinas de las seis muestras de propóleos según la zona de recolección, en la gráfica lineal (ver figura N° 7). La línea de color naranja representa el contenido de ceras y la azul el contenido de resinas, con ello se ve reflejado la proporcionalidad inversa (mayor contenido de ceras, menor contenido de resinas). Si se parte del principio que la calidad del propóleos se evalúa por la proporción cera-resinas; podríamos decir que mientras menor sea la diferencia entre dichos valores como tal se observa en

las muestras M5 y M3, mejor será la calidad del propóleo, siempre que el contenido de resinas cumpla la especificación de la norma. (27)

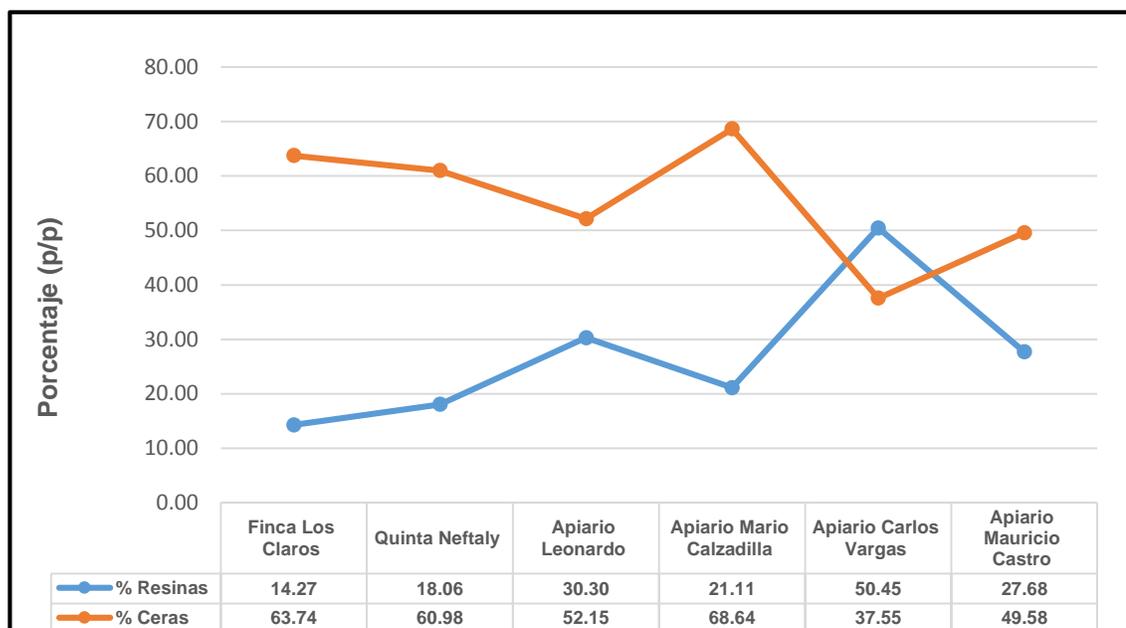


Figura N° 6. Gráfico lineal del contenido de resina contra el contenido de cera de las seis muestras de propóleos

5.2. Cuantificación de metales pesados (plomo y cadmio) por método de absorción atómica. (Ver anexo N° 12)

5.2.1. Análisis de plomo en las muestras de propóleos

El plomo es un metal pesado que se incluye dentro de los parámetros de calidad del propóleo por tratarse de un producto que puede captarlo del medio ambiente o según el manejo de la colmena y método de cosecha. Su valor máximo permitido es de 5.0 ppm según la NSO 65.19.02:03. Se detallan los resultados (ver tabla N° 10) obtenidos de la concentración de plomo para cada sitio de recolección de propóleos. (1, 17)

Tabla N° 10. Lecturas promedios del análisis de plomo para cada muestra de propóleos recolectados en cinco localidades de El Salvador

Código	Localidad	Método de recolección	Pb (ppm) ($\bar{X} \pm S$)	Especificación NSO 65.19.02:03 Máx. 5 ppm Pb
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	Malla	0.560 ± 0.06	Cumple
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	Raspado	0.332 ± 0.06	Cumple
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	Raspado	0.297 ± 0.03	Cumple
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	Raspado	0.276 ± 0.02	Cumple
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	Malla	0.149 ± 0.01	Cumple
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Raspado	0.617 ± 0.12	Cumple

Los resultados experimentales de plomo mostraron diferencias de concentración en cada sitio de muestreo; pero en ninguno de los casos, la concentración detectada, supera el límite máximo permitido (5.0 ppm). ⁽¹²⁾

5.2.2. Análisis de cadmio en las muestras de propóleos

Unas de las limitantes que presenta la normativa salvadoreña es que no contempla parámetro para concentración de cadmio en los propóleos, es por ello, que se utilizó como comparación los resultados obtenidos por otro estudio realizado en matrices de propóleos en Turquía ⁽³¹⁾, en condiciones de zonas boscosas similares a las nuestras, donde establecieron el rango de concentración de cadmio (0.60 -1.80 ppm) para el propóleos. Se detallan los resultados (ver tabla N° 11) obtenidos de la concentración de cadmio para cada muestra de propóleos.

Tabla N° 11. Lecturas promedios del análisis de cadmio para muestras de propóleos recolectados en cinco localidades de El Salvador

Código	Localidad	Método de recolección	Cd (ppm) ($\bar{X} \pm S$)	Especificación Max. (0.60-1.80) ppm Cd*
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	Malla	ND**	Cumple
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	Raspado	ND**	Cumple
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	Raspado	ND**	Cumple
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	Raspado	ND**	Cumple
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	Malla	ND**	Cumple
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	Raspado	0.13 ± 0.0	Cumple

* Matin, G., Kargar, N., & Buyukisik, H. B. (2016). Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecological Engineering*, 90, 331–335.

** ND: No detectable (< 0.01 ppm)

Los resultados presentados en la tabla N° 11; muestran que las concentraciones de cadmio en las seis matrices de propóleos son muy bajas, encontrando solamente trazas de cadmio para una muestra (M6) y para el resto de muestras (M1-M5) mostraron niveles no detectables del metal pesado.

Para todas las muestras, los resultados experimentales de concentraciones de plomo muestran un valor muy por debajo de los establecidos en la Normativa salvadoreña, cuantificando en la mayoría de los casos trazas. Los datos obtenidos en la investigación parecen indicar que el lugar de recolección se encuentra ubicado en zonas libre de contaminación por plomo provenientes de la industria agrícola e industrial. ⁽¹²⁾

Los resultados obtenidos en el análisis de cadmio en propóleos son satisfactorios, al ser comparados con resultados reportados por estudios científicos previos, realizados en zonas boscosas. ⁽³¹⁾

La emisión de gases de los vehículos y la quema de llantas, madera, plásticos, textiles, entre otros, permiten la acumulación de los contaminantes atmosféricos y teniendo en cuenta que las resinas de las plantas acumulan estos contaminantes como los metales pesados y son transferidos al propóleo por las abejas.

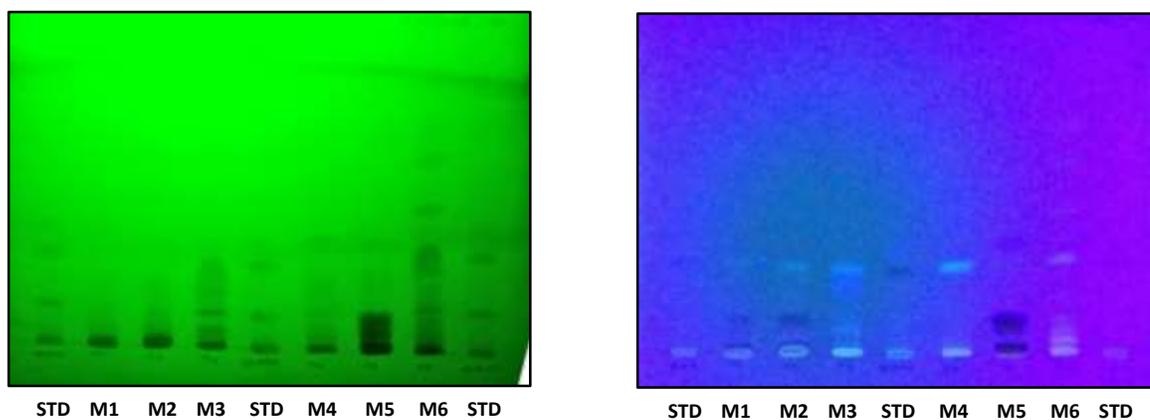
Las seis muestras analizadas cumplen con la normativa para plomo (no mayor 5 ppm) y para la concentración de cadmio, se encuentran por debajo reportados por estudios previos, los que nos lleva a pensar que todos los apiarios están alejados de contaminantes ambientales. ⁽¹⁾

5.3. Análisis del perfil cromatográfico por TLC de seis muestras de propóleos

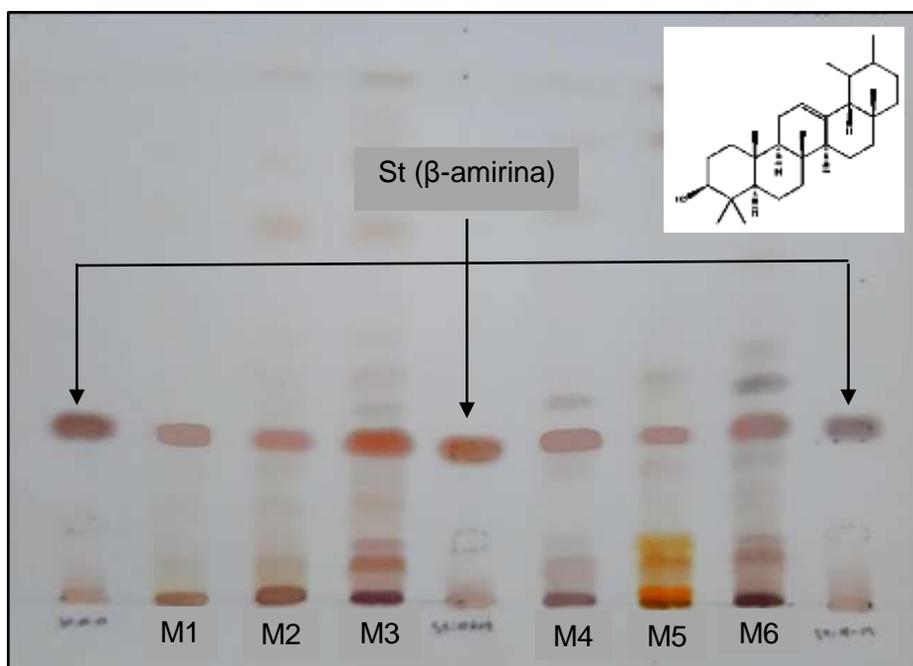
La obtención de los extractos diclorometánico en el punto 4.4.4.1, se le realizaron el análisis cromatográfico por TLC, la cual se detallan los resultados obtenidos en los siguientes puntos:

5.3.1. Identificación de triterpenos (β -amirina)

La separación de componentes de los extractos de propóleos mediante la diferencia de velocidad de elución, junto al marcador triterpénico (β -amirina), el cual se evidencia como una mancha de color ocre, con un R_f de 0.3, luego de aplicar el reactivo revelador (óleum), se observa que en la placa cromatográfica la β -amirina no es visible a luz ultravioleta tanto para longitud de onda corta (254 nm) como para longitud de onda larga (365 nm), debido a que no presenta grupos cromóforos en su estructura molecular (ver figura N° 8).



a) Revelado en longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm)



b) Revelado con el reactivo óleum

Figura N° 7. Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de β -amirina en las seis muestras de propóleos

Los resultados presentados en la tabla N° 12; muestran los R_f del marcador de referencia (β -amirina) y de las muestras. Se observa que las seis muestras presentaron R_f muy similares al marcador.

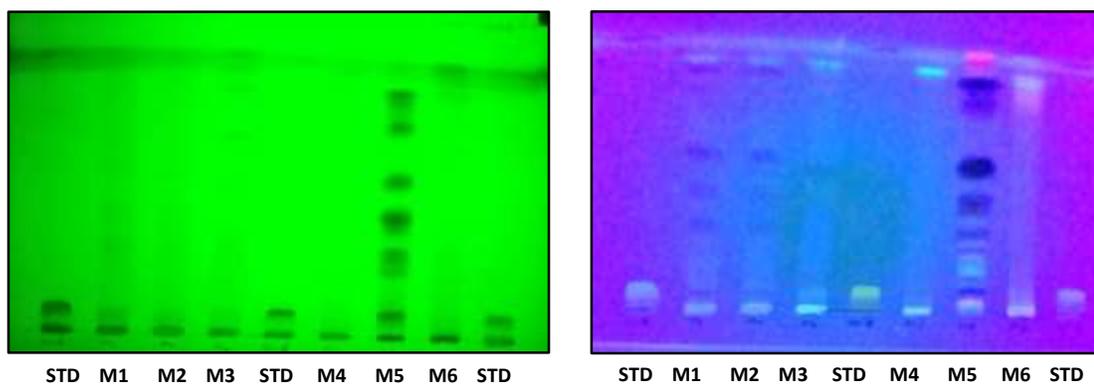
Tabla N° 12. Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (β -amirina) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica

Estándares y muestras		Desplazamiento (cm)	R_f
Estándares	ST1-A	3.6	0.30
	ST2-A	3.3	0.28
	ST3-A	3.6	0.30
Muestras	M1 Finca Los Claros, El Rosario	3.4	0.28
	M2 Quinta Neftaly. El Rosario	3.4	0.28
	M3 Apiario Leonardo. Huizúcar	3.4	0.28
	M4 Apiario Mario Calzadilla. Juayúa	3.4	0.28
	M5 Apiario Carlos Vargas. Chilanga	3.5	0.29
	M6 Apiario Mauricio Castro. Jocoaitique	3.7	0.31
Frente del solvente		12.8 cm	

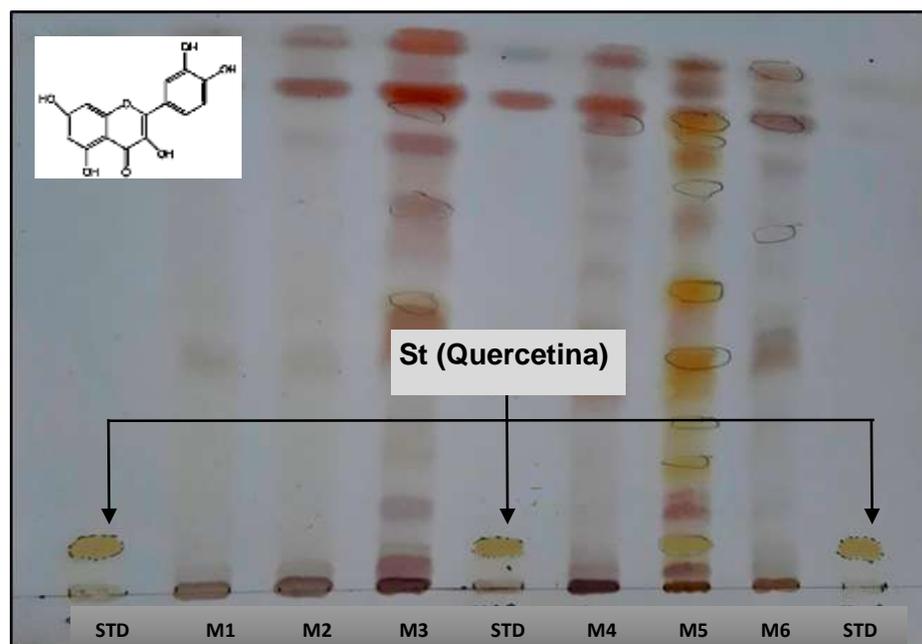
5.3.2. Identificación de flavonoide (quercetina)

Los flavonoides presentan fluorescencia a longitud de onda corta y larga, debido a que poseen dos grupos cromóforos, uno perteneciente al anillo aromático unido a una cetona y el otro por la cetona α, β insaturada, con un grupo aromático como sustituyente. Además se puede apreciar en la cromatoplaqa más manchas que pertenecen a moléculas de esta naturaleza. Según bibliografía consultada los diferentes tipos de flavonoides pueden ser amarillos, verdes, naranja, celestes, rojo.

Los flavonoides en general se identifican con el reactivo óleum, presentando manchas de color amarillo-naranja a rojo (ver figura N° 9). En esta oportunidad se evalúa el color de la mancha y desplazamientos de R_f similar al marcador de referencia (quercetina).



a) Revelado en longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm)



b) Revelado con el reactivo óleum

Figura N° 8. Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de quercetina en los propóleos.

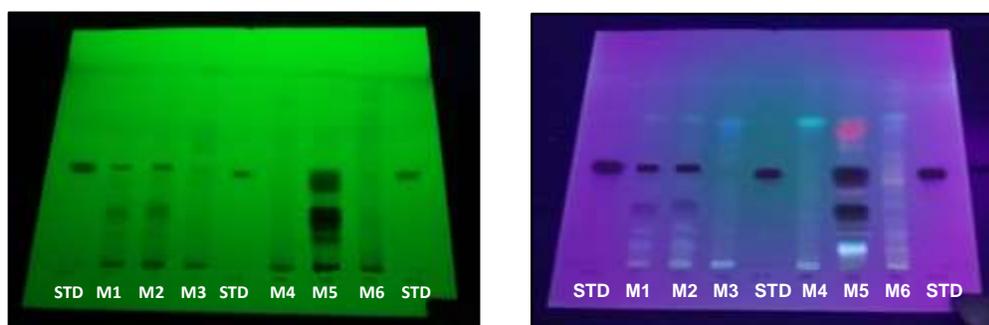
Los resultados presentados en la tabla N° 13; muestran los desplazamientos y R_f del marcador de referencia (quercetina) y de las seis muestras de propóleos. Los cuales se observa que únicamente la muestra de Chilanga (M5) presento R_f muy similar al marcador, se evidencia el desplazamiento del metabolito de interés como una mancha de color amarillo-naranja después de aplicar el reactivo revelador óleum.

Tabla N° 13. Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (quercetina) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica

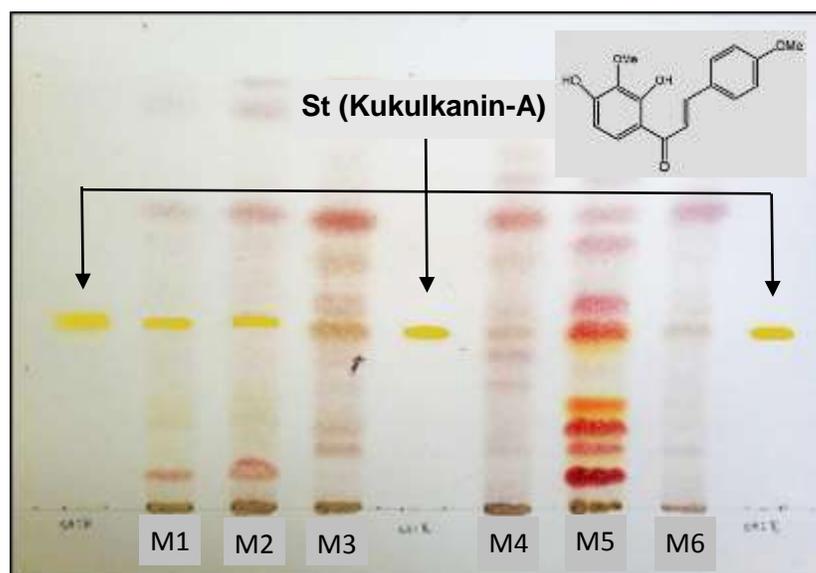
Estándares y muestras		Desplazamiento (cm)	R_f
Estándares	ST1-Q	0.9	0.1
	ST2-Q	0.9	0.1
	ST3-Q	0.9	0.1
Muestras	M1 Finca Los Claros, El Rosario	--	--
	M2 Quinta Neftaly. El Rosario	--	--
	M3 Apiario Leonardo. Huizúcar	--	--
	M4 Apiario Mario Calzadilla. Juayúa	--	--
	M5 Apiario Carlos Vargas. Chilanga	0.9	0.1
	M6 Apiario Mauricio Castro. Jocoaitique	--	--
Frente del solvente		13.1 cm	

5.3.3. Identificación de chalcona (kukulkanin-A)

En términos generales muchas chalconas se identifican con el reactivo óleum, presentando manchas de color amarillas (ver figura N° 10). En esta oportunidad comparamos el apareamiento y valor de R_f con el marcador de referencia kukulkanin-A, siendo detectable en la luz visible y ultravioleta onda corta y larga, Debido a que en su estructura molecular presentan dos grupos cromóforos.



a) Revelado en longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm)



b) Revelado con el reactivo óleum

Figura N° 9. Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de kukulkanin-A en los propóleos

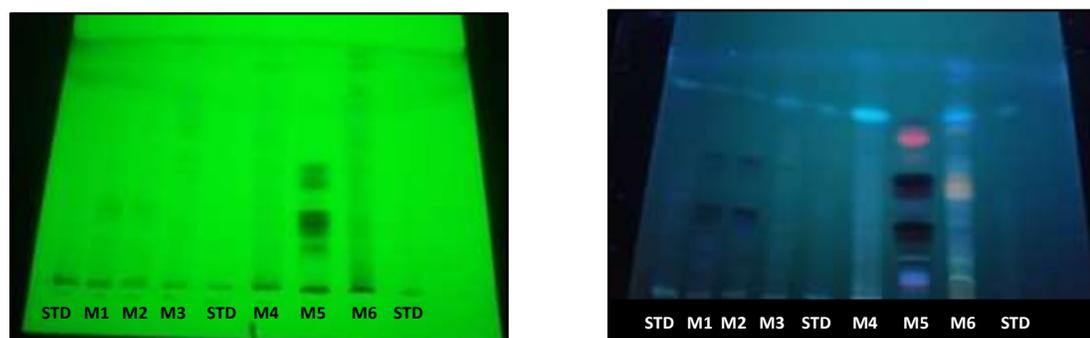
Los resultados presentados en la tabla N° 14; muestran los R_f del marcador de referencia (kukulkanin-A) y de las muestras, donde se observa que, los propóleos de M1 (Finca los Claros), M2 (Quinta Neftaly) y M5 (Apiario Carlos Vargas). Lo que nos lleva pensar que las abejas recolectan de la flora circundante, el propóleos que contienen este metabolito tipo chalcona, propio de la zona norte del departamento de Morazán. Además, llama la atención la cantidad de manchas que correspondiente a compuestos de tipo flavonoide, especialmente en la muestra M5.

Tabla N° 14. Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (kukulkanin-A) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica

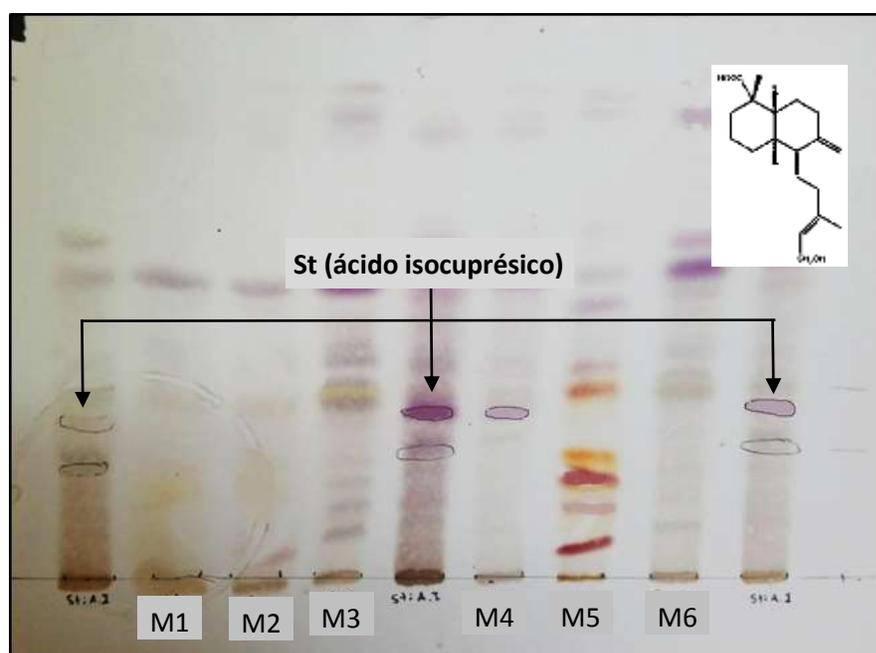
Estándares y muestras		Desplazamiento (cm)	R_f
Estándares	ST1-K	4.7	0.43
	ST2-K	4.5	0.41
	ST3-K	4.6	0.42
Muestras	M1 Finca Los Claros, El Rosario	4.7	0.43
	M2 Quinta Neftaly. El Rosario	4.8	0.44
	M3 Apiario Leonardo. Huizúcar	--	--
	M4 Apiario Mario Calzadilla. Juayúa	--	--
	M5 Apiario Carlos Vargas. Chilanga	4.5	0.41
	M6 Apiario Mauricio Castro. Jocoaitique	--	--
Frente del solvente		13.0 cm	

5.3.4. Identificación de diterpenos (ácido isocuprésico)

Para las muestras de propóleos se intentó identificar indirectamente compuestos del tipo diterpenos sin unión a un azúcar. Estos se revelaron con el revelador óleum, presentando manchas de color violeta (ver figura N° 11). Luego se comparan con el R_f del marcador de referencia (ácido isocuprésico).



a) Revelado en longitud de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm)



b) Revelado con el reactivo óleum.

Figura N° 10. Resultados de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificación de ácido isocuprésico en los propóleos

En la placa cromatográfica (ver figura N° 11), se evidencia el desplazamiento del metabolito de interés como una mancha de color violeta después de aplicar el reactivo revelador (óleum), también se observa que en la placa cromatográfica, el ácido isocuprésico no es visible a luz ultravioleta, tanto para longitud de onda corta (254 nm) como para longitud de onda larga (365 nm), debido a que en su estructura molecular no presentan grupos con dobles enlaces conjugados que absorben al ultravioleta. En la tabla N° 15, se detallan los resultados obtenidos del desplazamiento y R_f del marcador de referencia y muestras de propóleos.

Tabla N° 15. Desplazamiento y R_f del marcador de referencia (ácido isocuprésico) y muestras de propóleos en la placa cromatográfica

Estándares y muestras		Desplazamiento (cm)	R_f
Estándares	ST-AI	3.9	0.35
	ST-AI	3.8	0.34
	ST-AI	3.6	0.32
Muestras	M1 Finca Los Claros, El Rosario	--	--
	M2 Quinta Neftaly. El Rosario	--	--
	M3 Apiario Leonardo. Huizúcar	--	--
	M4 Apiario Mario Calzadilla. Juayúa	3.8	0.34
	M5 Apiario Carlos Vargas. Chilanga	--	--
	M6 Apiario Mauricio Castro. Jocoaitique	--	--
Frente del solvente		13.8 cm	

Los resultados muestran los R_f del marcador de referencia (ácido isocuprésico) y de las muestras, se observa que de las seis muestras analizadas, solamente la

muestra que proviene del cantón Los Naranjos de Juayua (M4) presentó desplazamiento de R_f similar al marcador diterpénico: ácido isocuprésico.

En la tabla N°16 se presenta el resumen obtenido del análisis del perfil cromatográfico por TLC, donde se detallan los grupos de metabolitos secundarios identificados en cada matriz de propóleos.

Tabla N° 16. Resumen de los resultados del perfil cromatográfico en capa fina (TLC) de los propóleos estudiados

Código	Localidad	Grupos de Metabolito secundario			
		Fla	Cha	Dit	Tr
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	(-)	(+)	(-)	(+)
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	(-)	(+)	(-)	(+)
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	(-)	(-)	(-)	(+)
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	(-)	(-)	(+)	(+)
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	(+)	(+)	(-)	(+)
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	(-)	(-)	(-)	(+)

* Codificación: Fla (Flavonoide), Cha (Chalconas), Dit (Diterpenos), Tr (Triterpenos), (+) presencia del metabolito secundario, (-) no presencia del metabolito secundario.

La identificación de triterpenos usando a la β -amirina como marcador de referencia. El resultado de las seis muestras de propóleos con igual color ocre, e identificados con valores de R_f , se deduce que las seis muestras tienen presente dentro de su composición química **triterpenos** del tipo alfa y beta amirina, que corresponden a la serie de ursano y oleano respectivamente. Estos triterpenos se encuentran distribuidos en gran número de especies vegetales y son los responsables de darle la consistencia de laca resinosa y sabor amargo a los propóleos.

En las muestras analizadas por TLC, unos de los resultados importantes en la identificación de **chalconas** que también pertenecen a los flavonoides, específicamente *trans* chalconas, utilizando la kukulkanin-A como referencia. Este metabolito se encuentra presente únicamente en los propóleos de la zona norte del departamento de Morazán (El Rosario y Chilanga). Estos resultados son importantes para continuar la caracterización de los propóleos de la zona norte de Morazán, por las altas cantidades presentes de kukulkanin-A, este puede en determinado momento ser un marcador de la denominación de origen de los propóleos de la zona. Estudios previos demuestran a la kukulkanin-A, que han sido aislada e identificada en especies del género fabáceas, como el conacaste (*Enterolobium cyclocarpum*) y tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora*). ^(13, 36) Por otra parte la cantidad de compuestos relacionados a los flavonoides de tipo: flavona, flavanona y flavonoles, son evidentes en el recorrido de la muestra de propóleos de Chilanga, un muy buen punto de partida para un estudio exhaustivo toda la gama de flavonoides haciendo uso de métodos espectroscópicos y espectrométricos presentes en esta muestra.

El metabolito de referencia **quercetina**, es un flavonoide con muchos grupos hidroxilos dentro de su estructura molecular; presenta un R_f sumamente bajo por la alta polaridad de la molécula. De acuerdo a nuestros resultados la quercetina se encuentra presente en los propóleos del municipio de Chilanga, Morazán. Una curiosidad de este metabolito es que se encuentra en altas proporciones en árboles frutales como el marañón (*Anacardium occidentale*) y el mango (*Mangifera indica*). ⁽⁴²⁾ Aunque en el propóleos de Chilanga solo se identificó con la comparación de estándar de referencia la quercetina y kukulkanin-A (chalcona), en la cromatoplaqueta puede también observarse fluorescencia de otras moléculas tipo flavonoides tipo flavonas y flavanonas. También se puede corroborar la presencia de una mancha roja en el frente del solvente, correspondiente a la

clorofila de la muestra, lo que concuerda con el alto porcentaje de humedad para la muestra M5 (Chilanga). ⁽²⁹⁾

Existe una correlación en la identificación del **ácido isocuprésico** en la muestra de propóleos de la zona de los naranjos Juayúa, debido a que este metabolito se ha aislado en grandes cantidades de especies vegetales que le pertenecen a la familia las coníferas como el pino (*Pinus sp*) y ciprés (*Cupressus lusitanica*), que es la flora predominante de las zonas montañosas del departamento de Sonsonate. ^(34, 44) Los derivados del ácido isocuprésico han demostrado poseer efecto abortivo en bovinos, por lo que podría investigarse la actividad anticonceptiva de estos compuestos.

5.4 Análisis estadístico

5.4.1 Análisis ANOVA entre contenido de resinas y el lugar de recolección.

El análisis de un factor (ANOVA) es un método estadístico que permite conocer si existe diferencia significativa entre el contenido promedio de resinas y las distintas áreas analizadas para ello se utilizó el programa STATGRAPHICS centurión XVI.I. Con la finalidad de evaluar el comportamiento de los datos experimentales obtenidos en el análisis del contenido de resinas del propóleos con respecto al sitio de recolección, se aplicó el análisis de varianza de un factor (ANOVA).

Tabla N° 17. Resultados del análisis del contenido de resinas en las muestras de propóleos evaluados

Muestra	Localidad	% Resinas	% Promedio
M1	Finca los Claros. Cantón La Laguna, El Rosario.	14.44	14.27
		14.10	
M2	Quinta Neftaly. Cantón La Laguna, El Rosario.	18.58	18.06
		17.53	
M3	Apiario Leonardo. Municipio de Huizúcar	29.72	30.30
		30.88	
M4	Apiario Mario Calzadilla. Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa.	20.43	21.11
		21.79	
M5	Apiario Carlos Vargas. Cantón las Joyas del Municipio de Chilanga.	51.87	50.45
		49.03	
M6	Apiario Mauricio Castro. Municipio de Jocoaitique.	28.92	27.68
		26.45	

Para revelar si existe una diferencia significativa entre el contenido de resinas y cada sitio de recolección del propóleos, se plantean como hipótesis nula (H_0) e hipótesis alternativa (H_i) lo siguiente:

- H_0 = El contenido promedio de resina del propóleos son similares entre cada sitio estudiado.
- H_i = El contenido promedio de resinas del propóleos, al menos un sitio es diferente.

$$H_0 = M_1 = M_2 = M_3 = M_4 = M_5 = M_6$$

$$H_1 = M_1 \neq M_2 \neq M_3 \neq M_4 \neq M_5 \neq M_6$$

Un análisis del P-Valor (obtenido de tabla) para todas las muestras de propóleos es menor que $\alpha = 0.05$ para un nivel de confianza del 95%, acogemos la hipótesis alternativa debido a que hay diferencias en al menos una media del contenido de resinas del propóleos y de los seis sitios (ver tabla N° 18).

Tabla N° 18. Análisis de varianza para el contenido de resinas en las muestras de propóleos de diferentes localidades.

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales	----	----	----	----	---
A: Localidades	1676.03	5	335.207	213.95	0.0000
Residuos	7.83387	5	1.56677	----	----
Total (corregido)	1685.32	11	---	----	----

Para identificar entre que sitios existe diferencia del contenido promedio de resinas para cada propóleos; se aplica el test de Fisher (LSD). Criterio de aceptación el cual indica que existe diferencia significativa a un 95% de confianza es un valor-P < 0.05.

5.4.2. Prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher.

El análisis de diferencia mínima significativa (LSD) sirvió en la investigación para identificar que par de medias (contenido de resinas) son significativamente diferentes del sitio de muestreo.

Tabla N° 19. Resultados del test de Fisher (LSD) para el contenido de resinas

Localidades	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
M1	2	14.27	0.885091	X
M2	2	18.06	0.885091	X
M4	2	21.11	0.885091	X
M6	2	27.68	0.885091	X
M3	2	30.30	0.885091	X
M5	2	50.45	0.885091	X

Esta tabla N° 19 se muestra la identificación de cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se han identificado 4 grupos homogéneos

según la alineación de las “X” en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de “X”. En este caso, la muestra M2 y M4 es un grupo homogéneo, ya que son significativamente diferente de todos los demás. La muestra M6 y M3 es otro grupo homogéneo y no presentan diferencia entre sus medias. La muestra M1 y M5 son completamente diferentes del resto de medias.

En la Figura N° 12 se muestra los intervalos LSD de Fisher (Diferencia Mínima Significativa). Estos intervalos están escalonados de modo que un par de muestras tiene medias significativamente diferentes, si los intervalos no se solapan en la dirección vertical. Ya que el intervalo para la muestra M1 no solapa ningún otro intervalo, la media de la muestra M1 difiere significativamente de las otras cinco muestras. La muestra M5 también es significativamente diferente del resto de muestras, ya que sus intervalos no se solapan más intervalo. La media de la muestra M2 no es significativamente diferente de la muestra M4, el mismo caso se presenta para la muestra M3 y M6.

El análisis ANOVA permitió identificar que los sitios muestreados en al menos un sitio, el contenido de resinas es diferente del resto de muestras, apoyándonos en el P-valor que fue menor del 0.05, el cual asegura con mayor certeza que hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las resinas y los sitios.

La prueba diferencia mínima significativa (LSD de Fisher), se identificó que par de medias son diferentes, los resultados indicaron que la muestra M1 (Finca los Claros), se ubica muy por debajo de la media y M5 (Apiario Carlos Vargas) sobrepasa con creces a la media. Curiosamente ambos apiarios tienen sistema de recolección con malla plástica, lo que podría llegar interpretarse, que este factor no afecta en el rendimiento de resinas. También se logró identificar que los pares

de muestras (M2, M4) y (M3, M6), no presentan diferencias en el porcentaje de resinas.

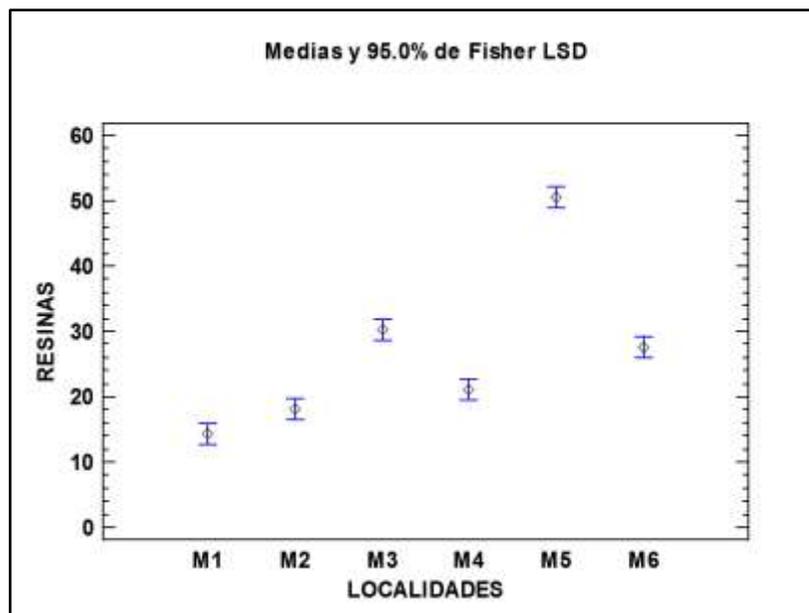


Figura N° 11. Gráfico de medias para el contenido de resinas de cada muestra de propóleos

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los propóleos provenientes de los seis sitios muestreados: Muestra N° 1, Muestra N° 2, Muestra N° 3, Muestra N° 4, Muestra N° 5, Muestra N° 6, presentaron características organolépticas y fisicoquímicas muy variables. Ninguna muestra cumple a cabalidad con todos los parámetros de la Normativa Salvadoreña (NSO 65.19.02:03, Calidad del propóleos crudo).
2. Todas las muestras de propóleos estudiados cumplen con los parámetros de humedad y cenizas, según lo recomendado por la Normativa Salvadoreña vigente, lo que indica que la calidad de estos propóleos no es afectada por estos parámetros.
3. En el incumplimiento del parámetro de la prueba de ceras de la Normativa Salvadoreña de las muestras: Muestra N° 3, Muestra N° 4 y Muestra N° 5 influye la alta solubilidad de compuestos de tipo terpénicos en *n*-hexano, usado para la prueba.
4. Los propóleos colectados en zonas deforestadas, provoca una menor cantidad de resinas disponibles para las abejas, obligándolas a producir mayor cantidad de ceras con el fin de rellenar los orificios de la colmena.
5. El parámetro crítico del contenido de resinas en propóleos, se relaciona con la cantidad de metabolitos secundarios presentes, dicha exigencia es cumplida únicamente por el propóleos de Huizúcar (Muestra N° 3) y Chilanga (Muestra N° 5).

6. Para las seis matrices de propóleos estudiadas, la concentración de plomo no sobrepasa los límites máximos permitidos por la Norma Salvadoreña, así como las especificaciones de cadmio reportadas en zonas boscosas en estudios previos. Estos resultados son un indicativo pureza y de elaboración de propóleos alejados de fuentes de contaminación de vehículos automotores principalmente.
7. El perfil cromatográfico por capa fina, logro identificar en todas las muestras de propóleos: triterpenos de la serie del ursano y oleano tipo alfa y beta amirina respectivamente; flavonoides del tipo flavonol (quercetina) y *trans* chalconas, junto con la evidencia de compuestos relacionados de tipo flavona, flavanona y flavonoles, presentes en los propóleos de la zona de bosques caducifolios de la zona norte del departamento de Morazán; y la identificación del ácido isocuprésico en el sitio de Juayúa, que se correlaciona con su flora propia de bosques de coníferas.
8. La calidad del propóleos está relacionada con el cumplimiento del contenido de resinas y ceras. Los resultados experimentales obtenidos, indican una proporcionalidad inversa de estas dos determinaciones, concluyendo la complementariedad entre ambas.
9. La aplicación del análisis de varianza (ANOVA) y el test de Fisher se determinó que hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las resinas y los sitios de recolección, especialmente de las muestras N° 1 con valores sumamente bajos, y la muestra N° 5 con valores muy por encima de la media respectivamente, por ende se observa que es la mejor evaluada y esto se comprueba porque posee tres de los cuatro metabolitos ensayados.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Efectuar de forma inmediata el acondicionamiento de la muestra de propóleos una vez recolectado, con el objetivo de evitar que se deteriore la matriz de propóleos por el crecimiento de microorganismos.
2. Que los apicultores utilicen espátulas de acero inoxidable para realizar el raspado de propóleos para evitar la contaminación con metales pesados en propóleos. También los colmenares deben ubicarse lejos de cultivos agrícolas, carreteras, zonas industriales, así como de lugares donde se puedan acumular metales pesados.
3. Evaluar la actividad microbiológica, antioxidante, citotóxica y antiinflamatoria junto con las propiedades fisicoquímicas (fenoles totales), de los extractos diclorometánicos obtenidos.
4. Realizar un bio-monitoreo por TLC de los metabolitos secundarios kukulkanin-A y quercetina, en las resinas producidas por las especies vegetales que rodean los apiarios estudiados de la zona norte de Morazán; focalizado la familia fabaceae, para identificar las especies vegetales que producen estos tipos de metabolitos.
5. Investigar mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, la elucidación estructural de metabolitos secundarios del tipo flavonoides, chalconas y triterpenos del propóleos de Chilanga.
6. Cuando se pretenda elaborar formas farmacéuticas a base de materias primas apícolas como el propóleos, a nivel artesanal o industrial se debe

asegurar el respectivo control de la calidad fisicoquímico y microbiológico, antes de ser empleada en la elaboración de sus productos.

7. Promover en las Universidades, Ministerio de Agricultura y Ganadería, incentiven y apoyen a los apicultores por medio de capacitaciones, en cuanto a buenas prácticas de apicultura y como mejorar la calidad en la producción de los mismos, para que estos se aumenten la producción de propóleos con criterios técnico científico.
8. Realizar estudios microbiológicos frente a cepas de bacterias gram positivas y gram negativas, de los propóleos de la zona norte de Morazán.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Alcici, NMF (1997). Heavy metal in propolis. *Bee products*, 231–238. doi: 10.1007 / 978-1-4757-9371-0_28
2. Álvarez, Y. Trama, A. Tabera, A. (2017). Desarrollo de un producto a base de miel con agregado de propóleos. Tesis de la Carrera de Licenciatura en Tecnología de los Alimentos. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina.
3. Angulo, J. (2014). Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo, utilizados en la empresa APICARE – RIOBAMBA. Tesis de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior de Politécnica de Chimborazo. Ecuador.
4. Barrientos, K. Sermeño, L. (2010). Determinación de plomo en diferentes marcas de labiales en barra por método de absorción atómica con llama y emisión atómica con plasma inductivo. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador.
5. Beltrán, L. Hernández, K. Rodríguez, A. (2017). Determinación de cadmio en chocolate de mesa comercializado en la zona Metropolitana de San Salvador. Tesis en Ingeniería de alimentos. Universidad de El Salvador. San Salvador.
6. Benítez, J. (2012). Caracterización físico-química de propóleos de los Municipios de San Julián, La Palma y Corinto. Tesis de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Dr. Matías Delgado. San Salvador. El Salvador.

7. Carrión, A. García, C. (2010). Preparación de Estratos vegetales, Determinación de eficiencia metodológica. Tesis de Bioquímica y Farmacia. Universidad de Cuenca. Ecuador.
8. Castillo, J. Castillo, M. Hernández, E. (2013). Propuesta de fortalecimiento a las iniciativas de micro y pequeñas empresas con potencial turístico a través de un diagnóstico territorial en el municipio de Huizúcar, departamento de La Libertad. Tesis de Licenciatura en administración de empresa. Universidad de El Salvador. San Salvador.
9. Chaillou, L. L., Herrera, H. A., & Maidana, J. F. (2004). Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciencia en Tecnología de Alimentos*, 24(1), 11–15. doi:10.1590/s0101-20612004000100003
10. Chávez, E. Torres, R. (2016). Determinación de amarillo nº 5 y nº 6 en bebidas no carbonatadas comercializadas en el campus central de la Universidad de El Salvador. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador.
11. Chicas, Diego. (2014). Determinación de parámetros fisicoquímicos en mieles y propóleos de distintos géneros de abejas por medio de técnicas electroanalíticas. Tesis en Ciencias Químicas. Universidad de El Salvador. San Salvador. El Salvador.
12. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) et al. (2003). Calidad de propóleos crudo. Norma Salvadoreña (NSO 65.19.02:03). Diario oficial. San Salvador. El Salvador.

13. Domínguez, XA, García G., S., Williams, HJ, Ortiz, C., Scott, AI y Reibenspies, JH (1989). Kukulkanins A y B, New Chalcones de *Mimosa tenuifolia*. *Journal of Natural Products*, 52 (4), 864–867. doi: 10.1021/np50064a035.
14. Fabricio, S. Ordoñez, C. (2005). Métodos de purificación del propóleo para su posterior aplicación en sanidad animal. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Escuela Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
15. González, L. Resino, J. (2015). Determinación de la concentración de plomo y arsénico en agua para consumo animal y en leche cruda en cuatro Ganaderías de El Salvador. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador.
16. Gutiérrez, M. (2015). Validación y determinación de plomo, arsénico y mercurio en especies marinas por espectrometría de absorción atómica. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador.
17. Hernández, S. Morataya, M. (2017). Análisis fitoquímico y determinación de metales pesados, minerales y oligoelementos, en plantas medicinales comercializadas en el mercado Central de San Salvador. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador.
18. <http://marketingsonsonate.blogspot.com/2012/10/municipio-de-juayua.html>. Consultado 13/03/19.

19. <http://www.municipiosdeelsalvador.com/la-libertad/huizucar>.
Consultado 11/03/19.
20. <http://www.municipiosdeelsalvador.com/morazan/chilanga>.
21. <http://www.municipiosdeelsalvador.com/morazan/el-rosario-3>.
Consultado 20/03/19.
22. <http://www.municipiosdeelsalvador.com/morazan/jocoaitique>.
Consultado 21/03/19.
23. <http://www.municipiosdeelsalvador.com/sonsonate/juayua>.
Consultado 25/03/19.
24. <https://www.alamy.es/foto-miel-de-abeja-colmena-de-abejas-apis-apis-mellifica-de-izquierda-a-derecha-reina-zumbido-macho-y-trabajador-hembra-studio-picture-12344886.html>. Consultado 25/03/19.
25. <https://www.google.com.sv/search?ei=TWfjXLfxM6HX5gLyyYTIBg&q=http%3A%2F%2Fsv%2Fjspui%2Fbitstream%2F11592%2F7174%2F2%2F338.4791-A385d%20Capitulo%2520I.pdf>. Generalidades de turismo y ecoturismo en el departamento de Morazán. Consultado 18/03/19.
26. Ibarra, R. Henríquez, S. García, G. Chica, N. (2009). Flora y Fauna de El Rosario y sus alrededores, Morazán, El Salvador. Revista Ministerio del Medio Ambiente Y Recursos Naturales. 1(1). 2-4.

27. López, J. Ubillús, M. (2004). Estandarización del propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Tesis de Licenciado en Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
28. Lozina, L. Peichoto, M. Acosta, O. Granero, G. (2010). Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Lat. Am. J. Pharm.* 29 (1): 102-10 (2010).
29. Manrique, R. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis Ecosistemas, Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España, vol. XII, núm. 1.
30. Martínez, J. (2009). Caracterización físico química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste Antioqueño. Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Colombia.
31. Matin, G., Kargar, N., & Buyukisik, H. B. (2016). Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecological Engineering*, 90, 331–335. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.01.035.
32. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). Anuario de Estadísticas Agropecuarias, El Salvador 2017-2018. Gobierno de la república de El Salvador. (On line). Disponible en: <http://www.mag.gob.sv/direccion-general-de-economia-agropecuaria/estadisticas-agropecuarias/anuarios-de-estadisticas-agropecuarias>.

33. Ministerio de Economía. (2008). IV Censo Agropecuario. República de El Salvador. (On línea). Disponible en:
http://old.mag.gob.sv/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=35&Itemid=229.
34. Noushin, A. Alireza, N. (2017). Diterpenos de propóleos como una fuente biológica notable para el desarrollo del descubrimiento de fármacos: una revisión. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 18 (6), 1290. doi: 10.3390/ijms18061290.
35. Pierini Gastón. (2014). Desarrollo de métodos analíticos para la evaluación de parámetros de calidad de propóleos. Tesis de doctor en Química. Universidad Nacional del Sur. Bahía blanca. Argentina.
36. Popova, M., Bankova, V., Spassov, S., Tsvetkova, I., Vides Silva, M., Tsartsarova, M., & Naydenski, C. (2001). New Bioactive Chalcones in Propolis from El Salvador. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 56(7-8), 593–596. doi:10.1515/znc-2001-7-819.
37. PROAPI. (2001). Propóleos valioso producto de la colmena. (On line). Disponible en: <http://www.mieldemalaga.com/data/propoleos.ar.pdf>.
38. Puerto, N. Prieto, G. Castro, R. (2016). Análisis proximal y fisicoquímico de propóleos provenientes de apiarios boyacenses. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 14(2), 126-140.

39. Ramos, R. Soriano, S. (2004). Propuesta de métodos analíticos para determinar la calidad de la jalea real producida por la abeja (*Apis mellifera*) y Comercializada en El Salvador. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador. El Salvador.
40. Rodríguez, J. Escobar, C. (2018). Desarrollo productivo del sector apícola zona Cuscatlán (Cabañas). Tesis de Pregrado de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de El Salvador. San Salvador. El Salvador.
41. Romero, Salvador. (2012). Propuesta de un plan de rescate de la imagen arquitectónica para mejorar el atractivo turístico de la Ciudad de Jocoaitique del departamento de Morazán. Tesis de Maestría en Desarrollo Local Sostenible. Universidad de El Salvador Paracentral. San Vicente, El Salvador.
42. Serra, J. Gutiérrez, A. (2011). Actividad antioxidante y fenoles totales de propóleos del País Vasco (Noreste de España). Soc Oil Chem. Volumen 1. (1792), 1-5. doi: 10.1007/s11746-011-1792-1.
43. Silva, L. Restrepo, S. (2012). Determinación de la oferta floral apícola como mecanismo para optimizar producción, diferenciar productos de la colmena y mejorar la competitividad. Flora apícola colombiana. Volumen 1. (4928), 9-10.
44. Tsvetkova, I. Popova, M. Bankova, V. Naydenski, C.; Silva, M.V. (2001). The first glycosides isolated from propolis: diterpene rhamnosides. Z. Naturforsch. C J. Biosci. 2001, 56, 1108–1111. doi: 10.1515/znc-2001-11-1230.

45. Vázquez, J. (2010). Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola, Cuenca del Salado, PCIA, de Buenos Aires. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Argentina.
46. Vilorio, J. Gil, J. Durango, L. García C. (2012). Caracterización Físicoquímica del propóleos de la región del Bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). Tecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 10 No. 1 (77 - 86).
47. Wang, K. Hu, L. Jin, X. Ma, Q. Marcucci, M. Netto, A. Sawaya, A. Huang, S. (2015). Los extractos de propóleos ricos en polifenol de China y Brasil ejercen efectos antiinflamatorios al modular la ubicación de TRAF6 durante la activación de NF- κ B. J. Funct. Alimentos 2015, 19, 464–478.
48. Yoong, A. (2004). Caracterización físico-química del propóleos de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. Tesis de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Zamorano. Honduras.

GLOSARIO

1. **Abeja melífera:** Nombre común para designar a la *Apis mellifera*. ⁽²⁾
2. **Acondicionamiento:** Todas las operaciones necesarias para envasar, empacar y etiquetar el producto, hasta llegar a la presentación final para su conservación, almacenamiento y distribución. ⁽²⁷⁾
3. **Compuestos fenólicos:** Son compuestos aromáticos que, junto a los flavonoides, le confieren a los propóleos sus usos y aplicaciones biológicas. ⁽³⁾
4. **Contaminantes:** Productos perjudiciales para la salud como metales pesados, agroquímicos y productos veterinarios. ⁽¹⁾
5. **Flavonoide:** Pigmentos provenientes de exudados vegetales con múltiples aplicaciones biológicas: antibacteriana, antiparasitaria, antimicótico, antiviral, antioxidante, inmunoestimulante, cicatrizante, antiinflamatoria entre otras). ⁽³⁾
6. **Impureza:** Elementos ajenos al propóleos, que han sido incorporados durante el proceso de recolección y manipulación de este, por ejemplo: abejas, patas de abejas o parte de ellas, conglomerados de cera de abejas, residuos de papel, plástico, madera. ⁽¹²⁾
7. **Mallas y Rejillas plásticas:** Son dispositivos plásticos que presentan orificios de diferentes tamaños para inducir que las abejas melíferas produzcan propóleos. ⁽²⁾

8. **Materia prima:** Ingrediente de cualquier origen utilizado en la elaboración de productos terminados. ⁽¹²⁾

9. **Mezcla resinosa:** Residuo del propóleos crudo después de la extracción alcohólica (etanol). ⁽²⁷⁾

10. **Pecoreo:** Acción ejecutada por la abeja, que consiste en coleccionar de determinadas fuentes, néctar, polen, propóleos y agua. ⁽²⁾

11. **Propóleos bruto:** Son los propóleos obtenidos directamente de la colmena, sin ningún tipo de tratamiento. ⁽²⁸⁾

12. **Propóleo o propóleos:** Nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante. ⁽³⁰⁾

13. **Solubilidad:** propiedad que posee un sólido de disolverse en un líquido, para el caso del propóleos se emplea etanol (alcohol etílico) como solvente. ⁽³⁾

ANEXOS

ANEXO N° 1
ORGANIZACIÓN DE LAS ABEJAS



a)



b)



c)

Figura N° 12. Individuos de la colmena *Apis mellifera*. a) Reina, b) Zángano, c) Obrera ⁽³⁾

ANEXO N° 2.
FORMATO DE ETIQUETAS

Nombre de la muestra: Propóleos de La Laguna.

Fecha de recolección: 14/03/2019 Código: M1

Método de recolección: Rejilla plástica o malla.

Lugar de recolección: Cantón La Laguna del Municipio de El Rosario, departamento de Morazán (Finca los Claros).

Nombre de la muestra: Propóleos de La Laguna.

Fecha de recolección: 24/03/2019 Código: M2

Método de recolección: Raspado o tradicional.

Lugar de recolección: Cantón La Laguna del Municipio de El Rosario, departamento de Morazán (Quinta Neftaly).

Nombre de la muestra: Propóleos de Huizúcar.

Fecha de recolección: 29/03/2019 Código: M3

Método de recolección: Raspado o tradicional.

Lugar de recolección: Municipio de Huizúcar, departamento de La Libertad (Apiario Leonardo).

Nombre de la muestra: Propóleos de Los Naranjos.

Fecha de recolección: 08/04/2019 Código: M4

Método de recolección: Raspado o tradicional.

Lugar de recolección: Cantón Los Naranjos del Municipio de Juayúa, departamento de Sonsonate (Apiario Mario Calzadilla).

Nombre de la muestra: Propóleos Las Joyas.

Fecha de recolección: 14/05/2019 Código: M5

Método de recolección: Rejilla plástica o malla.

Lugar de recolección: Cantón las Joyas del Municipio La Chilanga, departamento de Morazán (Apiario Carlos Vargas).

Nombre de la muestra: Propóleos de Jocoaitique.

Fecha de recolección: 27/05/2019 Código: M6

Método de recolección: Raspado o tradicional.

Lugar de recolección: Municipio de Jocoaitique, departamento de Morazán (Apiario Mauricio Castro).

ANEXO N° 3
UBICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROPÓLEOS
CRUDO

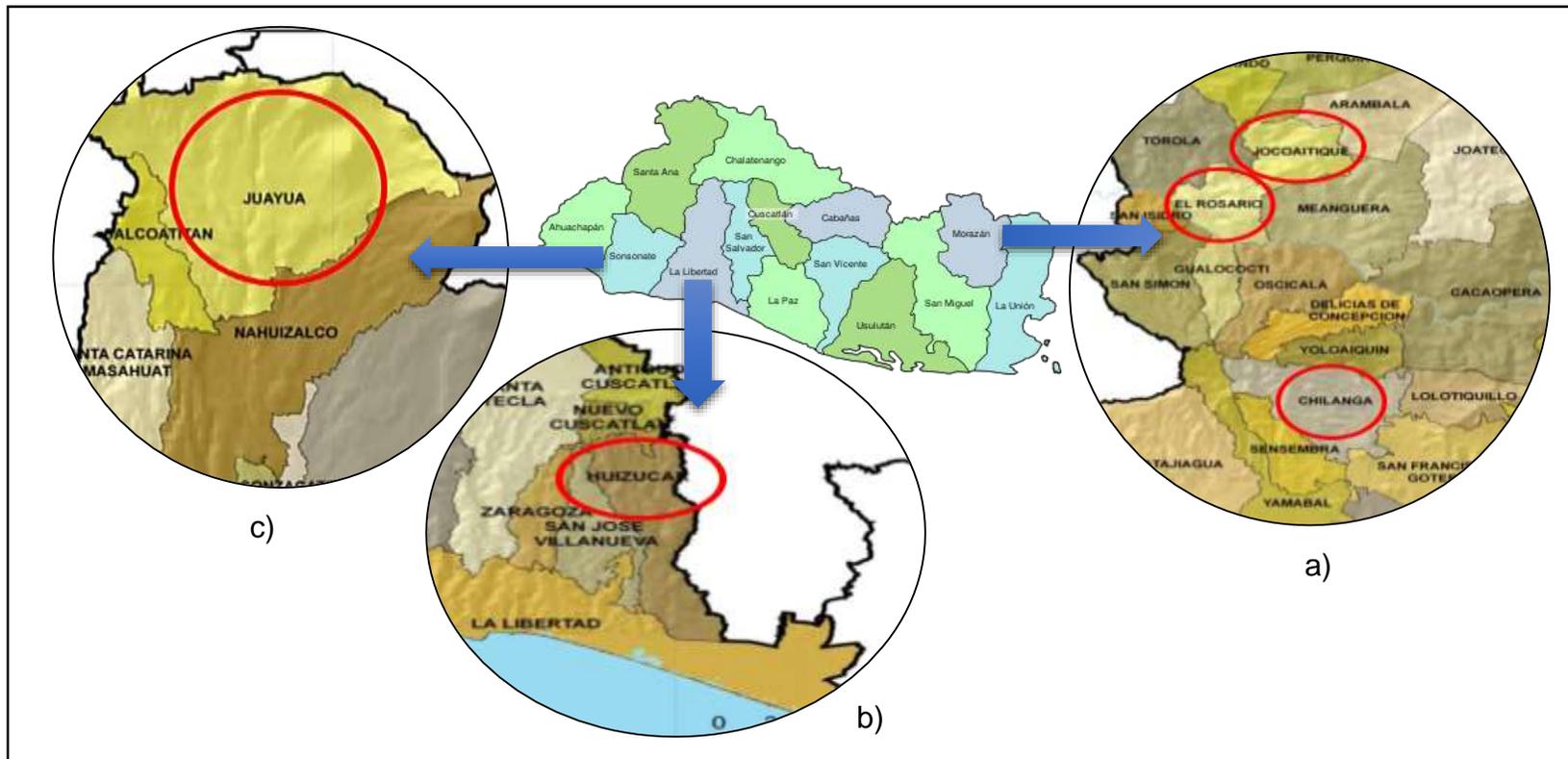


Figura N° 13. a) Ubicación geográfica de los municipios del El Rosario, Jocoaitique, Chilanga del departamento de Morazán, b) Ubicación geográfica del municipio de Huizúcar del departamento de la Libertad, c) Ubicación geográfica del municipio de Juayúa del departamento de Sonsonate.

ANEXO N° 4
CRISTALERIA, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIALES Y CRISTALERIA

- Agitadores de vidrio
- Ampolla de separación 100 mL
- Aro metálico
- Balones de fondo redondo 100 mL y 250 mL.
- Balones volumétricos 25 mL y 100 mL
- Baño maría
- Base metálica
- Cajas de Aluminio
- Cámara cromatográfica de vidrio
- Crisoles de porcelana
- Cromatoplasmas de Aluminio 20 x 20 cm.
- Dedales de celulosa
- Desecador
- Embudo de vidrio
- Espátula de acero inoxidable
- Etiquetas de papel
- Filtro de membrana 0.45 μm .
- Guantes
- Hot-plate
- Jeringas de 3 mL.
- Lápiz de grafito
- Marcador permanente
- Mascarilla para gases
- Papel filtro Whatman # 42
- Papel glassine
- Papel toalla
- Pinza sostén

- Pipeta de Mohr 1 mL y 5 mL
- Pipetas Pasteur
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Pizeta plástica
- Probetas 25 mL, 50 mL y 100 mL
- Recipiente de plástico con tapadera hermética.
- Regla de 20 cm
- Vaso de precipitado de 25 mL, 50 mL y 100 mL,
- Viales de vidrios de 5 mL

EQUIPOS

- Balanza analítica
- Cámara de extracción de gases Fisher Hamilton
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica (Shimadzu) AA-7000
- Estufa (YAMATO F0810C)
- Extractor soxhlet
- Horno de Grafito GFA-7000
- Hot plate
- Lámpara UV (Spectronics CM-10)
- Molino de cuchillas (Licuadora Oster)
- Mufla (YAMATO FO300CR)
- Rota-evaporador (RE100-Pro Rotary)
- Ultra refrigeradora (HAIRE DW-40W100)
- Ultrasonic bath BRANSON M2800H

REACTIVOS

a) Reactivos utilizados en el análisis fisicoquímico:

- Éter etílico
- Ácido Clorhídrico concentrado
- Agua osmotizada
- Diclorometano
- Etanol 95°
- *n*-hexano
- Reactivo revelador Óleum.
- Soluciones estándares de quercetina, kukulkanin-A (0.50mg/mL)
- Soluciones estándares de β -amirina y ácido isocuprésico (0.50mg/mL)

b) Reactivos utilizados en la determinación de metales pesados (Cadmio y Plomo).

- Ácido Clorhídrico concentrado
- Ácido nítrico (1:1)
- Agua osmotizada
- Solución Estándar de 1000 ppm de plomo
- Solución Estándar de 1000 ppm de cadmio
- Solución de Nitrato de paladio (II)

ANEXO N° 5
NORMA SALVADOREÑA (NSO 65.19.02:03, CALIDAD DE PROPÓLEOS
CRUDO)

CALIDAD DE PROPOLEO CRUDO

CORRESPONDENCIA: Esta norma es una adaptación del Reglamento Técnico Brasileño para la Calidad de Propóleos.

ICS 65.140

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Colonia Médica, Avenida Dr. Emilio Alvarez, Pasaje Dr. Guillermo Rodríguez Pacas, # 51, San Salvador, El Salvador, Centro América. Tel: 226-2800, 225-6222; Fax.: 225-6255; e-mail: info@conacyt.gob.sv.

Derechos Reservados.

INFORME

Los Comités Técnicos de Normalización del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, son los organismos encargados de realizar el estudio de las normas. Están integrados por representantes del Sector: Productor, Gobierno, Organismo de Protección al Consumidor y Académico Universitario.

Con el fin de garantizar un consenso nacional e internacional, los proyectos elaborados por los Comités se someten a un período de consulta pública durante el cual puede formular observaciones cualquier persona.

El estudio elaborado fue aprobado como NSO 65.19.02:03, por el Subcomité Técnico de Normalización de Propóleos. La oficialización de la norma conlleva la ratificación por Junta Directiva y el Acuerdo Ejecutivo del Ministerio de Economía.

Esta norma está sujeta a permanente revisión con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias de la técnica moderna. Las solicitudes fundadas para su revisión merecerán la mayor atención del organismo técnico del Consejo: Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad.

MIEMBROS PARTICIPANTES DEL COMITE 19

Nombre	Institución / Empresa
Vladimir Umazor	Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, MSPAS
Roberto Armando Perdomo	MAG-CONAPIS
Dagoberto Pérez Rivera	Dirección de Protección al Consumidor, MINEC
Napoleón Edgardo Paz Quevedo	Facultad de Ingeniería Agronómica, UES
Elisa Peña de Valiente	VAPE S.A. de C.V.
Raquelina de Huevo	SwissContact/Pro-Empresa
Claudia Verónica Alfaro	Universidad Centroamericana José Simeón Cañas, UCA
José German Vides	Apiarios Vides Silva
Zoila Isabel de Alarcón	Facultad de Química y Farmacia, UES
Marta Alicia de Portillo	Facultad de Química y Farmacia, UES
Myrna Evelyn de Vanegas	CONACYT
Evelyn Xiomara Castillo	CONACYT

1. ALCANCE**1.1 OBJETIVO**

Establecer la identidad y los requisitos mínimos de calidad que debe cumplir el propóleo crudo.

1.2 APLICACION

La presente norma es referente al propóleo crudo, destinado para su comercialización.

2. DEFINICIONES

- 2.1 Propóleo:** es el producto originado de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, colectadas por abejas melíferas, de brotes y exudaciones de corteza, hojas y otras partes de las plantas, a las cuales las abejas agregan secreciones salivales y cera para la elaboración final del propóleo.

3. CLASIFICACION Y DESIGNACION**3.1 Clasificación:** esta puede ser en base a:

- Su origen botánico: especificando la especie ó tipo de vegetación predominante en el área de pecoreo.
- Su origen geográfico: ya sea por la zona (altura a nivel del mar), lugar y/o localidad.
- Su color: uniforme en su presentación.

3.2 Designación (denominación de venta): Propóleo, propóleos o própolis.**4. COMPOSICION Y REQUISITOS****4.1 COMPOSICION**

El propóleo se compone de cera de abejas melíferas, resinas, productos balsámicos, aceites esenciales, polen y micro elementos.

4.2 REQUISITOS

4.2.1 Características Sensoriales:

Olor : característico (balsámico y resinoso) dependiendo de su origen botánico, pudiendo variar de leve a intenso

Color: amarillo, café , verde, gris y otros, variando tonalidad conforme a su origen botánico.

Sabor: de suave balsámico a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.

Consistencia : Varía de gomoso y pegajoso hasta duro y poroso dependiendo de la temperatura y contenido de cera.

4.2.2. Requisitos de calidad físico - químicos:

Humedad: máximo 8 %

Mezclas mecánicas (residuo insoluble en etanol): máximo 30%

Cera: máximo 30 %

Índice de oxidación: máximo 22 segundos

Impurezas : Máximo 5 %

4.2.3 Requisito de calidad físico – químicos recomendados

Compuesto fenólicos : Reacción positiva

Flavonoides : Reacción positiva

Solubilidad en etanol: 30-35 %

4.2.4 Control de Calidad Microbiológico

Recuento de bacterias mesofilas (UFC/g) < 10,000

Coliformes fecales (UFC/g) 0

Coliformes totales (UFC/g) < 100

Staphylococos aureus (UFC/g) 100

Hongos (UFC/g) 1-100

5. ADITIVOS

No se permite la utilización de cualquier tipo de aditivos.

6. CONTAMINANTES

No se permite la presencia de sustancias agroquímicas.
El contenido del plomo (Pb) no excederá de 5 (ppm)

7. HIGIENE

7.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Las condiciones de higiene deben estar de acuerdo a las Buenas Practicas de Manufacturas (BPM) para la cosecha y el almacenamiento de propóleo crudo.

8. CONTROL DE CALIDAD

8.1 ANALISIS ORGANOLEPTICOS

Se utilizara la terminología siguiente :

Aspecto : Masa redonda con brillo
Masa irregular con poco brillo
Trozos irregulares opacos
Trozos irregulares con brillo
Polvo o granulado

Consistencia : Muy blanda
Blanda
Poco blanda
Dura

Olor: Inodoro
Resinoso
Resinoso suave
Resinoso aromático
Resinoso muy aromático

Sabores : Picante
Dulce
Amargo
Insípido

Colores: Se considera el color predominante de la mezcla según numeral 4.2.1

ANEXO N° 6
HOJA DE COTEJO DE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAL



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ANÁLISIS SENSORIAL DEL PROPÓLEOS

San Salvador, 20 de septiembre de 2019

Nombre de la muestra: [Propóleos de La Laguna \(Finca los Claros\)](#).

Código: [M1](#)

Característica	Rango Cualitativo	Marcas con "X"
Aspecto	Masa redonda con brillo	
	Masa irregular con poco brillo	
	Trozos irregulares opacos	
	Trozos irregulares con brillo	
	Polvo o granulado	X
Consistencia	Muy blanda	
	Blanda	
	Poco blanda	
	Dura	X
Olor	Inodoro	
	Resinoso	
	Resinoso suave	
	Resinoso aromático	X
	Resinoso muy aromático	
Sabor	Picante	X
	Dulce	
	Amargo	
	Insípido	
Color	Amarillo	
	Café	X
	Verde	
	Gris	
	Variando tonalidad	

Químico Analista: [Germán Román Méndez Ramírez](#).

Nota: De la misma forma se realizó con las cinco muestras restantes.

ANEXO N° 7
ESQUEMAS DE LAS DETERMINACIONES FISICOQUÍMICAS Y EL PERFIL
CROMATOGRÁFICO POR TLC



Figura N° 14. Determinación del porcentaje de humedad por el método gravimétrico



Figura N° 15. Determinación del porcentaje de cenizas por el método gravimétrico

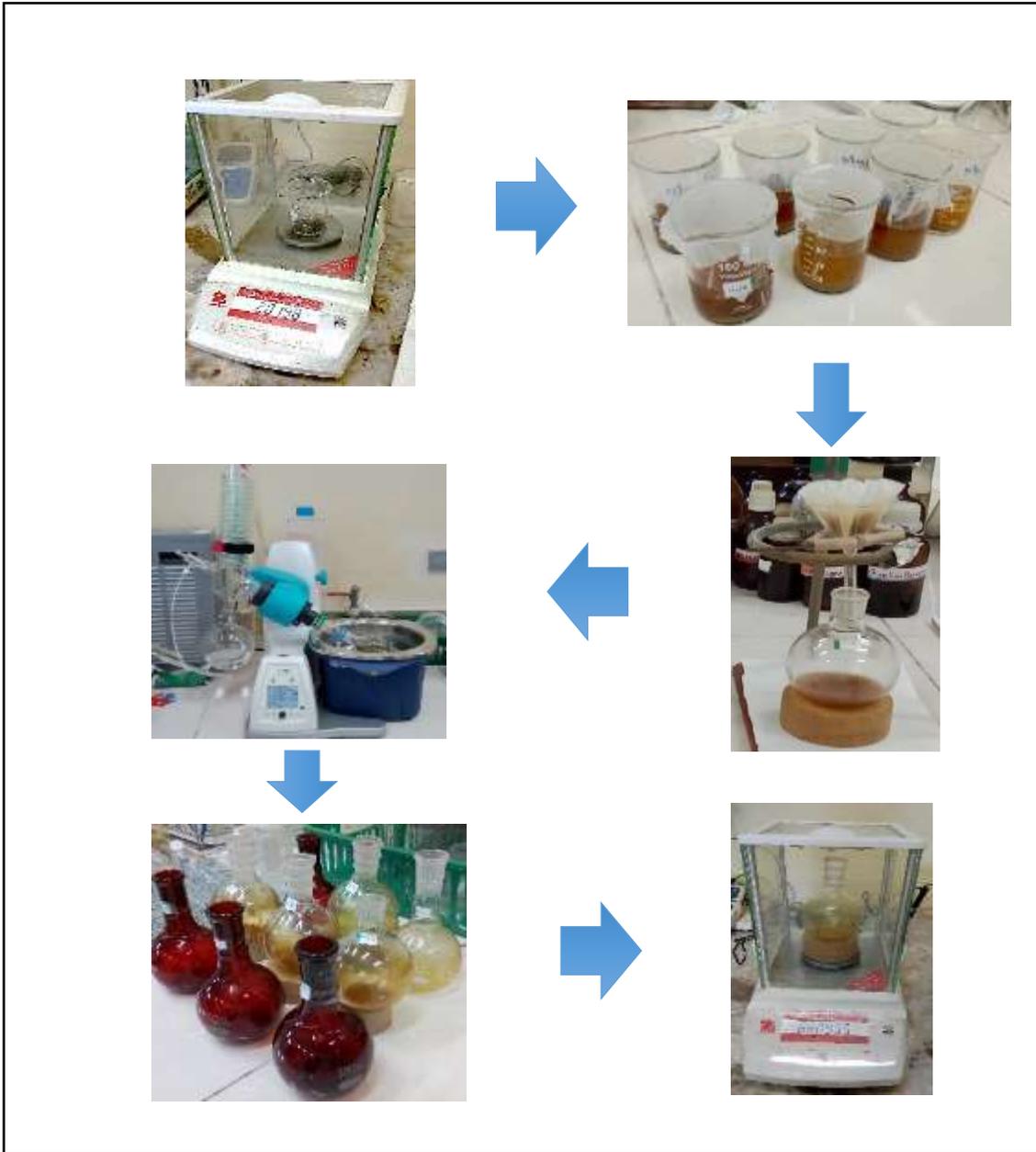


Figura N° 16. Determinación del porcentaje de resinas por el método gravimétrico

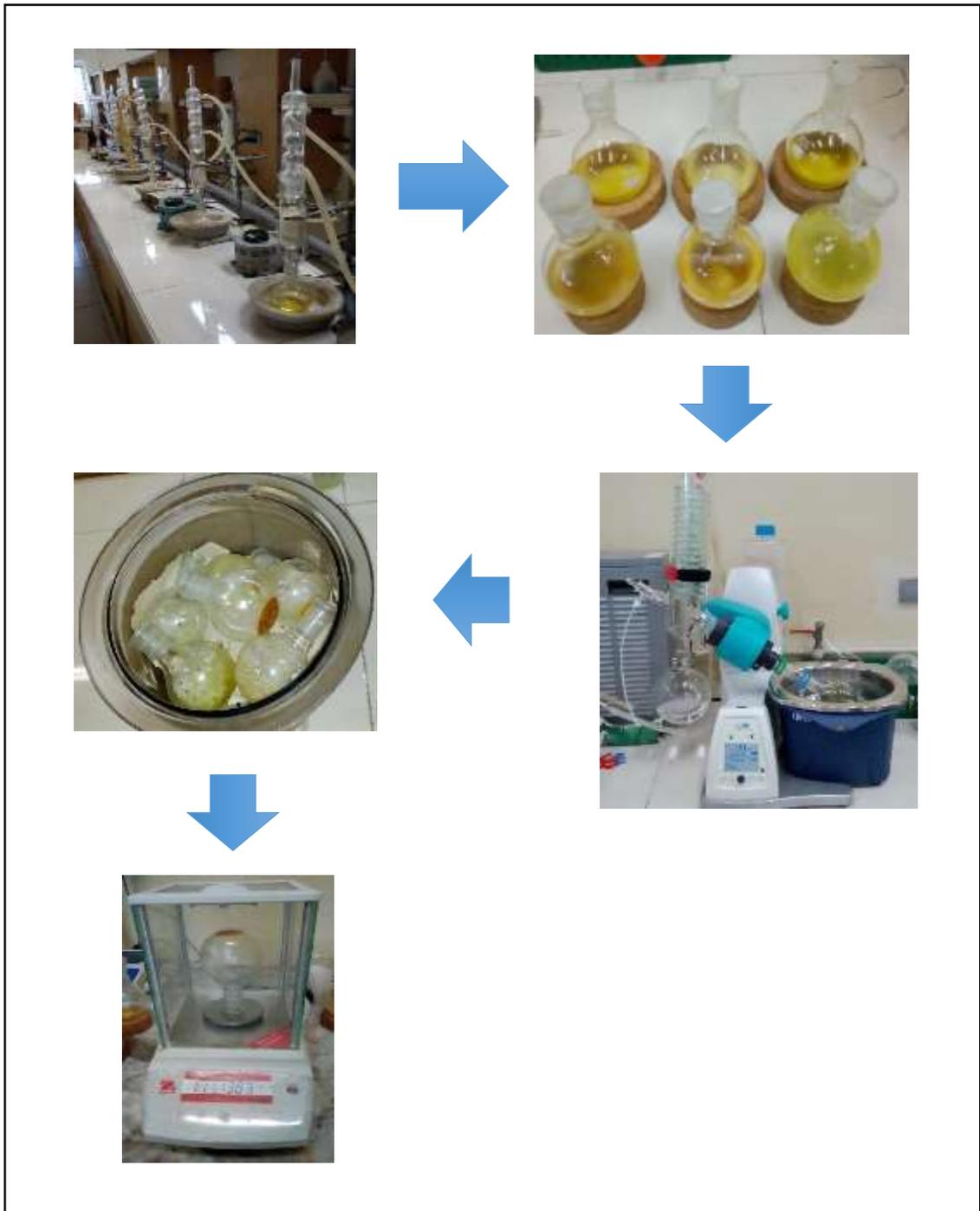


Figura N° 17. Determinación del porcentaje de ceras por el método gravimétrico

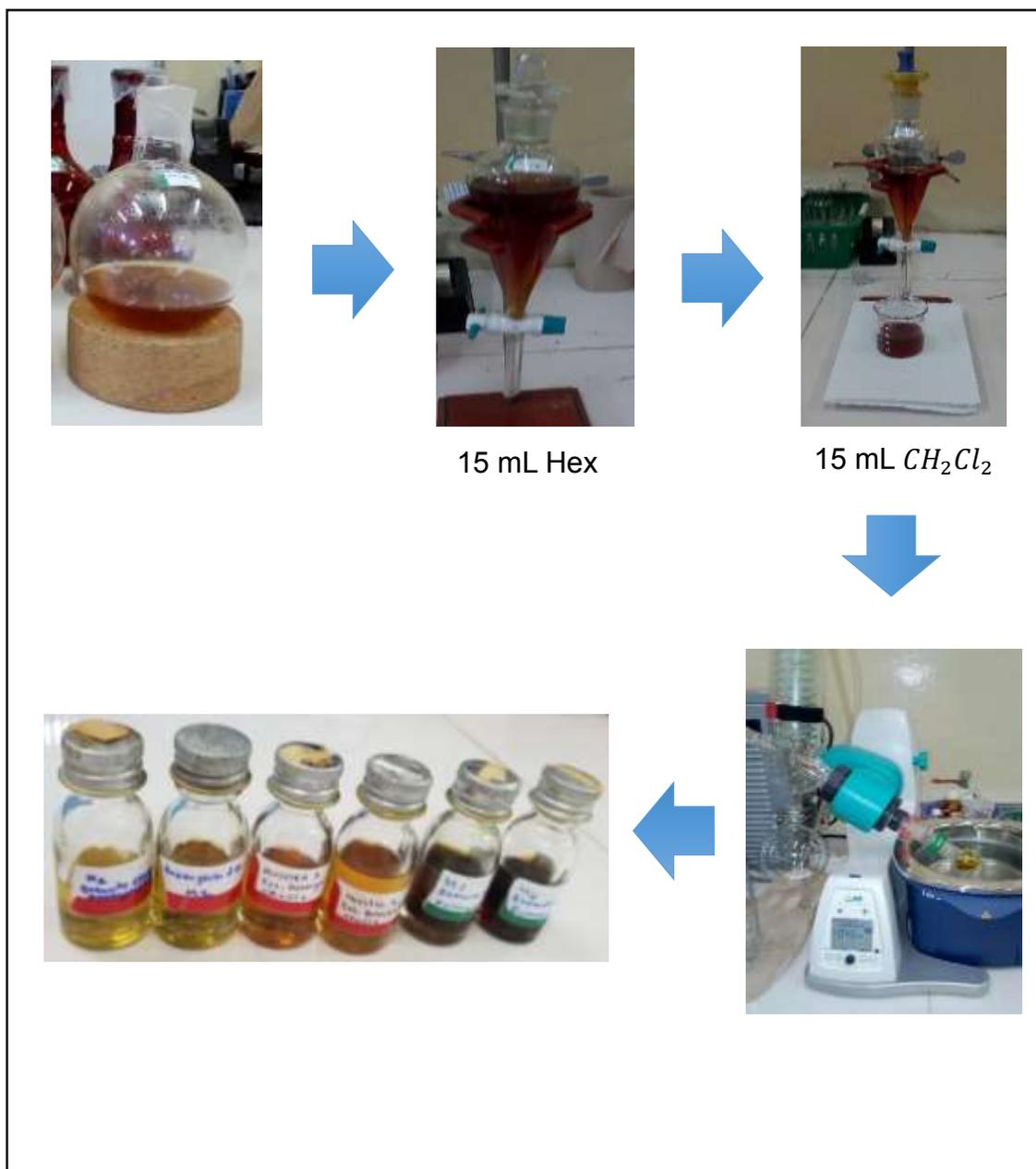


Figura N° 18. Desengrasado del extracto hidroalcohólico y preparación del extracto diclorometánico

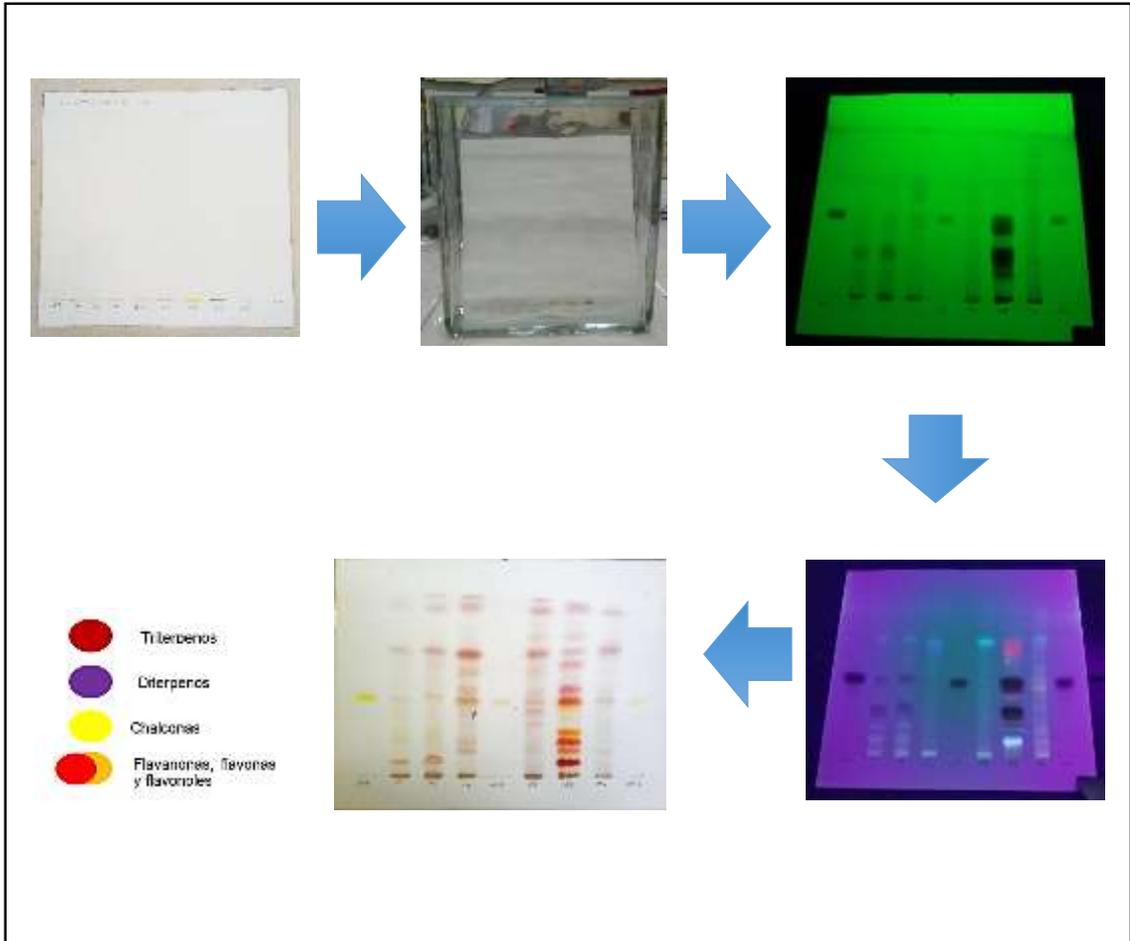


Figura N° 19. Marcha analítica del método cromatográfico en capa fina (TLC)

ANEXO N° 8
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK (100 ppm) Y LAS SOLUCIONES
ESTÁNDAR DE PLOMO Y CADMIO.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCION STOCK PARA PLOMO Y CADMIO.

- a) Preparación de Solución stock (100 ppm) para plomo y cadmio a partir de una solución de 1000 ppm para cada elemento.

Transferir 10.0 mL de la solución estándar de plomo (1000 ppm) con una pipeta volumétrica de 10.0 mL, colocar en un frasco volumétrico de 100.0 mL. Diluir con agua osmotizada, llevar a volumen y homogenizar.

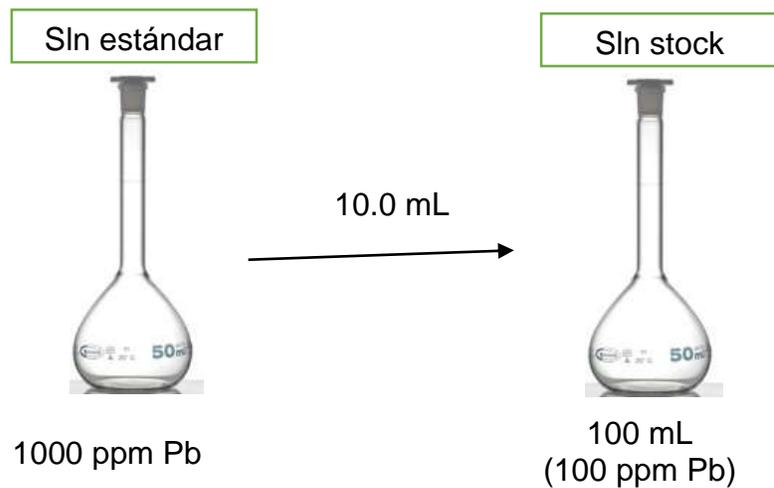


Figura N° 20. Preparación de solución stock de Plomo.

Nota: Repetir el mismo procedimiento para la preparación de la Solución stock (100 ppm) para cadmio a partir de una solución de 1000 ppm de dicho elemento.

b) Preparación de Soluciones estándares para plomo y cadmio para las curvas de calibración.

1). Estándar de Plomo (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm) a partir de una solución stock de 100 ppm de Pb.

Medir 1 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL y 20 mL de la Solución stock de plomo (100 ppm) con una pipeta volumétrica de 1.0 mL para la primera alícuota y una pipeta de 5.0 mL para las demás alícuotas (realizando varias tomas de muestra, según la alícuota), colocar cada alícuota en un balón de 100.0 mL. Diluir con agua osmotizada, llevar a volumen y homogenizar.

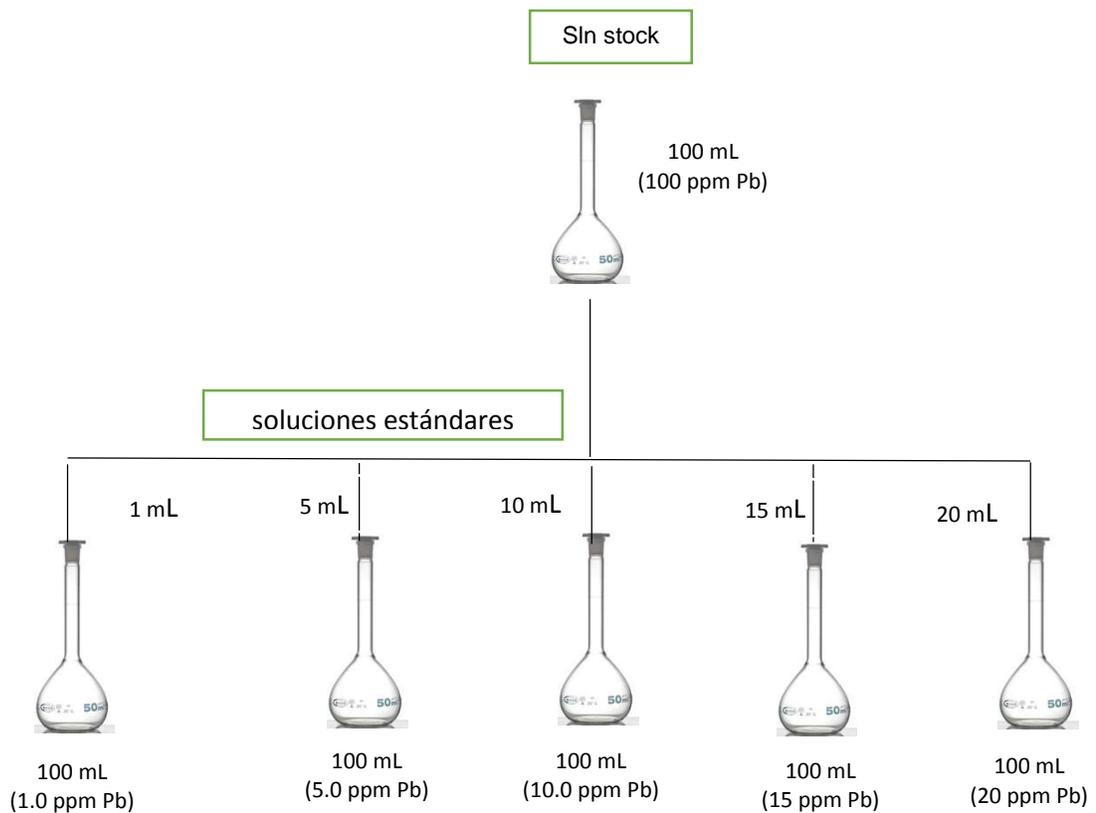


Figura N° 21. Esquema de preparación de las soluciones estándares para plomo.

2). Estándar de Cadmio (0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm) a partir de una solución stock de 100 ppm de Cd.

Medir 0.5 mL, 1.0 mL, 2.0 mL y 4.0 mL de la Solución stock de cadmio (100 ppm) con una pipeta de mohr 1.0 mL para la tomar la alícuota de 0.5 mL y una pipeta de mohr 5.0 mL para las otras alícuotas, realizando las tomas necesarias de muestra, colocar cada alícuota en un balón de 100.0 mL, diluir con agua osmotizada, llevar a volumen y mezclar.

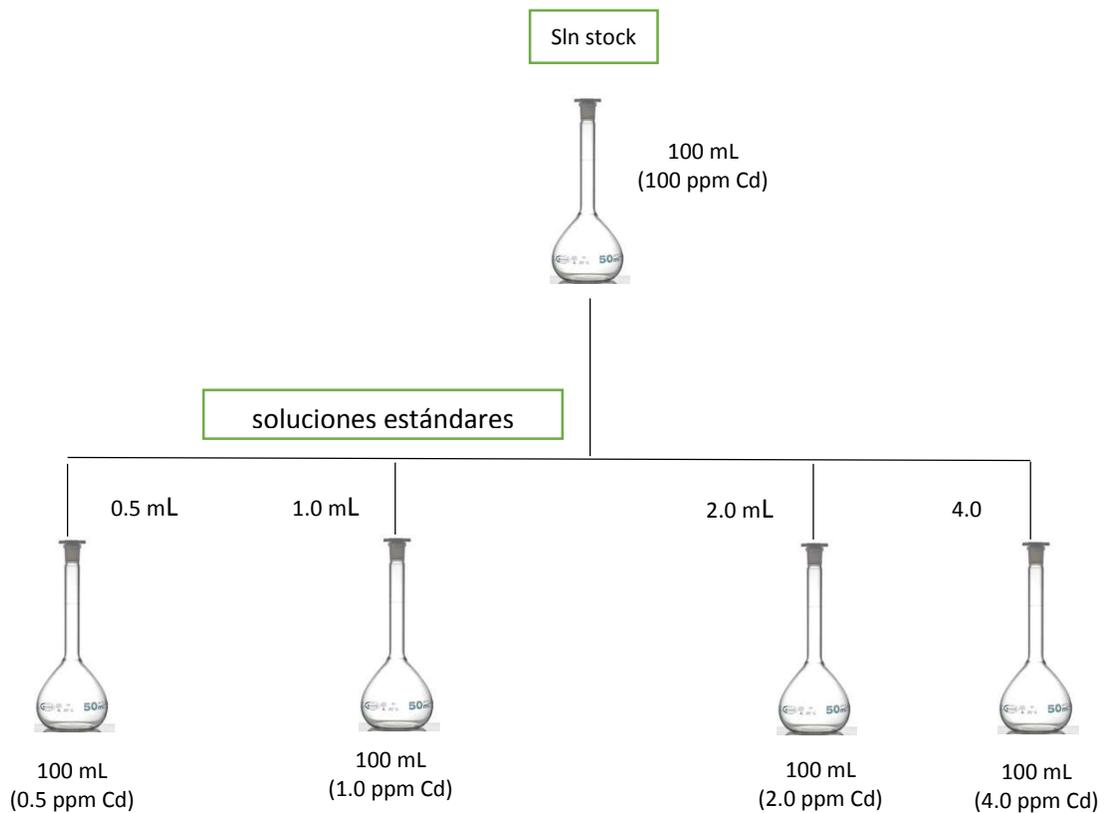


Figura N° 22. Esquema de preparación de las soluciones estándares para cadmio.

Cálculos:

1). Planteamiento de cálculos para la preparación de la Solución stock (100 ppm) a partir de una concentración de Solución 1000 ppm de plomo y cadmio.

- Cálculos de la preparación de la solución stock 100 ppm de plomo:

Formula:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

C_1 = Concentración inicial.

C_2 = Concentración final.

V_2 = Volumen final.

V_1 = Alícuota a tomar de la solución.

Ejemplo: Cálculos de la preparación de la solución de stock de plomo (100 ppm).

$$V_1 = \frac{(100 \text{ ppm Pb})(100.0 \text{ mL})}{1000 \text{ ppm Pb}} = 10.0 \text{ mL}$$

NOTA: El mismo planteamiento se aplicará en el cálculo para la preparación de la solución stock de cadmio.

2). Planteamiento de cálculos para la preparación de las soluciones estándar para la curva de calibración a partir de la solución stock (100 ppm) de plomo y cadmio.

- Ejemplo: Cálculo para la solución estándar 1.0 ppm de plomo (Pb)

$$V_1 = \frac{(1.0 \text{ ppm Pb})(100.0 \text{ mL})}{100 \text{ ppm Pb}} = 1.0 \text{ mL}$$

- Ejemplo: Cálculo para la solución estándar 5.0 ppm de plomo (Pb)

$$V_1 = \frac{(5.0 \text{ ppm Pb})(100.0 \text{ mL})}{100 \text{ ppm Pb}} = 5.0 \text{ mL}$$

- Ejemplo: Cálculo para la solución estándar 10.0 ppm de plomo (Pb)

$$V_1 = \frac{(10.0 \text{ ppm Pb})(100.0 \text{ mL})}{100 \text{ ppm Pb}} = 10.0 \text{ mL}$$

- Ejemplo: Cálculo para la solución estándar 15.0 ppm de plomo (Pb)

$$V_1 = \frac{(15.0 \text{ ppm Pb})(100.0 \text{ mL})}{100 \text{ ppm Pb}} = 15.0 \text{ mL}$$

- Ejemplo: Cálculo para la solución estándar 25.0 ppm de plomo (Pb)

$$V_1 = \frac{(25.0 \text{ ppm Pb})(100.0 \text{ mL})}{100 \text{ ppm Pb}} = 25.0 \text{ mL}$$

NOTA: El mismo planteamiento se aplicará en el cálculo para la preparación de las soluciones estándares de cadmio con sus respectivas concentraciones.

ANEXO N° 9
PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL Y LOS MARCADORES DE
REFERENCIA PARA LA CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA (TLC).

Preparación de la fase móvil y los marcadores de referencias (ver figura N° 23) para la cromatografía en capa fina (TLC).

a) Preparación de la fase móvil.

- Mezclar 30.0 mL de *n*-Hexano con 30.0 mL de Éter etílico y colocarlo en un beaker de 100 mL
- Agitar para homogenizar.
- Tapar bien para su respectivo uso.

b) Preparación de los marcadores de referencia (0.50 mg/mL).

- Pesar en balanza analítica 0.0125 g de quercetina
- Colocar el estándar de quercetina en un beaker de 50 mL y disolver en 10 mL de etanol 95°.
- Agregar la solución a un balón volumétrico de 25 mL.
- Hacer tres lavados al beaker de 50 mL y agregar al balón volumétrico.
- Aforar con etanol 95°.
- Etiquetar y almacenar en un lugar fresco y fuera del alcance de la luz directa.

Nota: Hacer el mismo procedimiento para los estándares de kukulcanin-A, ácido isocuprésico, β -amirina.

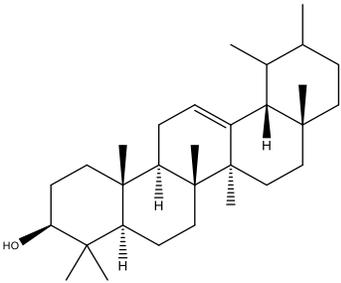
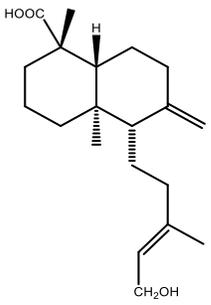
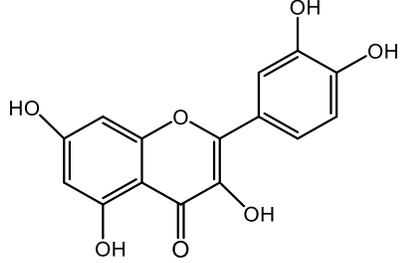
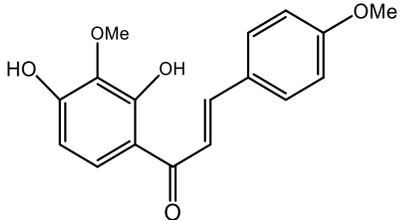
a) β -amirina	b) Ácido isocuprésico
	
c) Quercetina	d) Kukulkanin-A
	

Figura N° 23. Estructura de marcadores de referencia: a) Triterpeno, b) Diterpeno, c) Flavonol, d) Chalcona.

ANEXO N° 10
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LAS MUESTRAS DE
PROPÓLEOS

		
<p style="text-align: center;">M1 El Rosario, Finca Los Claros</p>	<p style="text-align: center;">M2 El Rosario, Quinta Neftaly</p>	<p style="text-align: center;">M3 Huizúcar, Apiario Leonardo</p>
		
<p style="text-align: center;">M4 Juayúa, Apiario Mario Calzadilla</p>	<p style="text-align: center;">M5 Chilanga, Apiario Carlos Vargas</p>	<p style="text-align: center;">M6 Jocoaitique, Apiario Mauricio Castro</p>

Figura N° 24. Aspecto de los propóleos obtenidos de cinco regiones de El Salvador

ANEXO N° 11
CUADRO DE DATOS PARA EL CÁLCULO EN LA DETERMINACIÓN DE LAS
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Tabla N° 20. Datos para el cálculo en la determinación del porcentaje de humedad y su desviación estándar

Código	P. caja vacía (g)	Peso Mx (g)	P. caja + Mx seca (g)	Humedad (%p/p)	\bar{X} (% p/p)	Desviación estándar (S)
M1	10.0903	2.0040	12.0160	3.91	3.80	0,16
	9.5294	2.0038	11.4594	3.68		
M2	9.7248	2.0375	11.6629	4.88	4.90	0,03
	10.0196	2.0267	11.9466	4.92		
M3	9.9964	2.0362	11.9360	4.74	4.77	0,04
	9.5900	2.0435	11.5356	4.79		
M4	10.0374	2.0179	11.9702	4.22	4.32	0,14
	9.1515	2.0211	11.0833	4.42		
M5	11.0733	2.0283	12.9511	7.42	7.53	0,16
	9.6935	2.0372	11.5751	7.64		
M6	11.0711	2.0068	12.9752	5.12	5.01	0,16
	11.1113	2.0189	13.0315	4.89		

1) Ecuación de porcentaje de Humedad:

$$\% \text{ Humead} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

P_0 = Peso de caja de aluminio vacío(g).

P_1 = P de caja de aluminio con mx húmeda – peso de caja de aluminio (g)

P_2 = P de caja de aluminio con mx seca – peso de caja de aluminio (g).

2) Ecuación de desviación estándar:

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

Donde:

S = Desviación típica estándar.

X_i = Muestra individual.

\bar{X} = Promedio de muestras.

n = Numero de muestras.

Σ = Sumatoria desde muestra 1 a "n" número de muestras.

Tabla N° 21. Datos para el cálculo en la determinación del porcentaje de cenizas y su desviación estándar

Código	P. crisol vacío (g)	Peso Mx (g)	P. crisol + cenizas (g)	Cenizas (% p/p)	\bar{X} (% p/p)	Desviación estándar (S)
M1	28,3643	1,0623	28,3870	2,14	2,07	0,10
	19,1106	1,0747	19,1321	2,00		
M2	27,3979	1,0515	27,4268	2,75	2,80	0,07
	24,5565	1,0995	24,5878	2,85		
M3	22,2682	1,0330	22,2926	2,36	2,36	0,01
	27,3983	1,0756	27,4236	2,35		
M4	28,3653	1,0093	28,3878	2,23	2,24	0,01
	24,5572	1,0293	24,5803	2,24		
M5	24,2705	1,0193	24,2911	2,02	1,93	0,13
	22,8352	1,0345	22,8542	1,84		
M6	23,3623	1,0327	23,3829	1,99	2,11	0,16
	22,0678	1,0122	22,0903	2,22		

1) Ecuación de porcentaje de cenizas:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 100$$

P_0 = Peso de crisol sin muestra (g).

P_1 = Peso de crisol + muestra húmeda (g).

P_2 = Peso de cenizas + peso del crisol (g).

2) Ecuación de desviación estándar:

$$S = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

Donde:

S = Desviación típica estándar.

X_i = Muestra individual.

\bar{X} = Promedio de muestras.

n = Numero de muestras.

Σ = Sumatoria desde muestra 1 a "n" número de muestras.

Tabla N° 22. Datos para el cálculo en la determinación del porcentaje de resinas y su desviación estándar

Código	P. balón vacío (g)	Peso Mx (g)	P. balón + resinas (g)	resinas (% p/p)	\bar{X} (% p/p)	Desviación estándar (S)
M1	101.7052	2.0198	101.9968	14.44	14.27	0.24
	87.8107	2.0052	88.0935	14.10		
M2	110.2229	2.0044	110.5953	18.58	18.06	0.74
	112.3966	2.0679	112.7592	17.53		
M3	96.0107	2.0879	96.6312	29.72	30.30	0.82
	84.1464	2.0529	84.7803	30.88		
M4	110.2309	2.0924	110.6584	20.43	21.11	0.96
	112.3992	2.0643	112.8491	21.79		
M5	111.9709	2.0111	113.0141	51.87	50.45	2.01
	112.3956	2.0525	113.4019	49.03		
M6	96.0170	2.0203	96.6013	28.92	27.68	1.75
	84.1529	2.0350	84.6911	26.45		

1) Ecuación del porcentaje de resinas:

$$\% \text{ Resinas} = \frac{R_1 - P_0}{P_{Mx}} \times 100$$

R_1 = peso de balón redondo con resinas (g)

P_0 = peso del balón redondo vacío (g)

P_{Mx} = peso muestra (g)

2) Ecuación de desviación estándar:

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

Donde:

S = Desviación típica estándar.

X_i = Muestra individual.

\bar{X} = Promedio de muestras.

n = Numero de muestras.

Σ = Sumatoria desde muestra 1 a "n" número de muestras.

Tabla N° 23. Datos para el cálculo en la determinación del porcentaje de ceras.

Código	Peso del balón vacío (g)	Peso muestra (g)	Peso de balón + ceras (g)	Ceras (% P/P)
M1	140.218	1.5060	141.1779	63.74
M2	87.368	1.5100	88.2888	60.98
M3	150.773	1.6340	151.6252	52.15
M4	110.087	1.5340	111.1399	68.64
M5	94.1250	1.5210	94.6962	37.55
M6	87.9790	1.5480	88.7465	49.58

1) Ecuación del porcentaje de ceras:

$$\% \text{ ceras} = \frac{C_1 - P_0}{P_{Mx}} \times 100$$

C_1 = Peso de balón redondo con ceras (g)

P_0 = Peso del balón redondo vacío (g)

P_{Mx} = Peso muestra (g)

ANEXO N° 12

**CUADRO DE DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE
PLOMO Y CADMIO DE LAS SEIS MUESTRAS DE PROPÓLEOS**

Tabla N° 24. Datos para el cálculo de concentración de plomo (Pb) de las seis muestras de propóleos.

Muestra				Absorción atómica en Horno de grafito			
Código	Localidad	Peso de muestra (g)	Factor de dilución	Lectura directa Pb	Resultados Pb (ppm)	Promedio Pb (ppm)	Desviación estándar
M1	Finca los Claros	1.0623	25	0.025	0.600	0.560	0.06
		1.0747		0.022	0.519		
M2	Quinta Neftaly	1.0515	25	0.016	0.373	0.332	0.06
		1.0995		0.013	0.290		
M3	Apiario Leonardo	1.0330	25	0.013	0.321	0.297	0.03
		1.0756		0.012	0.273		
M4	Apiario Mario Calzadilla	1.0093	25	0.012	0.288	0.276	0.02
		1.0293		0.011	0.264		
M5	Apiario Carlos Vargas	1.0193	25	0.006	0.153	0.149	0.01
		1.0345		0.006	0.145		
M6	Apiario Mauricio Castro	1.0327	25	0.022	0.532	0.617	0.12
		1.0122		0.028	0.702		

Tabla N° 25. Datos para el cálculo de concentración de Cadmio (Cd) de las seis muestras de propóleos.

Muestra				Absorción atómica en Horno de grafito			
Código	Localidad	Peso de muestra (g)	Factor de dilución	Lectura directa Cd	Resultados Cd (ppm)	Promedio Cd (ppm)	Desviación estándar
M1	Finca los Claros	1.0623	25	ND	ND	-----	-----
		1.0747		ND	ND		
M2	Quinta Neftaly	1.0515	25	ND	ND	-----	-----
		1.0995		ND	ND		
M3	Apiario Leonardo	1.0330	25	ND	ND	-----	-----
		1.0756		ND	ND		
M4	Apiario Mario Calzadilla	1.0093	25	ND	ND	-----	-----
		1.0293		ND	ND		
M5	Apiario Carlos Vargas	1..0193	25	ND	ND	-----	-----
		1.0345		ND	ND		
M6	Apiario Mauricio Castro	1.0327	25	0.001	0.013	0.013	0.00
		1.0122		0.001	0.013		

*ND: No detectable (< 0.001)

Cálculos: Los resultados fueron calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2013.

Muestra M1 (lectura 1)

- Ejemplo: Calculo de la concentración total de plomo para la muestra de propóleos.

$$\text{Concentración total Pb (ppm)} = \text{Lectura directa Pb} \times \left(\frac{\text{Factor de dilución}}{\text{peso muestra}} \right)$$

$$\text{Concentración total Pb (ppm)} = 0.025 \text{ ppm} \times \left(\frac{25}{1.0623\text{g}} \right)$$

$$\text{Concentración total Pb (ppm)} = 0.600 \text{ ppm de Pb}$$

- Ejemplo: Calculo del promedio de las concentración de plomo (Pb)

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{N}$$

$$\bar{X} = \frac{(0.600 + 0.519) \text{ ppm}}{2} = 0.560 \text{ ppm}$$

- Ejemplo: Calculo de la desviación estándar para la concentración de plomo

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$S = \frac{\sqrt{(0.600 - 0.560)^2 + (0.519 - 0.560)^2}}{1}$$

$$S = 0.06$$

Nota: Hacer el mismo cálculo para las muestras restantes de propóleos y para los cálculos de concentración de cadmio.