

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



**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS EN MIELES Y
PROPÓLEOS DE DISTINTOS GÉNEROS DE ABEJAS POR MEDIO DE
TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS”.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
DIEGO FRANCISCO CHICAS BAÑOS**

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

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JULIO DE 2014

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



**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS EN MIELES Y
PROPÓLEOS DE DISTINTOS GÉNEROS DE ABEJAS POR MEDIO DE
TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS”.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
DIEGO FRANCISCO CHICAS BAÑOS**

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

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JULIO DE 2014

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

**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS EN MIELES Y
PROPÓLEOS DE DISTINTOS GÉNEROS DE ABEJAS POR MEDIO DE
TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS”.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
DIEGO FRANCISCO CHICAS BAÑOS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ASESORES:
DR. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS
DR. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, JULIO DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FISCAL GENERAL

LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

MSC. MARTÍN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

SECRETARIO

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

LIC. NELSON MAURICIO COTO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Francisco y Miriam, por estar conmigo en cada momento de mi vida, por guiarme incondicionalmente con su amor, sabiduría, prudencia y paciencia.

A Pablo y Sofía, por ser mi eterna inspiración para seguir adelante y tratar de darles un buen ejemplo.

A mi abuela, Mamachabe, por su amor, dedicación y todos los consejos y oraciones.

A mi asesor, Octavio, por recibirnos y apostar por Jorge y yo, por su paciencia y su apoyo absoluto, y permitirnos tener una experiencia formativa en la Química y en la Vida.

A mi asesor, el Dr. Néstor Orellana, por su amistad, apoyo y ayuda incondicional.

A Jorge, por tu amistad, confianza, y por abrir las puertas de esta oportunidad sin igual.

Al Lic. Nilton Menjívar y al Ing. Roberto Perdomo, por sus valiosos aportes en el trabajo.

A Ulrich, tu amistad y tus consejos hicieron más corto el camino. Muchas gracias por tu dedicación y hospitalidad, y compartir juntos Química y muchas cosas más.

A Hiram, Abraham y Cristóbal, por su amistad y todas las experiencias compartidas que me hicieron sentir en Las Flores como en casa.

A Selma, Sara, Alí y Toña, por su amistad y apoyo, me permitieron encontrar el lado divertido del laboratorio, haciendo amena pero laboriosa cada jornada de trabajo.

A Robert, Andy, Jorge, Vicente, Luis, Vilma, Martita, José, René, Katia, Abi, Kate y Geo, compañeros y amigos, por esos momentos en que olvidamos la Química por un rato para reír a carcajadas.

A Nathaly, por tu paciencia, amor y compañía hasta el final. Superamos juntos este reto.

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

II. ÍNDICE DE TABLAS **iv**

III. ÍNDICE DE FIGURAS **vi**

1. RESUMEN **1**

2. INTRODUCCIÓN **3**

3. MARCO TEÓRICO **5**

3.1 LA APICULTURA: MIEL DE ABEJA DE CASTILLA **5**

3.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL 6

3.1.2 NORMATIVA REGIONAL Y NACIONAL 7

3.1.3 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA MIEL 8

3.1.4 APLICACIÓN DE MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN MIELES DE ABEJAS MELÍFERAS 9

3.2 PROPÓLEOS **11**

3.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PROPÓLEOS 12

3.2.2 APLICACIONES MÉDICAS DE LOS PROPÓLEOS 13

3.2.3 NORMATIVA REGIONAL Y NACIONAL 14

3.3 LA MELIPONICULTURA: MIEL DE ABEJAS NATIVAS **14**

3.3.1 LA MELIPONICULTURA EN LA SOCIEDADES PRECOLOMBINAS 15

3.3.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE LA MIEL DE ABEJAS SIN AGUIJÓN 16

3.3.3 NORMATIVIDAD DE LA MIEL DE ABEJAS SIN AGUIJÓN 16

3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE **17**

3.4.1 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 18

3.4.2 YODIMETRÍA Y VOLTAMPEROMETRÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 20

3.5 FUNDAMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL **20**

3.5.1 CONDUCTIVIDAD 20

3.5.2	POTENCIOMETRÍA	21
3.5.3	TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS	25

4. PARTE EXPERIMENTAL **33**

4.1 PRIMERA PARTE: ESTUDIO DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE MIELES. **33**

4.1.1	DESCRIPCIÓN DE LAS MIELES	33
4.1.2	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS.	34
4.1.3	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD	34
4.1.4	pH Y ACIDEZ LIBRE	34
4.1.5	AZÚCARES REDUCTORES	35
4.1.6	FRUCTOSA	35
4.1.7	HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	36
4.1.8	COMPARACIÓN DE TIPOS DE MIEL	36

4.2 SEGUNDA PARTE: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS **37**

4.2.1	DESCRIPCIÓN DE PROPÓLEOS	37
4.2.2	ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LAS REACCIONES DEL YODO CON REDUCTORES	38
4.2.3	EXTRACCIÓN DE PROPÓLEOS EN MEZCLA HIDRO-ETANÓLICA.	38
4.2.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS	39
4.2.5	DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO, COBRE, PLOMO Y ZINC EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS	39

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **40**

5.1 PARTE I: ESTUDIO DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LAS MIELES. **40**

5.1.1	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS.	40
-------	--	----

5.1.2	PORCENTAJE DE HUMEDAD	43
5.1.3	pH Y ACIDEZ LIBRE	45
5.1.4	AZÚCARES REDUCTORES	52
5.1.5	FRUCTOSA	56
5.1.6	HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)	60
5.2	SEGUNDA PARTE: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS	64
5.2.1	ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL TRIYODURO CON REDUCTORES	64
5.2.2	EXTRACCIÓN DE PROPÓLEOS EN MEZCLA HIDRO-ETÁNOLICA	75
5.2.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS	76
5.2.3	DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO, COBRE, PLOMO Y ZINC EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS	82
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	89
7.	<u>RECOMENDACIONES</u>	91
8.	<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	92

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales países productores de Miel en el 2012.....	5
Tabla 2: Composición Química promedio de la miel.....	7
Tabla 3: Algunos parámetros fisicoquímicos indicadores de calidad, contenidos en la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja.....	9
Tabla 4: Comparación de los Parámetros Fisicoquímicos presentes en el Codex Alimentarius para Apis mellifera con los propuestos por Vit et al, (2004).	17
Tabla 5: Detalle de las muestras de miel colectadas para la presente investigación....	33
Tabla 6: Descripción de las muestras de propóleos.....	37
Tabla 7. Resultados de la determinación de cenizas.	41
Tabla 8: Comparación del Porcentaje de Cenizas en distintas normas	42
Tabla 9: Resultados del Porcentaje de Humedad de mieles	44
Tabla 10: Comparación del Porcentaje de Humedad en distintas normas.....	44
Tabla 11: Resultados de la Medida Directa de pH.....	46
Tabla 12: Resultados de Acidez Libre y el pH en el Punto de Equivalencia	49
Tabla 13: Comparación de Acidez Libre en distintas normas	50
Tabla 14: Resultado del Porcentaje de Azúcares Reductores.....	54
Tabla 15: Porcentaje de Azúcares Reductores en distintas normas.....	55
Tabla 16: Resultados de la determinación polarográfica de fructosa	59
Tabla 17: Resultados de la determinación polarográfica de HMF.....	62
Tabla 18: Comparación del máximo de Hidroximetilfurfural (HMF) en distintos normas.....	62
Tabla 19: Corriente residual a 200mV de distintos experimentos de LiNO₃ en mezcla hidroetanólica 50-50	67
Tabla 20: Límite de detección y cuantificación de triyoduro.....	68
Tabla 21: Actividad antioxidante de los propóleos estudiados.....	81
Tabla 22: Concentración de plomo en la celda y corriente correspondiente a cada adición de solución de patrón de plomo.....	85
Tabla 23: Resumen de algunos parámetros analíticos de las curvas de calibración....	87

Tabla 24: Resultados de la determinación por polarografía diferencial de impulsos de arsénico, cobre, plomo y zinc de los extractos de propóleos.	88
---	-----------

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tendencias de la Exportación de Miel Salvadoreña (1994 - 2013).....	6
Figura 2: Colmena de Melipona beecheii, La Palma, Chalatenango.....	11
Figura 3: Estructuras de compuestos químicos representativos de propóleos.	13
Figura 4: Sistema para una titulación potenciométrica.....	22
Figura 5: Estructura clásica de un electrodo de selectivo de iones hidrógeno.....	23
Figura 6: Curva de Titulación potenciométrica de Fehling.	25
Figura 7: Esquema simplificado de la oxidación de una sustancia en un electrodo actuando como un ánodo.....	26
Figura 8: Esquema de la capa de difusión en un régimen de difusión convectiva	27
Figura 9: Diseño de una celda electroquímica.	28
Figura 10: Curva intensidad-potencial de una especie electroactiva y de un medio no electroactivo (fondo o corriente residual).....	30
Figura 11: Estructura de un electrodo sólido de disco giratorio.....	31
Figura 12: Forma del muestreo de corriente de la polarografía diferencial de impulsos y curva típica de un polarograma por impulsos.	32
Figura 13: Curva de Valoración de solución de NaOH con HCl 0.115M.	47
Figura 14: Curva de valoración 10.0 mL de una solución miel MA4 con NaOH 0.0531M.....	48
Figura 15: Valoración ácido - base de una solución de la muestra de miel MM2 con NaOH 0.0402M.....	51
Figura 16: Curva de Valoración Potenciométrica de solución de miel MM3 con reactivo de Fehling.....	53
Figura 17: Polarograma de adiciones de solución patrón de fructosa a la muestra de miel MA3. ..	56
Figura 18: Aplicación del método de adiciones patrón para determinar la concentración de fructosa en la muestra de miel MA3.	57
Figura 19: Polarograma de adiciones de solución patrón de HMF a la muestra de miel MA5.....	60
Figura 20: Curva de Adiciones Estándar de HMF para la muestra de miel MA5.....	61
Figura 21: Voltamperograma de adiciones de solución patrón de I₃⁻ 0.00731M.....	65

Figura 22: Curva de calibración de triyoduro. Corriente límite medida en 200mV. ..	66
Figura 23: Voltamperograma de la titulación de ácido ascórbico con triyoduro 0.00731M.....	69
Figura 24: Titulación voltamperométrica de ácido ascórbico con triyoduro 0.00731M.	69
Figura 25: Voltamperograma de la titulación de quercetina 0.0118M con triyoduro 0.00731M.....	71
Figura 26: Valoración voltamperométrica de quercetina con triyoduro. Corriente Límite 200mV.....	72
Figura 27: Voltamperograma de la mezcla de glucosa con triyoduro 0.00731M.....	74
Figura 28: Cronoamperograma de una mezcla de 150 µL de solución de triyoduro 0.00731M y 50 µL de glucosa 0.01M. .	75
Figura 29: Esquema de extracción de Propóleos.....	76
Figura 30: Voltamperograma de la titulación de EP3₁ con triyoduro 0.00731M.....	77
Figura 31: Voltamperograma de la titulación de EP3₂ con triyoduro 0.00731M.....	77
Figura 32: Valoración voltamperométrica de EP3₁ con triyoduro. Corriente Límite 200mV.....	78
Figura 33: Valoración voltamperométrica de EP3₂ con triyoduro. Corriente Límite 200mV.....	78
Figura 34: Polarograma de la curva de calibración de solución de patrón de plomo 10 ppm.....	83
Figura 35: Curva de calibración de plomo. Corriente medida alrededor de 325mV...85	85

1. RESUMEN

La apicultura es la actividad agrícola dedicada a la crianza y al manejo de las abejas melíferas (*Apis mellifera*), que tiene como fin principal la obtención de miel de abeja. Sin embargo, en la colmena se encuentran productos secundarios comercialmente importantes como propóleos, polen, ceras y jalea real.

El propóleo es una especie de resina obtenida por las abejas de diversos productos vegetales como exudados de árboles y es procesada y depositada por las abejas en la colmena con el objetivo de sellarla y protegerla. Se han identificado propiedades antibacterianas, antifúngicas, antisépticas, antioxidantes, en este producto natural, por lo que se considera que posee perspectivas prometedoras en el área médica

La miel de abejas nativas de América como la Jicota (*Melipona Becheei*) y Chumelo (*Tetragonisca Angustula*), es objeto de estudio en la región, ya que no se conocen su composición fisicoquímica y sus principios farmacológicos. Ya que esta actividad es meramente artesanal y rudimentaria, se necesita una reingeniería de las técnicas de cosecha para incrementar los niveles de producción. Las situaciones anteriores no han permitido a las mieles de abejas sin aguijón convertirse aún en un producto comercialmente importante, y no se han motivado la generación de normativas de control de calidad.

En la presente investigación, se han aplicado distintas técnicas electroanalíticas en la determinación de parámetros fisicoquímicos de calidad en mieles de diversa procedencia y de distintos géneros de abeja, que son alternativas a la metodología propuesta en la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja. Se determinó de manera directa hidroximetilfurfural (HMF) y fructosa en las muestras por medio de polarografía diferencial de impulsos, una importante alternativa a la propuesta en la norma oficial por diversos motivos, entre ellos: medición directa del HMF, disminución de reactivos utilizados para la determinación, reducción de la manipulación de la muestra, mayor rapidez de análisis, entre otros. Se determinó pH, acidez libre y azúcares reductores por medio de técnicas potenciométricas. La determinación de la acidez libre se realizó directamente de la gráfica de titulación ácido base, a diferencia de la norma oficial que considera un punto final previamente establecido; encontrándose que en ninguna titulación de las mieles estudiadas, el punto final coincidió con el valor de pH considerado por el método oficial. Se determinó la cantidad de cenizas en las muestras por

medio de la medida de conductividad de sus respectivas soluciones; esta metodología alterna a la propuesta en las normas oficiales tiene perspectivas importantes, ya que reduce el tiempo y el costo de análisis de manera significativa.

De la misma forma, se ha planteado una metodología para la determinación de actividad antioxidante, aplicado a extractos hidroetanólicos de propóleos, basada en yodimetría voltamperométrica. Se ha expresado los resultados en milimoles de equivalentes de ácido ascórbico (EAAs), y por lo tanto los resultados de este método pueden ser comparados con los obtenidos por otros métodos, siempre y cuando éstos se expresen en EAAs.

2. INTRODUCCIÓN

La miel es un producto natural elaborado por distintas especies de abejas a partir del néctar de las plantas florales y ha sido utilizada por la humanidad desde tiempos remotos por sus propiedades alimenticias y atributos médicos (McGregor, 1962; Vit et al., 2004)

La *Apis mellifera* conocida en el país como “abeja de castilla” es una especie originaria del continente europeo y fue introducida en América por los colonizadores en los siglos XVI y XVII (de Jaime Lorén, 2003). Esta especie es la productora de la miel más consumida en todo el mundo, con un volumen mundial que en el 2012 ascendió a 1,592,701 Tm; China, Turquía, Argentina y Ucrania son los países con mayor producción (FAO, 2014).

El Salvador es el segundo país exportador de miel de Centroamérica, en el 2012 el 58% de su producción fue exportada a Europa (SIECA, 2014; Mayorga Cerón, 2012) y aunque el volumen de exportación se ha mantenido prácticamente constante en los últimos años, su precio ha experimentado una tendencia a la alza, ya que en el 2007, el precio alcanzó 1.76 USD/kg, pero en el 2013 el precio promedio fue de 2.95 USD/kg. En consecuencia la apicultura nacional genera cerca de 150 empleos permanentes y 670 temporales en tiempo de cosecha, aunque el censo agropecuario, asegura que existen 1,070 personas dedicadas a la actividad apícola (DYGESTIC, 2014).

En contraste a la producción que se obtiene de la *Apis mellifera*, las mieles de abejas sin aguijón de la tribu *Meliponini*, representadas en El Salvador por los géneros *Melipona*, *Trigona* y *Scaptotrigona*, tienen una producción mundial mucho menor, y algunas especies de abejas, incluso se encuentran en regiones del continente en peligro de extinción (Vit. et al., 2006; Cortopassi-Laurino, 2006; Roubik, 2000). Tanto a nivel nacional como latinoamericano el mercado de estas mieles está limitado al consumo territorial, inducido por sus propiedades medicinales conocidas y transmitidas por meliponicultores de forma empírica. Se sabe que la producción por colmena es menor en comparación con la abeja de castilla, pero tienen un precio de venta mucho mayor, además en el proceso de crianza de las abejas nativas no se requiere de equipos sofisticados para su manejo ya que no representan peligro alguno por la ausencia de aguijón (Baquero y Stamatti, 2006; Cortopassi-Laurino, 2006). Las mieles de este tipo de abejas no están reguladas por normas nacionales ni internacionales.

El estudio de los parámetros fisicoquímicos de este tipo de mieles en la región centroamericana, debe intensificarse en el marco de un programa de incentivación a la meliponicultura, que permitiría ampliar en un primer momento el mercado nacional de estas mieles, y en un segundo momento incursionar en la exportación. La adecuación de los parámetros de calidad se puede hacer con base en estudios integrales y daría insumos a los organismos responsables para que se genere una normativa de mieles de abejas nativas.

Otro producto apícola de interés mundial son los propóleos, que son un tipo de resina que las abejas obtienen de diversas fuentes y lo utilizan para sellar y proteger la colmena de agentes externos como parásitos y depredadores. Se conocen de forma popular sus características farmacológicas que los convierten en un producto natural de interés y un objeto de estudio de diversas aplicaciones médicas alrededor del mundo (Bedascarrasbure, 2011; Popova et al., 2007). En el mercado local los propóleos se encuentran en forma de extractos de distintas mezclas de etanol-agua y se utilizan para el tratamiento de afecciones respiratorias y como analgésico, antiséptico, antipirético, entre otros. Estudios demuestran que éstos actúan como antioxidantes, por lo que tienen perspectivas importantes en la medicina por su empleo en la reducción del estrés oxidativo en las células humanas (Castaldo y Capasso, 2002).

El presente estudio tiene dos componentes fundamentales: el primero, consiste en la aplicación de técnicas aún no empleadas para la determinación de parámetros de calidad de mieles (HMF, azúcares reductores, fructosa, humedad, cenizas, pH y acidez libre), y que están basadas en métodos electroquímicos por ser opciones más baratas, rápidas y la señal analítica se toma directamente del analito, a diferencia de algunas metodologías propuestas por la Norma Salvadoreña de Miel de abeja. El segundo, la propuesta de la técnica de yodimetría voltamperométrica para la determinación de actividad antioxidante, aplicada a extractos de propóleos, considerando que hoy en día, aún no se tienen criterios unificados de medición de antioxidantes. La validación de estos métodos electroquímicos debe ser el siguiente paso a tomar, teniendo como meta su incorporación en la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja, con el objeto de diversificar las opciones de análisis químico y garantizar la inocuidad de estos productos para elevar la competitividad en los mercados internacionales.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LA APICULTURA: MIEL DE ABEJA DE CASTILLA (*Apis mellifera*)

La apicultura se refiere a la actividad agrícola del manejo y crianza de la abeja *Apis mellifera* con el objeto de obtener miel y otros productos como polen, jalea real y propóleos (McGregor, 1962). Esta actividad fue practicada desde tiempos antiguos en el Viejo Mundo e inició en el continente americano cuando los colonizadores españoles trajeron colmenas en el siglo XVII (de Jaime Lorén, 2003) y hoy en día, se ha convertido en una actividad agrícola muy importante en todo el globo. La producción de miel a nivel mundial en el año 2012 fue de 1,592,701 toneladas, y los países con los mayores volúmenes en el mismo año se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales países productores de Miel en el 2012*.

Posición	Región	Producción (1000\$ Int)	Producción (T)
1	China, Continental	1,094,110	436,000
2	Turquía	221,236	88,162
3	Argentina	189,461	75,500
4	Ucrania	e175,996	70,134
5	Estados Unidos de América	167,428	66,720
6	Federación de Rusia	162,856	64,898
7	India	153,075	61,000
8	México	147,057	58,602
9	Irán (República Islámica del)	120,452	48,000
10	Etiopía	115,195	45,905
11	Brasil	84,243	33,571
12	España	74,617	29,735

*Fuente: Datos estadísticos de la página oficial de la FAO (FAO, 2014).

Destacan a nivel latinoamericano Argentina, México y Brasil, que son también los países con mayor extensión territorial de la región. Según la misma fuente (FAO, 2014), Centroamérica tuvo en el 2012 una producción de 7,392 toneladas, de las cuales El Salvador produjo 2,000 es decir el 27.1%, situado sólo por debajo de Guatemala que alcanzó 3,600 toneladas. De acuerdo con información disponible en el Sistema de Estadísticas de Comercio de Centroamérica, la exportación de miel en El Salvador fue de 1,710 toneladas para el año 2012, que representa el 85.5% de la producción nacional. La Figura 1 muestra el comportamiento de la exportación de miel en las últimas dos décadas.

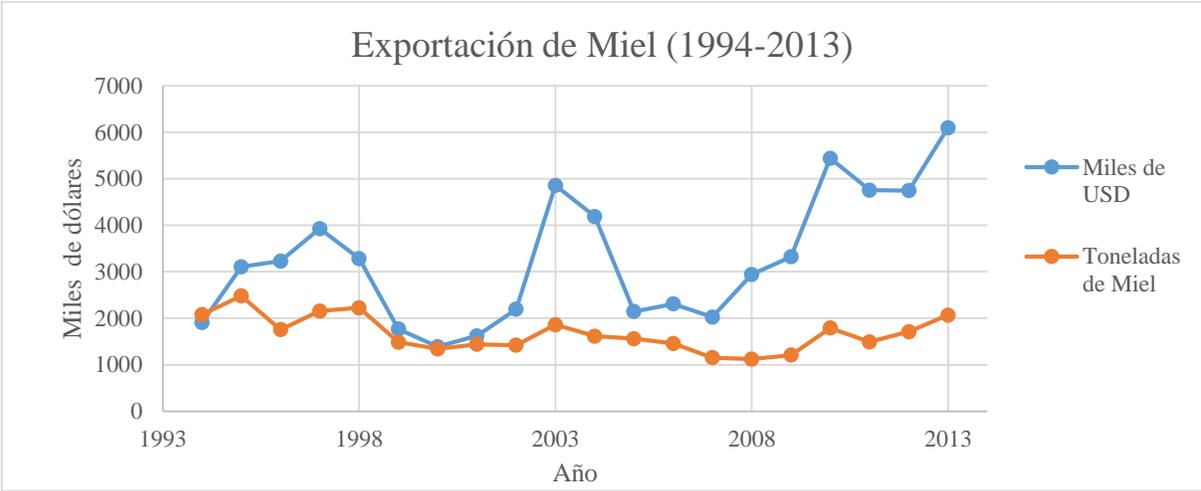


Figura 1: Tendencias de la Exportación de Miel Salvadoreña desde 1994 hasta el 2013.

Fuente: Base de Datos del SIECA, 2014

3.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La Norma Salvadoreña de Miel de Abeja define a la miel como el “producto alimenticio elaborado por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas, que las abejas recogen, transforman y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena”.

La miel es una mezcla muy compleja de sustancias ya que su procedencia es diversa y varía según diferentes factores como, la situación geográfica, la época del año, la vegetación

circundante a la colmena, entre otras (Gorjanović et al., 2013; Acquarone et al., 2007). Sin embargo, de manera general se conoce que la miel está formada por la mezcla de carbohidratos (en mayor proporción fructosa y glucosa), proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, polen, sustancias minerales y puede contener hongos, algas, levaduras y otras partículas sólidas como consecuencia de la cadena de producción (Norma Salvadoreña de Miel). En la Tabla 2 se presenta el promedio y el contenido de miel resultado del análisis de 492 muestras de miel (White y Doner, 1980).

Tabla 2: Composición Química promedio de la miel*

Composición	Promedio	Contenido
Humedad	17.2	13.4 - 22.9 %
Fructosa	38.2	27.2 - 44.3 %
Glucosa	31.3	22.0 - 40.7 %
Sacarosa	1.3	0.2 - 7.6 %
Maltosa	7.3	2.7 - 16.0 %
Azúcares mayores	1.5	0.1 - 8.5 %
Acido libre (Glucónico)	0.43	0.13 - 0.92 %
Lactona (Gluconolactona)	0.14	0.0 - 0.37 %
Acido total (Glucónico)	0.57	0.17 - 1.17 %
Cenizas	0.17	0.02 - 0.03 %
Nitrógeno	0.04	0.00 - 0.13 %
pH	3.91	3.42 - 6.10

*Según el resultado de un estudio de 492 muestras de miel (White y Doner, 1980)

3.1.2 NORMATIVA REGIONAL Y NACIONAL

Ya que la mayor parte de la miel producida en Centroamérica y particularmente en El Salvador tiene como destino mercados internacionales, las instituciones nacionales y regionales del ramo agropecuario han generado una serie de instrumentos normativos que

buscan garantizar la calidad de los productos apícolas, permitiéndole competir en los mercados internacionales y al mismo tiempo, ofrecer productos de calidad a sus habitantes. Las normas están homologadas a nivel centroamericano y las prácticas apícolas están supervisadas a nivel nacional por el Ministerio de Agricultura Ganadería (MAG) y a nivel regional por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA).

La Norma Salvadoreña de Miel de Abeja, define los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que son indicadores de calidad reconocidos mundialmente. Además, existen otros elementos normativos como el Manual de Buenas Prácticas Apícolas, (elaborado en el 2004 por organismos que promueven actividades apícolas en Centroamérica, siendo la Comisión Nacional Apícola de El Salvador, “CONAPIS”, la contraparte salvadoreña), y el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para Plantas Exportadoras de Miel de Abeja (elaborado por el OIRSA en el 2007) que regulan la cadena de producción de la miel desde la extracción correcta de la colmena hasta su exposición en el mercado. Esta documentación es evidencia que las instancias responsables de las actividades agrícolas en la región han realizado esfuerzos importantes que han permitido que la apicultura se desarrolle notablemente en el país.

3.1.3 PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA MIEL

La calidad de la miel sólo puede ser verificada a través de análisis fisicoquímicos y microbiológicos que son indicadores de las condiciones de madurez y frescura óptimas y que el deterioro desde la cosecha hasta su análisis sea mínimo y aceptable para su consumo. Estos indicadores se encuentran en la norma salvadoreña y la metodología analítica que se contempla para su verificación es la que se propone en los métodos oficiales de análisis de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) que son ampliamente reconocidos a nivel mundial. Los parámetros fisicoquímicos más importantes que se encuentran en la Norma Salvadoreña se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Algunos parámetros fisicoquímicos indicadores de calidad, contenidos en la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja.

Parámetro	Valor o Límite Aceptado
Humedad	20% (Máximo)
Azúcares Reductores	60% en miel, 45% en mielato (Mínimo)
Sacarosa Aparente	5 % en miel, 45% en mielato (Máximo)
Acidez Libre	50 mEq.kg ⁻ (Máximo)
HMF	40 mg.kg ⁻ en miel fresca, 80 mg.kg ⁻ en miel de países tropicales (Máximo)
Actividad Diastática	8 en la Escala de Shade, 3 en la Escala de Shade con un valor de HMF menor de 15 mg.kg ⁻ (Mínimo)

Es importante señalar que la Norma Salvadoreña no considera parámetros que se encuentran en la mayoría de normativas internacionales, como lo son el porcentaje de cenizas y el pH de la miel, que si están, por mencionar algunos ejemplos, en las normas mexicana y argentina. La Comisión Internacional de la Miel, IHC, por sus siglas en inglés, publicó los procedimientos armonizados para la medición de parámetros fisicoquímicos, en el cual, se incluye la determinación de la conductividad como un insumo para conocer el origen botánico de la miel, y también la medición de cenizas (IHC, 2009) que no están considerados en la Norma Salvadoreña.

3.1.4 APLICACIÓN DE MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN MIELES DE ABEJAS MELÍFERAS

En el país, se han realizado muchos estudios enfocados al desarrollo económico, productivo y técnico de la apicultura, que son importantes para el progreso de la misma, pero no se ha abordado la necesidad del control de calidad de la miel como un tema fundamental en la cadena productiva (Campos et al., 2010; Platero et al., 2010; Mercedes Gochez, 2008; Cruz, 2008). Las instancias responsables generaron la Norma Salvadoreña Obligatoria de Miel de Abeja, que tuvo su última actualización en el 2008, que está homologada a nivel centroamericano, y según se puede leer en la misma, es una adaptación del Codex

Alimentarius (2001). Entonces, los parámetros de calidad que propone la norma salvadoreña, son regional y mundialmente reconocidos y de cumplirse en la miel producida en el territorio, ésta será lo suficientemente competitiva para participar en los mercados internacionales.

La norma salvadoreña y el Codex Alimentarius proponen seguir los métodos sugeridos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para la determinación de los parámetros fisicoquímicos de calidad de la miel. Los métodos mundialmente armonizados, considerados en el documento publicado por la IHC, para la determinación de parámetros fisicoquímicos de calidad (IHC, 2009), si bien, son reconocidos y empleados a nivel mundial, están reducidos a un grupo particular de técnicas analíticas y por lo tanto su aplicación dependerá de la disposición del instrumental en cada lugar.

Son pocos los trabajos que se han hecho para la diversificación de los métodos de análisis ya que probablemente se considera suficiente con los existentes. En particular, los trabajos bajo la dirección del Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas, profesor de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), han sido enfocados en la aplicación de técnicas electroanalíticas para la determinación de parámetros de calidad en productos apícolas. En ese sentido, se han publicado una serie de estudios que aplican técnicas electroquímicas para el control de calidad de miel en México y Colombia, algunos de estos trabajos son: determinación directa de HMF por polarografía (Reyes Salas et al., 2006; Juárez, 2003), cuantificación de azúcares reductores por potenciometría (Preza de la Vega, 2007), determinación polarográfica de fructosa (Preza de la Vega, 2007; Díaz, 2012; Gazcón, 2012), cuantificación de estreptomycin en mieles y metales pesados en propóleos (Gazcón, 2012), determinación de sulfatiazol en miel (Caballero, 2009). En este marco los esfuerzos han tenido contraparte en nuestro país con el trabajo de Velásquez Reales (2014), quién aplicó algunos de estos métodos electroquímicos para la determinación de HMF, fructosa, azúcares reductores y cenizas en mieles comerciales de El Salvador y propuso una metodología para la determinación electroquímica de azúcares reductores.

3.2 PROPÓLEOS

El término “propóleos”, proviene del griego “propolis”: (pro: delante o en defensa de y polis: ciudad; es decir: “delante o en defensa de la ciudad”). Los propóleos son un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas de consistencia variable, recogidas y procesadas por las abejas melíferas de algunas especies vegetales, y en el caso de algunas especies de las abejas meliponinas, mezclados con tierra o barro (geopropóleos). Este material es utilizado para sellar las hendiduras de las paredes de la colmena, o incluso para sellar orificios; debido a sus propiedades evita la entrada de otros insectos y combate algunos seres microbiológicos (Bedascarrasbure, 2011; Castaldo y Capasso, 2002). Además de todas las propiedades mecánicas que poseen los propóleos en la colmena, la actividad en contra de los microorganismos es una característica esencial y ha sido utilizada por los seres humanos desde tiempos antiguos por sus propiedades farmacéuticas y en las últimas décadas la comunidad científica ha dedicado muchas investigaciones estudiando su composición química, su acción en contra microorganismos, y sus aplicaciones farmacológicas y terapéuticas (Bankova, 2005; Bankova et al., 2000).



Figura 2: Colmena de *Melipona beecheii*, La Palma, Chalatenango.

En la Figura 2 se observa una colmena de *Melipona Beecheii*, conocida comúnmente en El Salvador como “Jicota”; pertenece a una familia dedicada a la apicultura y a la meliponicultura en La Palma, Chalatenango. En la imagen se puede notar que las paredes

internas de la colmena están recubiertas por un material oscuro, y que la cantidad de propóleos es mayor en las esquinas de las paredes.

3.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS PROPÓLEOS

Los propóleos han captado recientemente el interés de la comunidad científica debido a sus propiedades medicinales conocidas y aplicadas desde tiempos antiguos (Castaldo y Capasso, 2002; Popova et al., 2007). Se sabe que personajes como Aristóteles, Dioscórides, Plinio y Galeno reconocieron las propiedades medicinales de los propóleos y que los egipcios los utilizaron para embalsamar cadáveres debido a que conservaba los cuerpos en buen estado, sin putrefacción. Hoy en día, naturalistas y meliponicultores recomiendan el uso de propóleos como antibacterial, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, y como tratamiento para úlceras gastrointestinales, para fortalecer el cuerpo humano en contra de infecciones, entre otras aplicaciones (Castaldo y Capasso, 2002).

La composición química de los propóleos es muy compleja y varía dependiendo de la especie de abeja que lo produce, la flora donde las abejas la colectan, la región climática, la época del año, entre otros (Bankova et al., 2000; Bankova, 2005a; Popova et al., 2007). Sin embargo, se han estudiado propóleos de distintos continentes y se han encontrado algunas coincidencias. Está bien documentada la presencia de flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas y dihidroflavononas), fenoles (en su mayoría, ácidos cinámicos sustituidos y otros ésteres) y terpenoides (Salatino et al., 2005; Bankova et al., 2000; Walker y Crane, 1987).

En la Figura 3 se pueden observar las estructuras químicas de compuestos muy comunes en los propóleos.

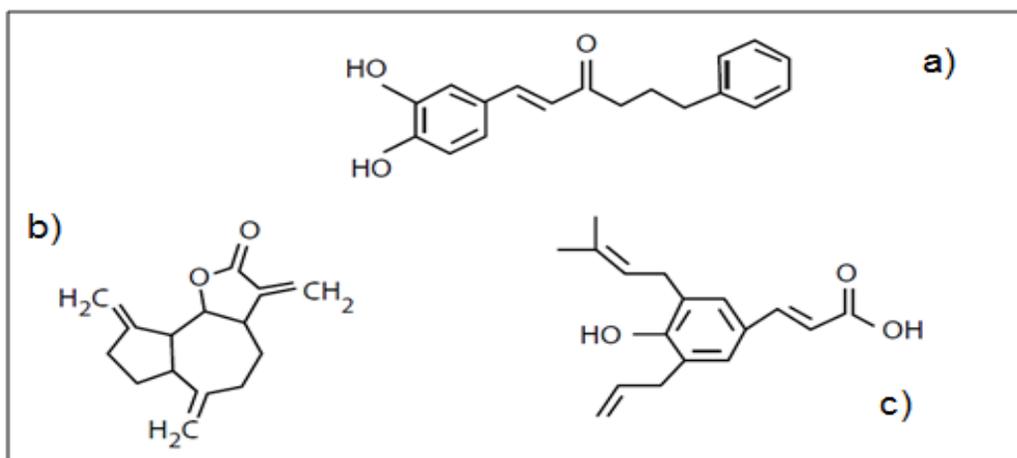


Figura 3: Estructuras de algunos compuestos químicos representativos de propóleos; a) feniletiléster del ácido caféico; b) dihidrocostus-lactona, un sesquiterpeno y c) el ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil]-2(E)-propenoico, (Nakanishi et al., 2003).

3.2.2 APLICACIONES MÉDICAS DE LOS PROPÓLEOS

Como se mencionó, desde tiempos antiguos se han utilizado los propóleos para aplicaciones médicas. Culturas importantes en tiempos antiguos como los egipcios, griegos, romanos, incas, árabes utilizaron los propóleos para distintas afecciones de salud (Cataldo 2002). En las últimas 3 o 4 décadas se han realizado estudios importantes que revelan que los propóleos pueden tener aplicaciones médicas importantísimas. Se han reportado resultados significativos en la reducción de células cancerígenas (Hernández et al., 2007; Ehara et al., 2011), actividad antioxidante (Park e Ikegaki, 1998; Kumazawa et al., 2004; Potkonjak et al., 2012), reducción de la presión sanguínea y el colesterol en la sangre (Castaldo y Capasso, 2002), actividad antimicrobiana (Viuda Martos, 2008; Grange y Davey, 1990; Manrique y Santana, 2008; Fisher et al., 2007; Miorin et al., 2003), propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes (Bolaños et al., 2008; Viuda Martos, 2008), anestésicos por mencionar algunos (Bedascarrasbure, 2011).

3.2.3 NORMATIVA REGIONAL Y NACIONAL

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 Propóleo 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 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.

La aplicación de métodos electroquímicos para determinar algunas propiedades de los propóleos también ha sido experimentada. Se han determinado metales por técnicas de polarografía diferencial de impulsos de redisolución anódica (Gazcón, 2012) y se ha determinado actividad antioxidante por métodos polarográficos, utilizando la reacción de los compuestos antioxidantes con el peróxido de hidrógeno (Potkonjak et al., 2012).

3.3 LA MELIPONICULTURA: MIEL DE ABEJAS NATIVAS

La cría y manejo de abejas sin aguijón se conoce como meliponicultura, la cual se remonta a la época pre colonial y fue practicada por diferentes grupos indígenas en todo el continente americano (Baquero y Stamatti, 2006). Las abejas sin aguijón corresponden a un grupo de géneros de abejas nativas de América que están dentro de la tribu *Meliponini*; se han identificado en Latinoamérica cerca de 350 especies y varias especies producen miel de excelente calidad y es consumida por sus propiedades alimenticias y particularmente para uso medicinal (Cortopassi-Laurino, 2006). Esta situación posiciona a la miel de abejas sin aguijón como un producto mucho más caro que la miel de abeja melífera; por ejemplo en el municipio de La Palma, en el Departamento de Chalatenango, la miel de abeja de *Tetragonisca angustula*, conocida popularmente como “chumelo”, es vendida a un precio

alrededor de los 30.0 USD por botella en comparación a los 6.0 USD por botella de la abeja melífera.

Además de la elaboración de miel, las abejas precolombinas juegan un rol importantísimo en el desarrollo de los ecosistemas tropicales como polinizadores de numerosas especies vegetales en bosques y sembradíos (Cortopassi-Laurino, 2006). Algunas especies están amenazadas, por el impacto que ocasiona la sustitución de bosques por campos de agricultura, así como la destrucción de colmenas para la introducción de abejas melíferas por personas que no conocen el valor comercial, natural y cultural que tiene la práctica de la meliponicultura (Baquero y Stamatti, 2006).

3.3.1 LA MELIPONICULTURA EN LA SOCIEDADES PRECOLOMBINAS.

El consumo de miel de las abejas sin aguijón se remonta a los habitantes originales del continente americano, y su miel era conocida por las distintas tribus indígenas desde los territorios precolombinos de México hasta Argentina (Baquero y Stamatti, 2006).

Los mayas que habitaban la península de Yucatán, domesticaron únicamente a la abeja *Melipona Beecheii* pesar de que existían al menos 16 especies de abejas. Es probable que ellos hayan seleccionado esta especie (a la que la llamaban “xunacab” o “colelcab” que significa dama o señora abeja) para tecnificar su producción de miel, debido a su mejor rendimiento en cuanto a volumen de miel en comparación con las demás especies habitantes. Los mayas preparaban un licor procedente de la fermentación la miel de abejas nativas, al que llamaban “xtabentún”, que significa enredadera en la piedra. La meliponicultura era sin duda una actividad agrícola y económica importante en la península de Yucatán y los códices mayas de Madrid y el Tro Cortesiano exhiben escenas muy claras sobre la forma correcta de cultivar y reproducir las abejas (Quezada Euán, 2011).

Los kayapó, una etnia indígena al sur de la Amazonia en Brasil, clasificaron y nombraron 34 especies de abejas sin aguijón y consideraron que 9 de ellas eran semi-domésticas (Posey y Camagrao, 1985). Los kayapó hicieron parte de sus rituales religiosos productos de la colmena y tomaron partes importantes de la organización social de las abejas y avispas en sus conceptos naturales.

3.3.2 PROPIEDADES MEDICINALES DE LA MIEL DE ABEJAS SIN AGUIJÓN

La cultura popular le asigna algunas propiedades farmacológicas y medicinales a las mieles de abejas sin aguijón, que han sido utilizadas por las culturas aborígenes hasta hoy en día. Por ejemplo, una afirmación conocida en nuestro país por la *Vox Populi* es que la miel de la abeja Chumelo es un tratamiento que puede ser efectivo contra las nubes o cataratas en los ojos. Estas propiedades, junto a la amenaza de extinción algunas especies (Parra y Nates, 2007; Nates y Rosso, 2013), han despertado el interés científico y diversos estudios han reportado actividades antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, antiinflamatorias (Dardón, 2005; Dardón y Enríquez, 2008; Bolaños et al., 2008), y en el tratamiento de afecciones respiratorias, gastrointestinales y oculares (Vit et al., 2004). Las perspectivas de aplicación de las mieles de abejas sin aguijón en tratamientos médicos son amplias, lo que lleva a la necesidad de la promoción a través de diferentes medios entre ellos la creación de la regulación de la calidad de las mieles.

3.3.3 NORMATIVIDAD DE LAS MIELES ABEJAS SIN AGUIJÓN

Debido a que la composición química de la miel depende de muchos factores, entre ellos, la especie de abeja que lo produce, la región geográfica, la vegetación circundante, el clima y la época del año, la normalización de las mieles sin aguijón representa un verdadero reto debido la diversidad de géneros existente en el continente. Sin embargo la IHC ha planteado la necesidad de adecuar los parámetros fisicoquímicos indicadores de calidad planteados en las normas de la miel de la abeja melífera a las mieles de abejas sin aguijón (Vit, 2008). A nivel latinoamericano, se han hecho varios estudios en este sentido, especialmente en la determinación de parámetros como HMF, Azúcares Reductores, Acidez Libre, pH, Conductividad, Humedad, entre otros, (Dardón, 2005; Dardón y Enríquez, 2008; Vit et al., 2004; Vit P. , 2009; Gutiérrez et al., 2008; Alarcón e Ibañez, 2008; Cortopassi-Laurino, 2006). Vit y sus colaboradores (2004) propusieron separar los parámetros de calidad por género de abeja (ver Tabla 4), que es mucho más conveniente que agrupar a todos los géneros en una sola normativa.

Tabla 4: Comparación de los Parámetros Físicoquímicos presentes en el Codex Alimentarius para *Apis mellifera* con los propuestos por (Vit et al., 2004).

Género de Abeja	Parámetro					
	Humedad (máx. ¹)	Azúcares Reductores (min. ²)	Sacarosa (máx.)	Acidez Libre (meq/kg) (máx.)	Cenizas (máx.)	HMF (mg/kg) (máx.)
<i>Apis mellifera</i>	20%	65%	5.0%	40	0.5 %	40
Melipona	30%	50%	5.0%	70	0.5 %	40
Scaptotrigona	30%	50%	5.0%	85	0.5 %	40
Trigona	30%	50%	5.0%	75	0.5 %	40

1) max: valor máximo permitido. 2) min: valor mínimo permitido.

Lo anterior crea un escenario favorable para la elaboración de una normativa regional de las mieles de abejas sin aguijón, en la que será necesario el aporte de estudios representativos de distintas especies y en distintos países.

3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Algunas condiciones patológicas como cáncer, diabetes, arteriosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y el envejecimiento prematuro, están relacionadas con un estado conocido como estrés oxidativo (Londoño, 2011). El estrés oxidativo se genera cuando hay un desequilibrio en las células por el exceso de radicales libres y/o una disminución en los antioxidantes. Con el tiempo ese desajuste entre radicales libres y antioxidantes puede dañar los tejidos. Los radicales libres más activos y estudiados son los correspondientes a las Especies Reactivas del Oxígeno, ERO's, de los cuales, los más relevantes en los sistemas biológicos son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y los radicales formados en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (alcoxilo ($RO\cdot$) y alquilperoxilo ($ROO\cdot$)). Entre las ERO's no radicalarias están el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. (Londoño, 2011; Prior et al., 2005; Michlack, 2006).

Según Benzie y Strain (1996) un antioxidante biológico es definido como “cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato

oxidable, reduce o previene significativamente la oxidación de este sustrato”, es decir son agentes reductores, que se oxidan antes que el sustrato de interés.

Estos hechos publicados por la comunidad científica han motivado, en general, la introducción de antioxidantes en la dieta y, por lo tanto, se ha generado un particular interés en conocer el contenido de los mismos en los alimentos ofrecidos en el mercado.

3.4.1 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se han desarrollado métodos para la determinación de la actividad antioxidante en los alimentos; sin embargo, los métodos existentes presentan resultados inconsistentes, y no existe equivalencias entre unos y otros (Thainpong et al., 2006). Pese que han existido esfuerzos para unificar los criterios de la determinación de la actividad antioxidante como el Primer Congreso Internacional de Actividad Antioxidante, no existen métodos armonizados de análisis.

Entre estos métodos se encuentra el FRAP (Capacidad de reducir al Ion Férrico), que se basa en la capacidad de una especie antioxidante en reducir al ión férrico a ion ferroso. Inicialmente se planteó como la capacidad del plasma sanguíneo en realizar dicha reacción, pero posteriormente fue aplicado para la determinación de actividad antioxidante (Benzie y Strain, 1996). En términos generales, el ion férrico se compleja con tripiridiltriazina, formando el complejo 2,4,6-tripiridiltrianza férrica (TPTZ) el cual, reacciona con la sustancia reductora (la especie antioxidante), transformando al complejo en su forma ferrosa que tiene un color azul intenso y que absorbe radiación con una longitud de onda máxima de 593 nm. La concentración del complejo se cuantifica por medio de técnicas espectrofotométricas y la concentración del antioxidante se expresa en relación a la cantidad de ion férrico reducido (Londoño, 2011)

Otro grupo de métodos muy utilizados son los ORAC (Capacidad de Absorbancia del Radical Oxígeno). Estos métodos están basados en el efecto de inhibición que realiza el antioxidante en la formación de radicales peroxilo ($\cdot\text{OOR}$) producidos en una reacción de radicales en cadena. El método fue propuesto en la década de los 80's y ha sido continuamente perfeccionado (Wayner et al., 1985; 1987; Glazer, 1993; Ghiselli et al., 1995; Cao et al., 1993;1999).

Los ensayos DPPH (difetil picril hidrazilo), fueron propuestos por Brand-Williams (1995). El DPPH es un radical orgánico estable y con una fuerte coloración violeta y que absorbe radiación a una longitud de onda máxima de 517 nm. Tiene las ventajas de estar disponible comercialmente y no tiene que ser generado in situ. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH midiendo el decaimiento de la absorción de radiación.

El método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) propuesto por Miller (1993), se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar al catión coloreado $ABTS^+$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS.

En la actualidad hay propuestas electroquímicas prometedoras, de las cuales destacan, la voltamperometría cíclica y la polarografía diferencial de impulsos. Recientemente, se han desarrollado métodos polarográficos basados en reacciones de óxido-reducción de sustancias antioxidantes con peróxido de hidrógeno, ya que este último forma un complejo estable en presencia de mercurio, produciendo una corriente anódica directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno (Kikuchi, 1976; Suznjevic, 2011). Este método ha sido aplicado a distintos productos como mieles, propóleos y bebidas alcohólicas (Gorjanović et al., 2010; 2013; Potkonjak et al., 2012).

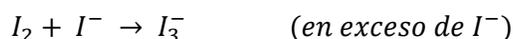
Aunque hay varias maneras de clasificar los métodos de la determinación de actividad antioxidante, una de las más sencillas se basa en clasificarlos como directos e indirectos (Agudo, 2010; Sánchez-Moreno, 2002):

En los métodos directos, se sigue la variación de la concentración del radical que reacciona con la especie antioxidante; es decir, el radical debe de producir una señal analítica que disminuye proporcionalmente con la adición del antioxidante (ABTS, DPPH y otros).

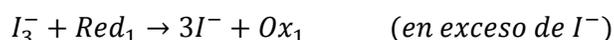
En los métodos indirectos, los radicales libres reaccionan generando o desapareciendo un tercer reactivo que produce una señal analítica. La señal variará proporcionalmente con la adición de un antioxidante, ya que éste provoca una disminución en la concentración del radical (ORAC, FRAP y otros).

3.4.2 YODIMETRÍA Y VOLTAMPEROMETRÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

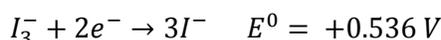
El yodo molecular en presencia de yoduros (por ejemplo, yoduro de potasio), es soluble en medio acuoso porque forma el complejo estable triyoduro:



El triyoduro es una especie oxidante muy utilizada en reacciones redox debido a su relativamente alto potencial de reducción estándar, su versatilidad de aplicación, la disponibilidad de los reactivos que lo originan y, además no es necesario el uso de indicador para detectar el punto final en la yodimetría. La reacción del triyoduro con los reductores es la siguiente:



Como ya se mencionó, el potencial de reducción estándar del triyoduro es relativamente alto, lo que permite que la reacción sea utilizada con un espectro amplio de reductores:



En el presente estudio se plantea aplicar la yodimetría para la determinación de la actividad antioxidante, midiendo la variación de la concentración del triyoduro a través de voltamperometría, con electrodo de disco giratorio de platino. Ya que la señal que se observará en el experimento es la onda voltamperométrica del sistema I_3^- / I^- , el método propuesto se clasificaría como un método directo.

3.5 FUNDAMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1 CONDUCTIVIDAD

La conductividad específica (X_i) de una solución cualquiera es una medida de la facilidad con que la corriente eléctrica fluye a través de la matriz de la solución y depende, en primer

lugar, de la concentración de cada especie conductora (es decir la cantidad de cada uno de los iones en solución), la temperatura y la naturaleza de las especies en solución.

La conductividad se determina utilizando un conductímetro, que en realidad mide la conductancia “L” (en μS). El valor de L se convierte en conductividad específica (X_i) a través del valor de la constante de celda del aparato, empleando la relación siguiente:

$$X = L \cdot k_c \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

X es la conductividad específica expresada en $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$,

L es la conductancia de la solución medida del conductímetro y expresada en μS , y

k_c es el valor de la constante de celda del conductímetro que tiene un valor dado en cm^{-1}

Está demostrado que la conductividad de la miel está directamente relacionada con el porcentaje de cenizas de la misma (Vorwohl, 1964). Se ha propuesto una ecuación lineal que describe dicha relación (Piazza et al., 1991):

$$X = 1.74A + 0.14 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

X es la conductividad específica expresada en $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, y A es el porcentaje en masa de cenizas de la miel.

La conductividad es en sí, un parámetro importante de las mieles y está incluida, como ya se mencionó, en algunas normas como un parámetro de calidad. Hay estudios que proponen que la conductividad en la miel es un insumo importante para conocer el origen palinológico, botánico y geográfico de la misma (Sanz Cervera, 1994; Acquarone et al., 2007).

3.5.2 POTENCIOMETRÍA

Los métodos electroanalíticos que se basan en la medición de potenciales electroquímicos de las disoluciones se denominan Métodos Potenciométricos; en particular, una titulación potenciométrica se refiere a la medida de la variación del potencial electroquímico de una solución en función del volumen o de la cantidad de otra solución titulante (Skoog et al.,

2005). Para realizar una titulación potenciométrica es necesario que el electrodo indicador sea sensible al analito (de preferencia), o a una especie que tenga una relación estequiométrica conocida con él. Como en una celda electroquímica básica, el potencial electroquímico medido por el voltímetro en la solución de interés, estará determinado por la diferencia de potencial entre dos semiceldas; una formada por la solución titulada y el electrodo indicador (potencial variable), y la otra por el electrodo de referencia (potencial fijo y conocido) que se emplee en la titulación.

La información producida por las titulaciones potenciométricas es mucho más confiable y útil que la que proviene de una titulación con indicadores químicos, ya que describe el comportamiento de la concentración del analito y el potencial durante la titulación completa. Por otra parte, en una titulación colorimétrica aplicada a soluciones coloreadas o turbias, el viraje color del indicador químico no siempre es perceptible (Skoog et al., 2001; Harris, 2007).

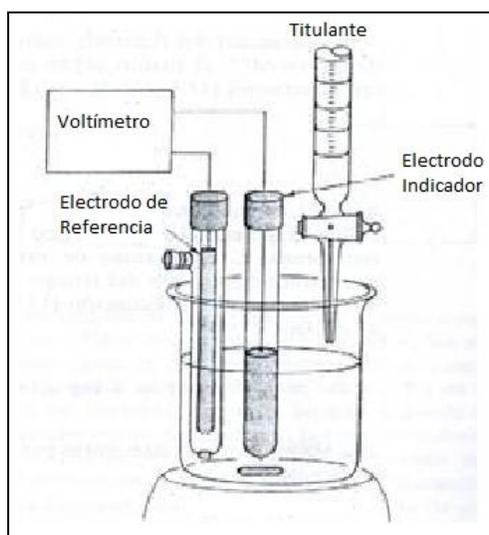


Figura 4: Sistema para una titulación potenciométrica

En el caso particular de esta investigación, se utilizarán métodos potenciométricos para la determinación del pH, la acidez libre y el porcentaje de azúcares reductores. Para las dos primeras se utilizará un electrodo selectivo de iones hidrógeno con referencia interna y para la cuantificación de azúcares reductores se utilizará un alambre de cobre como electrodo indicador y como referencia un electrodo de Ag/AgCl.

3.5.2.1 DETERMINACIÓN DE pH Y ACIDEZ LIBRE

El electrodo selectivo de iones H^+ que se utilizó, fue uno combinado, es decir, la referencia y el indicador están integrados en un mismo sistema. La referencia es un electrodo de Ag/AgCl (externo) y el electrodo indicador consiste en una membrana porosa, sensible al intercambio de iones H^+ y un electrodo de referencia interno de Ag/AgCl; este sistema se conoce como electrodo combinado de vidrio. En la Figura 5 se puede observar el esquema del electrodo descrito.

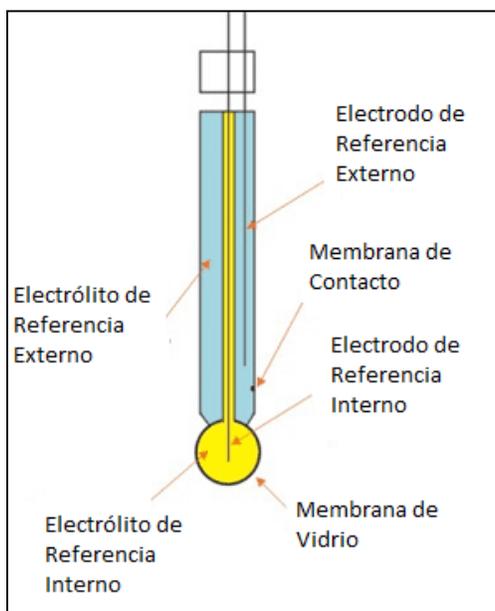
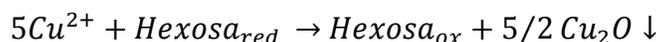


Figura 5: Estructura clásica de un electrodo de selectivo de iones hidrógeno combinado referencia.

3.5.2.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

En el caso de la determinación de azúcares reductores se utilizó el método propuesto por Lane-Eynon (AOAC, 2005) con la modificación de que el punto final se determinará por potenciometría y no por el uso de indicador químico. El método de Lane-Eynon consiste en el empleo de la reacción de Fehling para la titulación; se adiciona una solución de miel a una alícuota de la mezcla de reactivos de Fehling (Sulfato de Cobre y Tartratos en medio básico) y el punto final se detecta utilizando azul de metileno como indicador.

Debido a que se conoce la estequiometría de la reacción con hexosas reductoras con los reactivos de Fehling, con el empleo de un electrodo indicador de cobre (alambre de cobre), y un electrodo de referencia (Ag/AgCl), se puede realizar una titulación potenciométrica según el procedimiento de Preza de la Vega (2007). En la miel, las hexosas reductoras son en su mayoría glucosa y fructosa. En términos muy generales, la reacción de las hexosas reductoras con el ion cúprico es la siguiente:



El potencial en el punto de equivalencia para una reacción química cualquiera está dada por la “semisuma ponderada” de sus potenciales estándares, es decir:

$$E_{equiv} = \frac{n_1 E_1 + n_2 E_2}{n_1 + n_2} \quad (\text{Ecuación 3})$$

La ecuación 3 plantea que la estequiometría es un factor del cual depende el potencial en el punto de equivalencia y permite conocer la posición exacta en la curva de titulación donde se encuentra el punto de equivalencia, siempre y cuando se conozca la estequiometría de la reacción. Por ejemplo, para el caso específico de la determinación de azúcares reductores, se asigna el potencial E_1 a la semireacción del sistema del cobre ($E_{Cu(II)}$) y E_2 a la semireacción del sistema de azúcares reductores ($E_{Az.Red}$) en exceso (con el electrodo de cobre), tomando en cuenta que la estequiometría de la reacción que se lleva a cabo es de 5 moles de Cu(II) por 1 mol de azúcar reductor, el potencial electroquímico en el punto de equivalencia viene dado por:

$$E_{equiv} = \frac{1E_{Cu(II)} + 5E_{Az.Red.}}{1+5} \quad (\text{Ecuación 3a})$$

Es decir, que el punto de equivalencia se encuentra a 5/6 de la zona logarítmica del potencial del Cu(II), o a 1/6 de la zona logarítmica del potencial que establecen los azúcares reductores. Se puede observar un ejemplo gráfico del cálculo del punto final en la Figura 6.

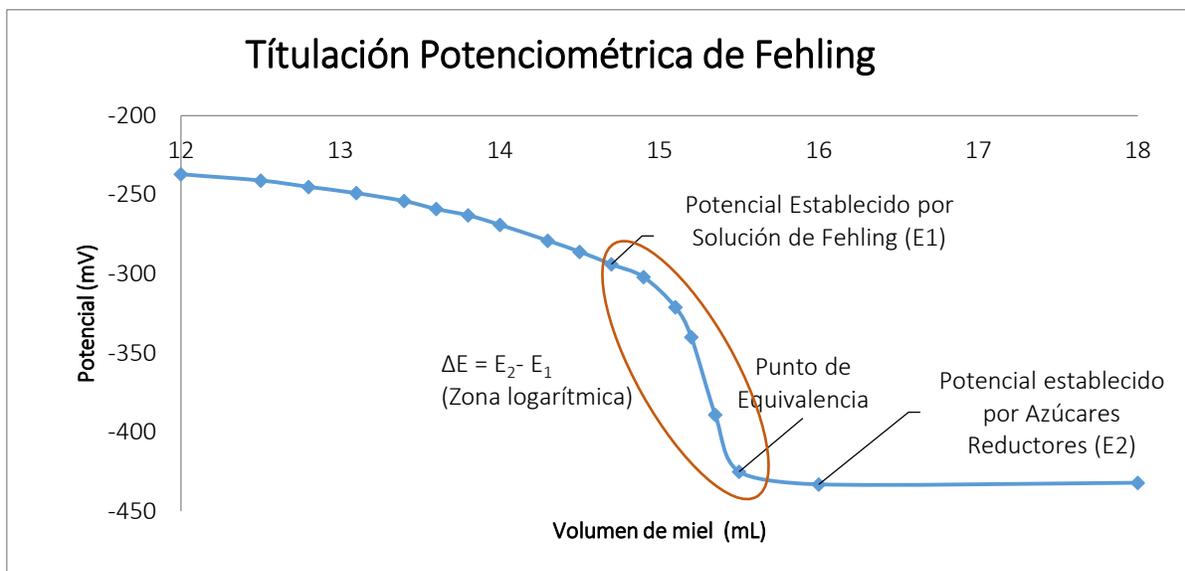


Figura 6: Curva de titulación potenciométrica de Fehling.

3.5.3 TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS

3.5.3.1 GENERALIDADES SOBRE LA ELECTROQUÍMICA

Las reacciones electroquímicas son transformaciones heterogéneas forzadas de óxido-reducción llevadas a cabo en la interfase electrodo-disolución gracias a una diferencia de potencial impuesta convenientemente. La reacción electroquímica se llevará a cabo siempre y cuando se aplique un potencial adecuado, produciendo una corriente debido a la transferencia de electrones entre la solución y los electrodos (Pingarrón y Sánchez, 2003). Los métodos electroquímicos están basados en la medición de la corriente en función del potencial, empleando condiciones que favorecen la carga o polarización del electrodo de trabajo. Para facilitar esta polarización, generalmente los electrodos de trabajo tienen un área superficial muy pequeña, unos pocos milímetros cuadrados como máximo (Skoog et al., 2001). Las reacciones químicas heterogéneas, llevadas a cabo en la interfase electrodo-disolución, producto de una diferencia de potencial entre dos electrodos se conocen como electrólisis. Para que se lleve a cabo la reacción electroquímica, la especie electroactiva deberá, primero, trasladarse desde el seno de la disolución hasta la interfase electrodo-

disolución, donde puede sufrir una transformación química por la ganancia o la pérdida de electrones, para después alejarse por difusión según se puede apreciar en la Figura 7.

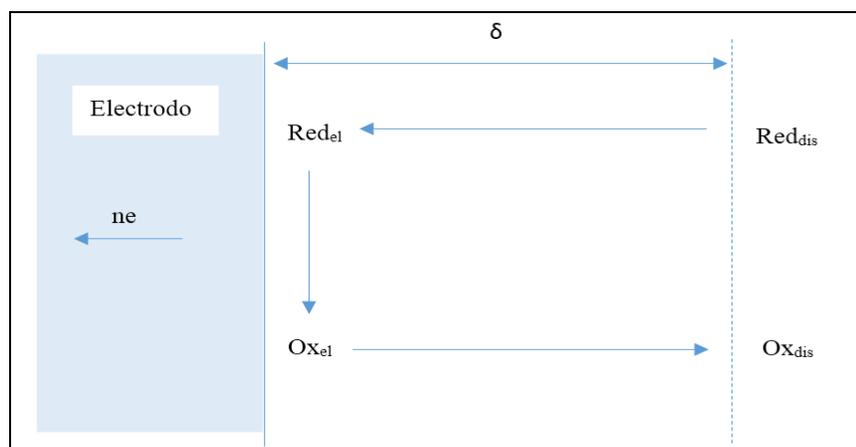


Figura 7: Esquema simplificado de la oxidación de una sustancia en un electrodo actuando como un ánodo.

3.5.3.1.1 RÉGIMEN DE DIFUSIÓN PURA Y RÉGIMEN DE DIFUSIÓN CONVECTIVA

Se puede notar que la electrólisis depende del transporte de la especie desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. Si se le aplica un potencial conveniente a una solución con una especie electroactiva para comenzar el fenómeno de la electrólisis, el efecto inmediato será que la concentración de dicha especie disminuirá en las cercanías del electrodo y se mantendrá constante en el seno de la solución, esta situación genera un gradiente de concentración en la solución, donde la especie difundirá desde el seno hasta los alrededores del electrodo, formando lo que se conoce como capa de difusión. Si la solución se encuentra en reposo, el espesor de la capa formada producto de la difusión aumentará paulatinamente conforme pasa el tiempo. Si al contrario, la solución se agita uniformemente el espesor se mantendrá constante al igual que el gradiente de concentración. Estas dos situaciones se conocen como régimen de difusión pura y régimen de difusión convectiva, respectivamente.

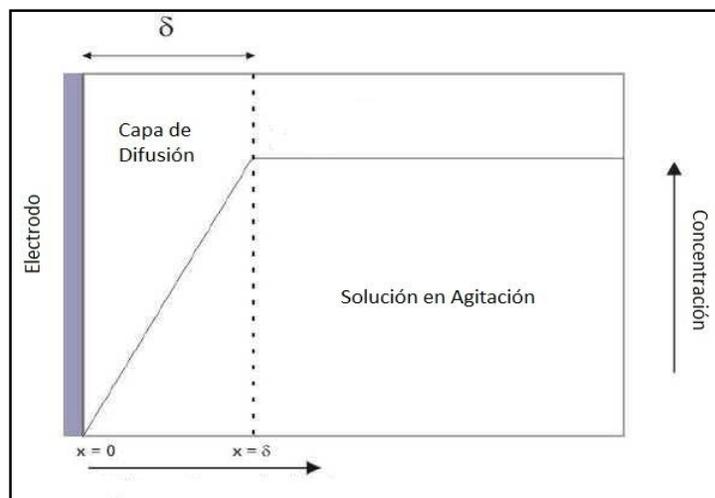


Figura 8: Esquema de la capa de difusión en un régimen de difusión convectiva

Como se puede observar en la Figura 8, la corriente en cualquier momento de la electrólisis está determinada por dos factores: 1) la velocidad con que la especie electroactiva se traslada desde el seno de la solución hacia la capa de difusión y 2) la velocidad con que la especie electroactiva se traslada desde la capa de difusión hacia el electrodo. Si la agitación (convección) se mantiene constante, el aporte del analito desde el seno de la solución hacia la capa de difusión se mantendrá constante, y la corriente dependerá únicamente de la velocidad de difusión de la especie desde la capa hacia el electrodo. En estas condiciones, la velocidad de difusión, v_d , (es decir, la velocidad con que la especie difunde desde la capa hacia el electrodo), es directamente proporcional al gradiente de concentración, que se forma por la diferencia de concentraciones en el seno de la solución (C_S) y en los alrededores del electrodo (C_E) (Pingarrón y Sánchez, 2003; Skoog et al., 2001):

$$v_d = k(C_S - C_E) \quad (\text{Ecuación 4})$$

3.5.3.1.2 ELECTRÓLITO SOPORTE

Las técnicas electroquímicas hacen uso de una sustancia iónica (de preferencia no electroactiva) en exceso en la solución, conocida como electrólito soporte. La misión del electrólito soporte es minimizar la corriente ocasionada por la migración de la especie electroactiva hacia los electrodos. Cuando la concentración del electrolito soporte está en un

orden 50 o 100 veces mayor o más al de la especie electroactiva, la fracción de la corriente total transportada por migración por la especie electroactiva se acerca a cero. Por lo tanto, la velocidad de migración del analito hacia el electrodo de carga opuesta se hace prácticamente independiente del potencial aplicado (Skoog et al., 2001).

3.5.3.1.3 CELDA ELECTROQUÍMICA

El sistema de una celda electroquímica básica se representa en la Figura 9. La diferencia de potencial (ΔE), que se aplica a la solución es establecida entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar, mientras que la corriente (i) se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia.

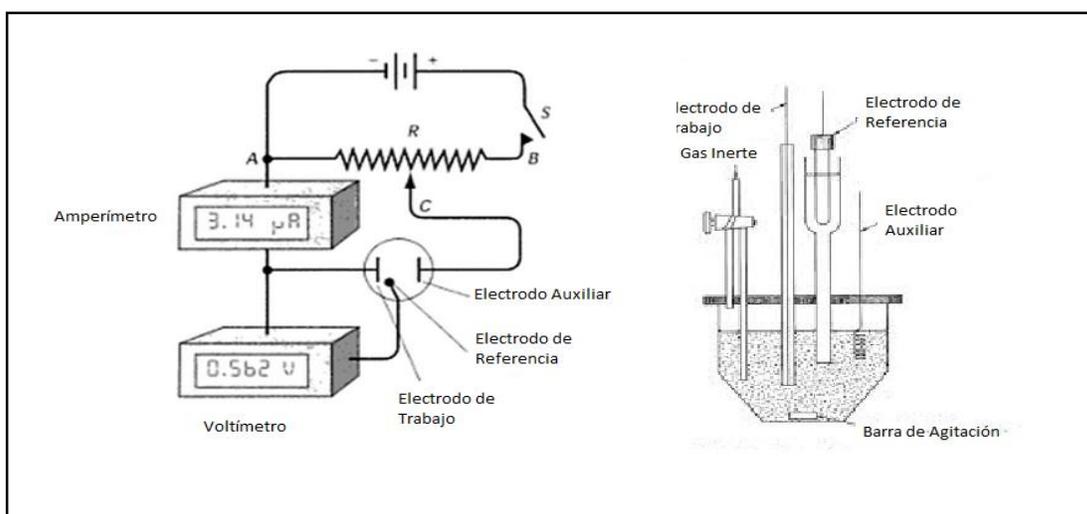


Figura 9: Diseño de una celda electroquímica: esquema eléctrico (izquierda) y componentes principales (derecha)

3.5.3.1.4 CURVAS INTENSIDAD- POTENCIAL

3.5.3.1.4.1 LA CORRIENTE LÍMITE

Si se tiene una celda electrolítica como la de la Figura 9, en la que se establece una diferencia de potencial suficiente para electrolizar la especie electroactiva en solución, en un régimen de difusión convectiva, al graficar la corriente producida por la electrólisis de la especie en

función del potencial aplicado se obtiene una curva conocida como curva intensidad – potencial (i-E), también llamada voltamperograma. Cuando se alcance el potencial electroquímico necesario para electrolizar a la especie electroactiva, se obtendrá el flujo máximo de ésta hacia el electrodo, produciendo la corriente máxima que la electrólisis puede generar. Ese valor de corriente es conocido como Corriente Límite.

En términos generales, si el área del electrodo, y la longitud de la capa de difusión permanecen constantes, la relación entre la corriente límite y la concentración de una especie electroactiva “X” es directamente proporcional a la concentración y está dada por la Ecuación 5.

$$I_{lim\ x} = n d_x C_x \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

$I_{lim\ x}$ es la corriente límite producida por X

n es el número de electrones que se trasladan en la electrólisis de X

d_x es una constante asociada a la velocidad de difusión de X

C_x es la concentración analítica de X.

Se puede observar que la expresión anterior expone una relación directamente proporcional de la corriente límite con la concentración de la especie electroactiva. Por lo tanto, para que una curva intensidad-potencial nos brinde información cuantitativa, el experimento se debe de realizar un régimen de difusión convectiva, ya que la capa de difusión debe de ser de longitud constante para que así el transporte de la especie electroactiva también se mantenga constante. En este caso de convección constante, se dice que la corriente corresponde exclusivamente al fenómeno de transporte de difusión. En la Figura 10 se puede observar el incremento de la corriente producida por una sustancia electroactiva en función del potencial aplicado hasta llegar a un punto donde permanece constante (corriente límite); este comportamiento de la corriente en función del potencial se conoce como onda voltamperométrica.

Al aplicarse el mismo potencial a una sustancia no electroactiva o inerte (como el electrólito soporte), la corriente es nula o cercana a cero dependiendo de las condiciones del experimento, y en este caso, se conoce como corriente residual.

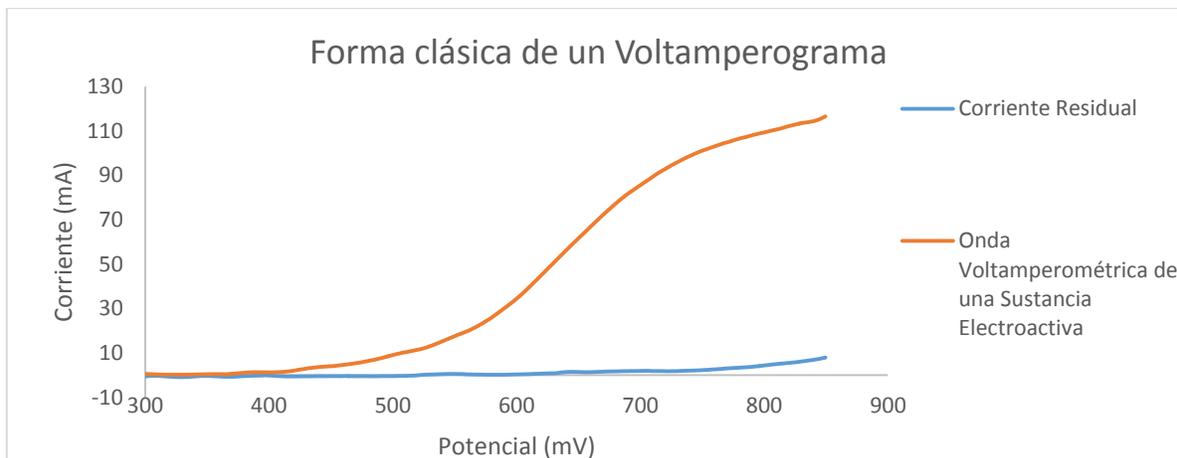


Figura 10: Curva intensidad-potencial de una especie electroactiva y de un medio no electroactivo (fondo o corriente residual).

3.5.3.2 VOLTAMPEROMETRÍA

La voltamperometría es un conjunto de técnicas electroquímicas que se basan en la medición de la corriente en función del potencial aplicado sobre un microelectrodo. Las técnicas voltamperométricas se pueden dividir en las que se desarrollan en un régimen de difusión convectiva y en las que se desarrollan en régimen de difusión pura.

En el presente estudio se utilizó como electrodo de trabajo el microelectrodo de disco giratorio de platino, que al girar sobre su propio eje, genera un régimen de difusión convectiva, tal y como se muestra en la Figura 11.

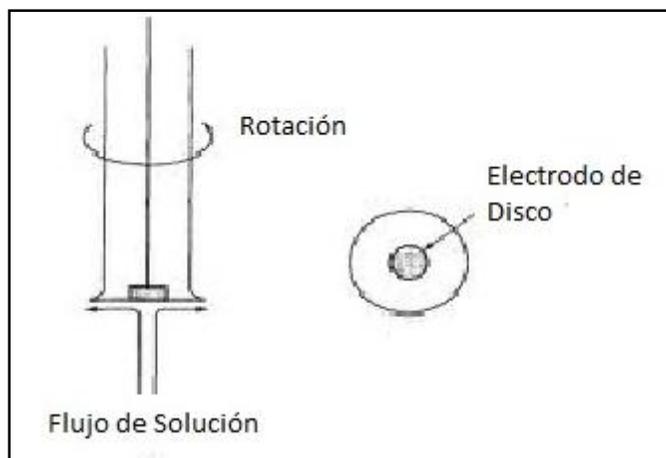


Figura 11: Estructura de un electrodo sólido de disco giratorio

Este tipo de electrodo es muy sencillo, ya que consiste en un disco de un material electródico embebido en una varilla de un material aislante que está unida directamente a un motor que hace rotar al disco sobre su propio eje. La velocidad angular (ω) producida por éste movimiento debe ser constante para que el experimento sea cuantitativo y pueda ser expresado por una ecuación matemática relativamente sencilla. Como se observa en la Figura 11, la rotación del disco arrastra la disolución horizontalmente hacia afuera desde el centro del disco en una dirección radial. Las gráficas de i - E que producen estos electrodos se conocen como voltamperogramas, como ya se mencionó antes, y tienen la forma clásica que está en la Figura 10.

Manteniendo constantes los valores del área del disco, la velocidad angular y la viscosidad cinemática de la solución, la corriente límite es directamente proporcional a la concentración del analito.

3.5.3.3 POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

La polarografía es un tipo de voltamperometría en la que el electrodo de trabajo es un electrodo de gota de mercurio (EGM). A diferencia de los electrodos sólidos, el electrodo de gota de mercurio, consiste en un capilar de vidrio, conectado a un depósito de mercurio. En

la actualidad los electrodos utilizan una válvula controlada electrónicamente para formar una gota de mercurio, que se mantiene suspendida durante un tiempo en la base de un capilar. Después de medir la corriente y el voltaje se desprende la gota mecánicamente. Luego se forma otra gota, y se toma la siguiente medida (Harris, 2007).

Las bondades del electrodo de mercurio (EGM) son variadas, entre ellas que la superficie del electrodo se renueva con cada gota, y por lo tanto es imposible que existan depósitos que se han electrolizado. Además, debido al intervalo de potenciales en el que se pueden realizar experimentos (conocido como dominio de electroactividad), el EGM es ideal para estudiar reacciones de reducción.

La polarografía diferencial de impulsos es una técnica electroanalítica que se basa en la medida de la corriente antes y después de aplicar un impulso de potencial al electrodo. La diferencia de la corriente por cada impulso (Δi), se registra en función del potencial que aumenta linealmente, obteniéndose una curva diferencial en forma de pico, en la cual la altura del pico es proporcional a la concentración. Los esquemas de este comportamiento se pueden observar en la Figura 12 (Harris, 2007; Skoog et al., 2001; Pingarrón y Sánchez, 2003).

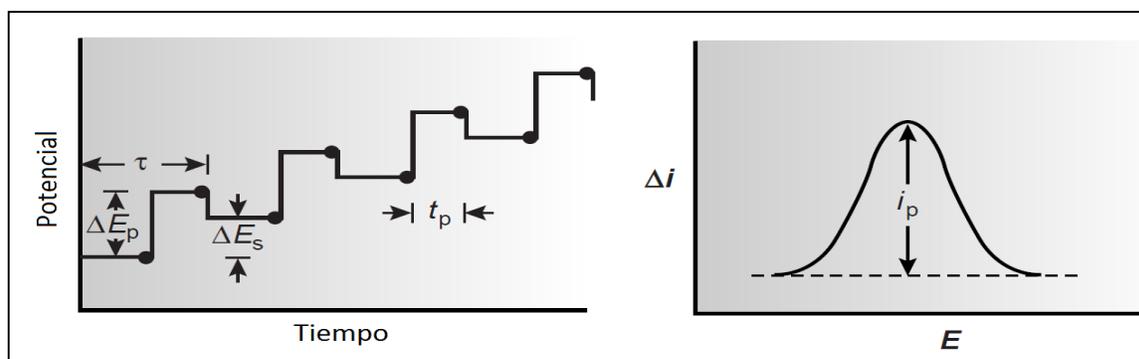


Figura 12: Forma del muestreo de corriente de la polarografía diferencial de impulsos y curva típica de un polarograma por impulsos.

El empleo de la polarografía diferencial de impulsos implica ciertas ventajas con respecto a la polarografía de corriente directa o polarografía clásica, entre ellas, la de presentar mejores límites de detección ($10^{-8}M$) y que se pueden realizar determinaciones simultáneas de sustancias con potenciales normales muy cercanos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 ESTUDIO DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE MIELES.

4.1.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MIELES

Se estudiaron un total de 6 mieles de abeja *Apis mellifera* (identificadas como MA), 2 mieles del género *Trigona*, y 3 del género *Melipona*, identificadas como MM (ver Tabla 5). Con excepción de MA5, las mieles no son de marcas comerciales. Las muestras tienen diversa procedencia, algunas fueron colectadas por apicultores y meliponicultores mexicanos y fueron llevadas al Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Química de la UNAM. Las mieles de *Apis mellifera* que proceden de El Salvador fueron proporcionadas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería y las mieles de abejas sin aguijón fueron adquiridas en el Municipio de La Palma, Chalatenango por medio de una familia dedicada a la meliponicultura.

Tabla 5: Descripción de las muestras de miel.

Código	Género	Especie	Lugar de Procedencia	Cosecha
MA1	Apis	<i>Apis mellifera</i>	La Libertad, El Salvador	2012
MA2	Apis	<i>Apis mellifera</i>	La Libertad, El Salvador	2012
MA3	Apis	<i>Apis mellifera</i>	La Libertad, El Salvador	2012
MA4	Apis	<i>Apis mellifera</i>	Chiapas, México	2013
MA5	Apis	<i>Apis mellifera</i>	México (Miel Comercial)	-
MA6	Apis	<i>Apis mellifera</i>	Brasil	2011
MM1	Trigona	<i>Tetragonisca angustula</i>	Chalatenango, El Salvador	Junio, 2012
MM2	Melipona	<i>Melipona Beecheii</i>	Chalatenango, El Salvador	Junio, 2012
MM3	Melipona	-	Chiapas, México	Abril, 2011
MM4	Trigona	-	Campeche, México	2012
MM5	Melipona	-	Campeche, México	2012

4.1.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS.

Se prepararon 10.0 mL de solución de miel con agua desionizada, a una concentración aproximada de 0.10 g.mL^{-1} de solución, para cada miel estudiada. Empleando un conductímetro se midió la conductividad de cada una de las soluciones y por medio de la Ecuación 2 se calculó el porcentaje de cenizas.

4.1.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

La medición de humedad se realizó a través de un refractómetro. Se colocó uniformemente una pequeña cantidad de miel sobre el prisma del refractómetro, obteniendo un valor de sólidos disueltos expresados en la escala de grados Brix. El porcentaje de humedad está dado por la diferencia entre 100 y los grados Brix medidos.

4.1.4 pH Y ACIDEZ LIBRE

4.1.4.1 pH

Para la medida de pH se utilizaron las mismas soluciones que en la medición conductimétrica del porcentaje de cenizas; después de hacer la medición de conductividad de cada una de las soluciones se procedió a medir el pH, con el empleo de un pHmetro previamente calibrado con soluciones tampón de pH de 4.0 y 7.0.

4.1.4.2 ACIDEZ LIBRE

Se prepararon soluciones de miel con agua desionizada y descarbonatada, de una concentración aproximada 0.6 g.mL^{-1} de miel. Las titulaciones ácido-base se realizaron con solución previamente estandarizada de NaOH de concentración alrededor de 0.050 M. Se elaboraron las curvas ácido-base y con la ayuda de un pHmetro se identificarán los puntos finales directamente de la curva de valoración.

4.1.5 AZÚCARES REDUCTORES

La determinación de azúcares reductores en las muestras se realizó mediante de una valoración potenciométrica, para lo cual se prepararon las dos soluciones de Fehling: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a una concentración aproximada de 0.25M (Fehling A) y tartrato de sodio y potasio (1.25 M) en hidróxido de sodio (2.5 a 3 M), (Fehling B). En un vaso de precipitados de 50 mL se colocó una alícuota de 5.0 mL de cada una de las soluciones y se tituló con una solución de miel de aproximadamente 5.0 g de miel en 100 mL, utilizando agua desionizada. La reacción redox es de cinética lenta a temperatura ambiente, y para que pueda desarrollarse cuantitativamente la temperatura se debe de elevar cerca de su punto de ebullición, así que la titulación se llevó a cabo sobre una parrilla de calentamiento por encima de 87°C.

4.1.6 FRUCTOSA

La determinación de fructosa se realizó empleando la técnica de polarografía diferencial de impulsos (PDI). La miel es una matriz compleja, ya que su composición es diversa y varía en cada muestra, por lo tanto, el método de estandarización más adecuado en estos casos es el de adiciones patrón. Se elaboraron soluciones de miel pesando alrededor de 1.00 g y se llevó al aforo con agua desionizada en un balón volumétrico de 10.0mL. También se preparó una solución de fructosa patrón de aproximadamente 4.5mg mL^{-1} que se utilizó para hacer adiciones de patrón a la muestra. Como electrólito soporte se utilizó 10.0 mL de solución de CaCl_2 1.0 M, y se realizó un barrido de potencial de -1.85V a -1.25V, con una velocidad de barrido de 5mVs^{-1} . Posteriormente se realizó un nuevo polarograma con la adición de 50 μL de la solución de miel. De igual manera se realizaron polarogramas de adiciones sucesivas de 50 μL de patrón de fructosa, con el propósito de elaborar una curva de calibración por adiciones estándar.

4.1.7 HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

De igual manera, la determinación de HMF se llevó a cabo por medio de PDI y se utilizó el método de adiciones patrón para la cuantificación. Se prepararon soluciones de miel con agua desionizada de cerca de 2.50 g de miel por 25.0 mL de solución, también una de 10.0 mL de solución de HMF estándar de alrededor de 1.50 mg.mL⁻¹.

El electrolito soporte empleado fue una solución tampón de boratos de pH 10, que se preparó con ácido bórico y borato de sodio. Se utilizaron 10.0 mL de electrolito soporte, y el barrido de potencial se efectuó desde -1.50V hasta -0.80V a una velocidad de 5.0 mV.s⁻¹.

En estas condiciones, se realizaron los barridos de potencial correspondientes, primero, al electrolito soporte, luego con la adición de 1.0 o 2.0 mL de solución de miel, y por último con 4 o 5 adiciones de 10μL de patrón HMF, para construir la curva de adiciones patrón.

4.1.8 COMPARACIÓN DE TIPOS DE MIEL

Para llevar a cabo la comparación de las mieles en estudio, éstas se separaron en dos grupos de acuerdo al género de abeja que la produce (Tabla 5); en el primero, se ubicaron las mieles del género *Apis* (MA) y en el segundo, la mieles de los géneros *Melipona* y *Trigona* (MM). El promedio de cada parámetro fisicoquímico que se determinó en cada grupo, se utilizó para evaluar las posibles diferencias, que posteriormente se compararon de forma cualitativa, de acuerdo con lo establecido por la norma salvadoreña de miel, algunas normativas regionales y los valores propuestos por algunos investigadores (Vit.et al., 2004).

4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS

La metodología de la determinación de la actividad antioxidante en los extractos de propóleos se dividió en tres etapas: el estudio electroquímico de la reacción del triyoduro con reductores de interés, la extracción de los propóleos y la medición de su actividad antioxidante.

4.2.1 DESCRIPCIÓN DE PROPÓLEOS

Se estudiaron 10 propóleos de distinta procedencia, 2 provenientes de El Salvador y los otros 8 provenientes de diversos lugares de México. Los datos de colección y procedencia se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Descripción de muestras de propóleos seleccionadas para esta investigación.

Propóleos	Fecha de Colecta	Procedencia	Método de Colección
P1	Agosto, 2009 – Mayo, 2010	Apiario Mendoza, Tapachula Chiapas, México.	Raspado
P2	Abril – Septiembre, 2012	Apiario Cesar, Kulactic, Tenejapa, Chiapas, México.	Raspado
P3	Mayo – Septiembre, 2012	Apiario Paco, La Trinitaria, Chiapas, México.	Raspado
P4	Febrero – Septiembre, 2012	Laureano, Pantelho, Chiapas, México.	Raspado
P5	Febrero- Octubre, 2011	San Cristóbal, Chiapas, México.	Raspado
P6	Diciembre, 2012	Rancho San Pedro, Yucatán, México.	Raspado
P7	Enero, 2013	Rancho San Pedro, Yucatán, México.	Trampa
P8*	-	DIPROANSA, México	-
P9	2013	Cordillera del Bálsamo, El Salvador.	Raspado
P10	Julio, 2013	La Palma, Chalatenango, El Salvador.	Raspado

*La muestra 8 es un preparado comercial de propóleos, no se indicaba lugar, fecha ni método de colecta.

4.2.2 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LAS REACCIONES DEL YODO CON REDUCTORES

Se empleó la técnica clásica de la yodimetría con la variante de que el cambio de la concentración del triyoduro se evaluó por voltamperometría, con la adición del extracto de propóleos.

Se realizó un análisis electroquímico en el que se estudió la relación directa entre la corriente límite de la reducción de la especie I_3^- y su concentración en la celda. Se empleó como electrólito soporte $LiNO_3$ ya que es una sal muy soluble en etanol y que no posee aniones halogenuros que podrían interferir con la señal del sistema I_3^-/I^- .

Luego de identificar la señal del sistema I_3^-/I^- y conocer su comportamiento en las condiciones experimentales, se realizaron titulaciones voltamperométricas con quercetina y ácido ascórbico que son compuestos antioxidantes (es decir, reductores) muy comunes (Wayner et al., 1987; Londoño, 2011). El I_3^- no reacciona con glucosa en condiciones neutras o ácidas, ni lo hace con fructosa, sin importar las condiciones (Kline y Acree, 1930; Amerine y Thoukis, 1958; Lothrop y Holmes, 1931). Se establecieron las condiciones experimentales en que la glucosa no reacciona con I_3^- , ya que los azúcares reductores no son considerados como especies antioxidantes (por que no reaccionan con los radicales libres de origen biológico) y si el agente oxidante que se utiliza para la titulación reacciona con estos carbohidratos se estaría realizando una sobreestimación de la medida.

4.2.3 EXTRACCIÓN DE PROPÓLEOS EN MEZCLA HIDRO-ETANÓLICA.

La extracción de los propóleos se realizó con una mezcla compuesta por 70% (v/v) de etanol y 30% de agua. Algunos estudios indican que la mayoría de los compuestos fenólicos y flavonoides se extraen cuantitativamente en esta mezcla (Park e Ikegaki, 1998). Se pesaron aproximadamente 3.0 g de propóleos y se depositaron en un vaso de precipitados de 50.0 mL, posteriormente se realizaron cuatro extracciones de dos horas cada una, con 10 mL de la mezcla hidroetanólica, a temperatura ambiente y con agitación constante.

4.2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS

Con las condiciones experimentales definidas con base en los resultados del estudio electroquímico de la reacción del yodo con reductores, se realizaron valoraciones voltamperométricas con yodo (I_3^-) a los extractos de propóleos; es decir, los parámetros de la celda electroquímica como potenciales inicial y final y velocidad del barrido se tomaron de acuerdo al estudio electroquímico del sistema I_3^-/I^- y su reacción con quercetina y ácido ascórbico.

4.2.5 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO, COBRE, PLOMO Y ZINC EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS.

Por último, se cuantificaron arsénico, cobre, plomo y zinc en cada uno de los extractos de propóleo elaborados, empleando polarografía diferencial de impulsos. Para llevar a cabo las determinaciones se realizaron previamente curvas de calibración de cada una de estas sustancias con sus respectivos patrones a 10 mg.mL^{-1} , para calcular los límites de cuantificación y de determinación respectivos. Se utilizó el medio reportado por Gazcón (2012), HNO_3 0.1M y KNO_3 a 0.1M.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LAS MIELES.

5.1.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CENIZAS.

La conductividad específica (X) en una solución cualquiera, es una característica intrínseca del total de iones disueltos en un determinado solvente; por lo que X es una propiedad aditiva de estas sustancias disueltas en una determinada solución. Por lo tanto, se debe corregir el valor de conductividad específica medido de la solución de miel restándole el valor de conductividad del agua desionizada; de esta manera se tiene el valor únicamente de las sales provenientes de la miel. Expresando de algebraicamente lo anterior se tiene:

$$X_M = X_{SM} - X_{AGUA} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

X_M = conductividad específica de la miel ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$),

X_{SM} = conductividad específica de la solución de miel ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), y

X_{AGUA} = conductividad específica del agua desionizada utilizada para hacer la solución de miel ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

El valor de X_M (en mS) obtenido en la ecuación 6, se sustituye en la ecuación 2, obteniéndose el valor de porcentaje de cenizas para cada muestra, es decir:

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

Por ejemplo para la muestra MA1, Se tienen los siguientes valores:

$$\begin{aligned} X_{SM} &= 195 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}; & X_{AGUA} &= 2.4 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1} \\ X_M &= X_{SM} - X_{AGUA} = 195 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1} - 2.4 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1} \\ &= 192.6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1} = 0.1926 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1} \end{aligned}$$

Ya que el agua desionizada que utilizó para la elaboración de las soluciones fue la misma, se restó éste valor de conductividad a todas las demás soluciones.

Porcentaje de cenizas:

$$A = \frac{X_M - 0.14}{1.74} = \frac{0.1926 - 0.14}{1.74} = 0.030\%$$

De la misma manera se procedió para calcular el porcentaje de cenizas en las demás muestras de miel. Los datos y resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7 Resultados de la determinación conductimétrica de cenizas.

Muestra	Concentración (g miel mL ⁻¹ solución)	Conductividad Específica de la Solución de Miel X _{SM} (mScm ⁻¹)	Conductividad Específica de la Miel X _M =X _{SM} - X _{H₂O} (mScm ⁻¹)	% Cenizas
MA1	0.104	0.195	0.193	0.03
MA2	0.106	0.200	0.198	0.03
MA3	0.103	0.200	0.198	0.03
MA4	0.107	0.155	0.153	0.01
MA5	0.104	0.160	0.158	0.01
MA6	0.106	0.178	0.176	0.02
MM1	0.103	0.395	0.393	0.15
MM2	0.104	0.110	0.108	N.D.
MM3	0.106	0.190	0.188	0.03
MM4	0.103	0.360	0.358	0.13
MM5	0.103	0.365	0.363	0.13
Promedio MA		0.02 ± 0.01 %		
Promedio MM		0.11 ± 0.05 %		

Como se puede observar, las mieles de Apis tienen un porcentaje de cenizas más bajo que las mieles de abejas sin aguijón y esta situación no está lejos de lo esperado, ya que las mieles de Apis en su mayoría tienen un proceso de centrifugación y filtración (inmediato a la colecta), que son parte necesaria de la cadena de producción para alcanzar las normas de calidad exigidas; no así las mieles de abejas precolombinas, las cuales no tienen procesos

formales después de ser recolectadas por el meliponicultor, y su producción y comercialización es estrictamente artesanal.

Sin embargo, un caso excepcional de las mieles estudiadas fue la muestra MM2, que corresponde a la miel salvadoreña de la abeja de “Jicota” (*melipona becheei*), en la cual el valor de cenizas está por debajo de la “límite de detección” de la técnica. Este ejemplo permite exponer la limitación de la técnica propuesta por Piazza et al. (1991), que viene dada por la misma Ecuación 2. Se notará que sólo es posible calcular valores del porcentaje de cenizas (A) cuando la conductividad (X) es mayor de 0.14 μ S:

$$X - 0.14 = 1.74A \quad \therefore$$

$$X > 0.14 \quad \text{(Ecuación 2a)}$$

La Norma Salvadoreña de Miel no contempla un máximo de porcentaje de cenizas, en la Tabla 8 se presentan los parámetros de porcentaje de cenizas exigidos en algunas normas internacionales:

Tabla 8: Comparación del Porcentaje de Cenizas en distintas normas

Normas	% de Cenizas Máximo Propuesto
Norma Mexicana	0.60
Norma Brasileña	0.60
Propuesta para Meliponini*	0.50

*(Vit et al., 2004)

Tomando en cuenta las normas internacionales se puede afirmar que todas las mieles estudiadas tuvieron valores aceptables por debajo de los límites permitidos. Se considera importante que la Norma Salvadoreña de la Miel incluya el Porcentaje de Cenizas, ya que éste es un parámetro que refleja directamente los minerales disueltos en la miel y algunas otras sustancias conductoras que no hacen combustión completa y dejan residuos sólidos en el proceso tradicional de calcinación de la muestra.

Se ha propuesto (Vit et al., 2004) un valor máximo de porcentaje de cenizas de 0.50% (ver Tabla 8). Si se toma en cuenta este valor, todas las mieles estudiadas, tanto las producidas por el género Apis como el género Melipona y Trigona están por debajo de este punto máximo.

Se considera que la relación lineal empleada en este estudio (Piazza et al., 1991), puede ser adecuada a la realidad nacional. Se han realizado ciertos estudios que han aplicado esta técnica (Caballero, 2009; Velásquez Reales, 2014) y han demostrado que puede ser un método alternativo que podría llegar a validarse con el método oficial, con el objeto de su incorporación en las normativas. Esta ruta es mucho más rápida, fácil y con menores costos. Para adecuar la técnica al contexto salvadoreño, sería una tarea pendiente reconfirmar o ajustar los valores de las variables de la Ecuación 2, a los resultados de un estudio de un número representativo de mieles salvadoreñas.

5.1.2 PORCENTAJE DE HUMEDAD

La determinación de la humedad se hizo a través de la medición de sólidos disueltos expresados en grados Brix de las muestras de miel depositadas directamente en el cristal del refractómetro. Se debe tomar en cuenta hacer una pequeña corrección de medida por la temperatura, 0.00225 por cada grado que se aleja de los 20°C.

Por ejemplo para la muestra MM2 (temperatura de medición =23°C):

$$\text{Grados Brix medidos} = 74.8^\circ$$

$$\text{Grados Brix Corregidos} = 74.8 + (0.0025 \times 3) = 74.807^\circ$$

$$\text{Porcentaje de humedad} = 100 - 74.81 = 25.19\%$$

De la misma manera se procedió para el cálculo del porcentaje de humedad para todas las muestras. En la Tabla 9 se presentan los datos de los grados Brix medidos, corregidos y el porcentaje de humedad para todas las mieles estudiadas.

Tabla 9: Resultados del Porcentaje de Humedad de mieles

Muestra	Grados Brix Medidos	Grados Brix Corregidos	Porcentaje de Humedad
MA1	84.1	84.11	15.9%
MA2	80.9	80.91	19.1%
MA3	81.1	81.11	18.9%
MA4	80.1	80.11	19.9%
MA5	81.0	81.01	19.0%
MA6	80.8	80.81	19.2%
MM1	71.0	71.01	29.0%
MM2	74.8	74.81	25.2%
MM3	72.9	72.91	27.1%
MM4	73.6	73.61	26.4%
MM5	73.1	73.11	26.9%
Promedio MA		18.7 ± 1.4 %	
Promedio MM		26.9 ± 1.4 %	

Todas las muestras de Miel de Apis (MA) se encuentran bajo el valor que propone la Norma Salvadoreña de la Miel (máximo de porcentaje de humedad del 20%). En la Tabla 10 se presentan los valores de humedad propuestos en otras normas internacionales. Como ya se estableció anteriormente, es importante conocer el contenido de agua en la miel; ya que si el porcentaje de humedad en una miel de *Apis Mellifera* es arriba de 20%, es un indicio de una posible adulteración.

Tabla 10: Comparación del Porcentaje de Humedad en distintas normas

Normas	% de Humedad Máximo Propuesto
Norma Salvadoreña	20 %
Codex alimentarius	20 %
Norma Mexicana	20 %
Norma Brasileña	20 %
Propuesta para Meliponini *	30 %

*(Vit et al., 2004)

Aunque en muchos aspectos no se tiene certeza de la composición química de las mieles de los distintos tipos de abejas sin aguijón, se conoce muy bien que el contenido de agua en estas mieles es mayor (Baquero y Stamatti, 2006; Cortopassi-Laurino, 2006; Vit P. , 2009). En el país, Alarcón e Ibañez (2008), reportan porcentajes de humedad que rondan desde 22.78 hasta 27.92% en mieles de *Melipona Beechei* y en 20.99 hasta 28.32% en mieles de *Tetragonisca Angustula* en un estudio sobre mieles de distintos municipios del Departamento de Chalatenango. Con base en sus conocimientos empíricos, meliponicultores de la zona de La Palma, Chalatenango, mencionan que la miel de la abeja “Jicota” (*Melipona Beechei*), empieza su fermentación inmediatamente al agregar una pequeña cantidad de agua a la miel. En su propuesta para la regulación de la calidad de las mieles de abejas nativas, Vit et. al. (2004), consideran adecuado establecer como valor máximo del porcentaje de humedad 30%. Por lo anterior, se considera importante hacer un estudio fundamental de las mieles de las abejas precolombinas de El Salvador, incluyendo el contenido de agua (o porcentaje de humedad) como uno de los principales parámetros a estudiar. A pesar de que la medida experimental es muy sencilla, los equilibrios bioquímicos que están íntimamente relacionados al contenido de agua en la miel son muy complejos y delicados, y con un leve cambio se pueden desplazar en un sentido o en el otro, produciendo distintos tipos de reacciones, entre ellas, quizá la más importante, la fermentación.

5.1.3 pH Y ACIDEZ LIBRE

5.1.3.1 pH

Como ya se describió, se tomaron medidas de pH directas de las mismas soluciones de miel utilizada para calcular el porcentaje de cenizas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Resultados de la Medida Directa de pH.

Muestra	pH de la Solución
MA1	3.43
MA2	3.44
MA3	3.56
MA4	3.30
MA5	3.49
MA6	3.81
MM1	3.46
MM2	3.21
MM3	3.03
MM4	3.51
MM5	3.17
Promedio MA	3.50 ± 0.17
Promedio MM	3.28 ± 0.20

Se puede apreciar con una prueba al paladar, que las mieles de abejas precolombinas, generalmente, tienen un sabor más ácido que las mieles de Apis; y al observar los resultados de la medida de pH de las soluciones, se puede notar que las mieles de abejas sin agujón tienen valores levemente más ácidos. Sin embargo, las características ácidas de las mieles son verdaderamente complejas debido a su diversa composición. A pesar de ello la medida directa de pH podría ser suficiente información para dar una idea inicial sobre la percepción del sabor de acidez de una miel.

5.1.3.2 ACIDEZ LIBRE.

Para el cálculo de la acidez libre no se realizó el procedimiento propuesto en la Norma Salvadoreña, ya que éste se considera discutible y las razones se presentan en breve. De acuerdo con la descripción de la parte experimental de la presente investigación se

prepararon dos soluciones de hidróxido de sodio de una concentración alrededor de 0.05M y otra aproximadamente de 0.50M, para valorar las muestras de miel en estudio. Para la estandarización de la solución de hidróxido de sodio que se empleó para la titulación, se colocó en un vaso de precipitados de 25 mililitros una alícuota de 4.0 mililitros de solución de ácido clorhídrico 0.115M, y se valoró con la solución de hidróxido preparada. Se puede observar en la Figura 13 la curva de la valoración acido-base obtenida.

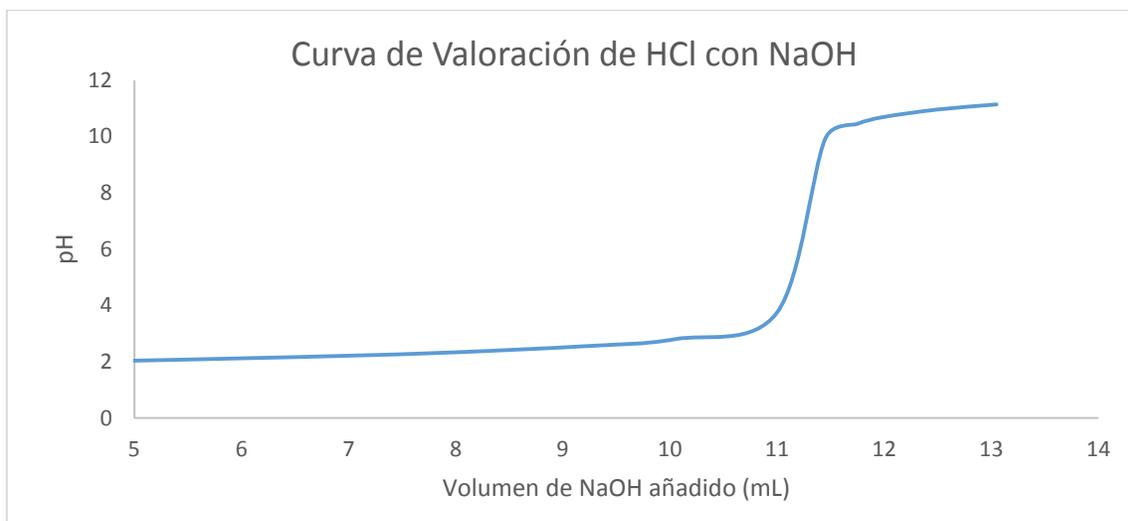


Figura 13: Curva de valoración de HCl 0.115M con NaOH.

Conociendo el volumen del punto de equivalencia, se hicieron los siguientes cálculos para determinar la concentración de la sosa estandarizada:

$$\begin{aligned}
 \text{Volumen de HCl patrón} &= 4.0 \text{ mL} \\
 \text{Concentración de HCl patrón} &= 0.115M \\
 \text{mmoles de HCl} &= \text{Vol. HCl} * \text{Conc. HCl} = 4.0 \text{ mL} * 0.115 \text{ mmol. mL}^{-1} \\
 \text{mmoles de HCl} &= \text{mmoles de NaOH neutralizados} = 0.46 \text{ mmol} \\
 \text{Volumen de NaOH gastada} &= 11.45 \text{ mL} \\
 \text{Concentración de NaOH} &= \text{mmoles de NaOH neut.} / \text{volumen de NaOH gastada} \\
 &= 0.46 \text{ mmoles} / 11.45 \text{ mL} \\
 &= 0.0402M
 \end{aligned}$$

Una vez que se hubo calculado el título de la solución de hidróxido de sodio, se procedió a realizar las valoraciones de las soluciones de miel. Se notará que la concentración de las soluciones de miel es alta en comparación a la propuesta en la norma, pero se decidió

proceder de esta manera después de comprobar que sólo así se definía de manera aceptable la curva de la valoración ácido-base. El cálculo de los miliequivalentes ácidos, se hizo directamente de la gráfica de valoración, debido a que la miel tiene un intervalo tamponado muy grande durante la valoración, el cálculo de la primera derivada no fue de utilidad en todas las muestras. Por ejemplo, para la muestra de miel de Apis, MA4 la curva de valoración tuvo la forma que se observa en la Figura 14.

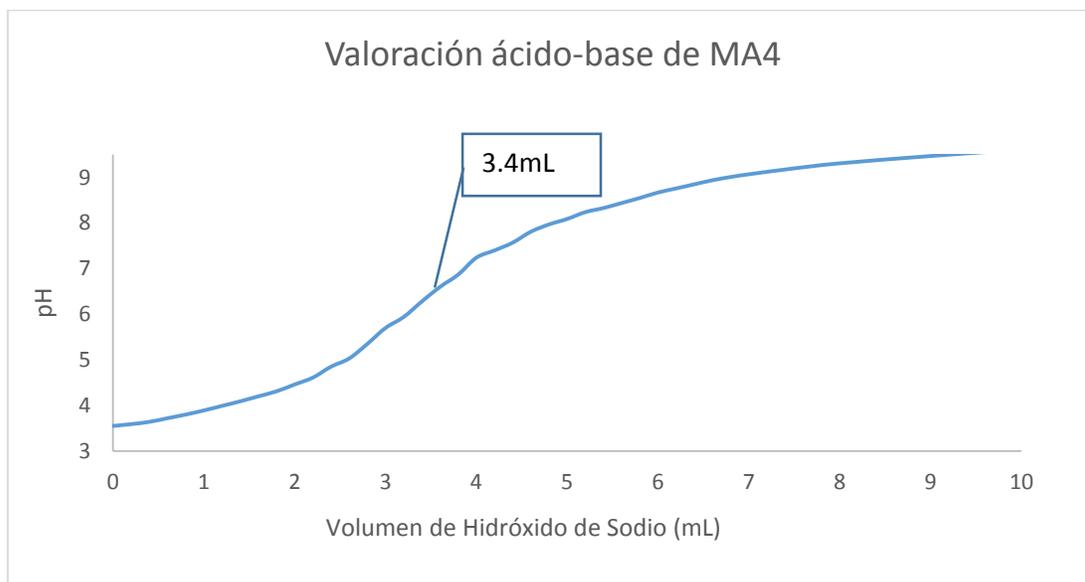


Figura 14: Curva de valoración de 10.0 mL de una solución de miel MA4 con NaOH 0.0531M.

Al observar la curva de la titulación de la solución de miel MA4, se puede distinguir el punto medio de la zona logarítmica del gráfico, que corresponde al punto de equivalencia (3.4mL). Tomando este valor, se calcula el número de equivalentes ácidos libres (acidez libre), en la miel:

$$\begin{aligned}
 \text{Eq. } H^+ \text{ alícuota de de miel} &= \text{mmoles de sosa neutralizados} \\
 \text{mmoles de sosa neutralizados} &= \text{conc. Sosa} * \text{Vol. de Sosa Gastado} \\
 &= 0.0531M * 3.4mL = 0.1805 \text{ mmol} \\
 \text{Eq. } H^+ \text{ alícuota de de miel} &= 0.1805 \text{ meq} \\
 \text{Conc}(H^+) \text{ de miel} &= \text{Eq. } H^+ \text{ alícuota de sol. de miel} / \text{Vol. alícuota de sol. de miel} \\
 \text{Conc}(H^+) \text{ de miel} &= 0.1805 \text{ meq} / 10 \text{ mL} = 0.01805 \text{ meq mL}^{-1}
 \end{aligned}$$

Para expresar el valor en los términos que exige la Norma Salvadoreña (meq ácidos /Kg de miel), se tomará en cuenta la forma de preparación de la solución que fueron 20.0997g en 25.0 mL de solución, por lo tanto:

$$meq H^+ /kg \text{ de miel} = \frac{0.01805meq}{mL} \times \frac{25mL}{20.0997g} \times \frac{1000g}{1Kg}$$

$$meq H^+ /Kg \text{ de MA4} = 22.45 meq.kg^{-}$$

De igual manera se procedió para el cálculo de la acidez libre en las demás muestras de miel, los datos se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12: Resultados de Acidez Libre y el pH en el Punto de Equivalencia

Muestra	Conc. de Hidróxido de Sodio (M)	pH en el punto de Equivalencia	Acidez Libre (meq.kg ⁻)
MA1	0.0402	5.60	15.5
MA2	0.0531	6.54	24.5
MA3	0.0531	5.64	17.8
MA4	0.0531	6.28	22.5
MA5	0.0531	6.58	13.2
MA6	80.8	6.21	11.1
MM1	0.0402	6.73	84.6
MM2	0.0402	7.18	26.1
MM3*	0.4819	7.10	100.9
MM4	0.0402	8.00	97.6
MM5	0.0402	6.07	96.9
Promedio MA		17.4 ± 5.24	
Promedio MM		81.2 ± 31.43	

*La valoración de la miel MM3 fue una microvaloración debido a la poca cantidad de muestra.

Como se esperaba, el resultado de este estudio nos muestra que las mieles de *Meliponini* son considerablemente más ácidas que las mieles de *Apis*. Este hecho no se puede notar con

claridad, con las medidas directas de pH a la miel o a una solución de miel, por lo tanto, es imperativo hacer valoraciones ácido-base para conocer la acidez libre de una miel.

En la Tabla 13 se puede observar los valores para acidez libre propuestos por distintas normas; obsérvese que se han hecho trabajos importantes para lograr propuestas de parámetros de los distintos tipos de abejas del género *Meliponini*, ya que en cada tipo de abeja varía de forma considerable la acidez de la miel (Vit et al., 2004; 2006).

Tabla 13: Comparación de Acidez Libre en distintas normas

Normas	Acidez Libre (meEq. H⁺ por Kg de miel)		
Norma Salvadoreña	50 mEq		
Codex alimentarius	50 mEq		
Norma Mexicana	40 mEq		
Norma Brasileña	40 mEq		
Propuesta para <i>Meliponini</i>*	70 mEq (Melipona)	85 mEq (Scaptotrigona)	75 mEq (Trigona)

*En el caso de acidez libre, Vit et al., (2004), proponen diferenciar por cada tipo de abeja.

Es necesario señalar, como se observa en la Tabla 12, que el pH en el que se obtuvieron los puntos de equivalencia varía incluso en las mieles del mismo tipo de abeja. Este hecho en ningún momento se debe tomar a la ligera, ya que la norma salvadoreña y las normas internacionales proponen para la determinación de la acidez el método oficial 962.19 de la AOAC. Este método plantea hacer una adición de sosa 0.05M hasta llegar a un pH de 8.5, agregar un exceso de la misma y luego hacer una retrovaloración con HCl 0.05M hasta llegar a un pH de 8.30; luego se calcula el valor de la acidez libre por medio de la valoración con sosa (pH= 8.50) y la acidez láctica con la retrovaloración (pH = 8.30).

Al observar los valores del pH en que se obtuvieron los puntos de equivalencia se puede notar que ninguno de ellos coincide con los valores planteados en el método sugerido en la norma oficial, por tanto, es muy probable que en las mediciones en las que se emplea dicho método, se cometa un error sistemático en la determinación de acidez libre y acidez láctica, ya que los valores de pH en los que se alcanza el punto de equivalencia, en la mayoría de los casos no corresponden con el método oficial. Sin embargo, este es un problema muy complejo, ya

que la miel es una mezcla de compuestos muy diversos, los cuales varían de acuerdo a la región, clima, tipo de vegetación, época del año, y tipo de abeja que la produce, entre otros (Acquarone et al., 2007). Por lo tanto las especies químicas que aportan protones a la miel e intervienen en los equilibrios de la valoración ácido-base, al estar en distintas concentraciones, y tener pKa's diferentes, dificultan considerablemente la homogenización de puntos finales de acidez libre y lactónica. Es posible también, al ver la pendiente de las curvas de neutralización de las mieles que la cinética de neutralización de las lactonas sea lenta (ver Figura 14); sin embargo este es un supuesto con base en la forma de las gráficas, que se debe estudiar con mayor profundidad.

Otro detalle al que se tiene que poner atención, es que no todas las mieles tienen acidez lactónica. Por ejemplo, la muestra MM2 (ver figura 15), posee claramente un único punto de equivalencia. Esta situación no se puede observar al aplicar el método propuesto por las normas oficiales.

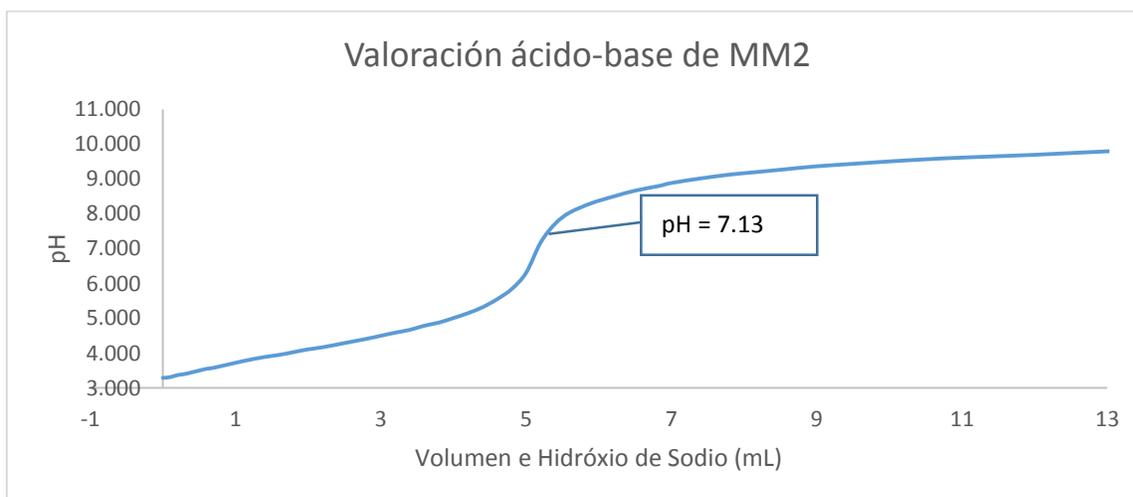


Figura 15: Valoración ácido-base de la muestra de miel MM2 con hidróxido de sodio 0.0402M

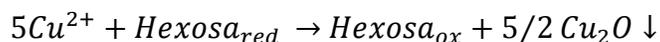
A pesar de que la química de las valoraciones ácido-base no es muy atractiva para algunos hoy en día, es necesario hacer un estudio más profundo que permita proponer un método alternativo que permita evitar el error sistemático y que sea lo suficientemente fácil y rápido para poder mecanizarlo y ser aplicable en laboratorios de control de calidad, como un análisis de rutina.

Es necesario un estudio exhaustivo que contemple realizar valoraciones ácido-base a un número representativo de muestras de tipos de miel; el resultado del tratamiento estadístico de estos datos permitiría ajustar el valor de pH de los puntos finales de las valoraciones para un género o tipo de miel, considerando factores como, región, clima, época del año, vegetación, etc.

Para finalizar, se debe considerar un estudio similar para el estudio de mieles de abejas sin aguijón y de esa manera aportar a su caracterización fisicoquímica y fomentar su consumo y comercialización.

5.1.4 AZÚCARES REDUCTORES

Para la determinación de azúcares reductores en la miel, se empleó la valoración de Fehling, que consiste en adicionar una solución de miel a una alícuota de la mezcla de reactivos de Fehling (Sulfato de Cobre y Tartratos). Conociendo la estequiometría de la reacción con hexosas reductoras, la valoración se siguió de manera potenciométrica, por medio de un electrodo de cobre (alambre de cobre), y un electrodo de referencia (Ag/AgCl), según el procedimiento por Preza de la Vega (2007), que es una adaptación al método de Lane y Eynon (AOAC, 2005). Las hexosas reductoras en su mayoría son glucosa y fructosa, pero también pueden encontrarse en menor proporción maltosa y manosa (White y Doner, 1980). En términos muy generales la reacción de las hexosas reductoras con el ion cúprico es la siguiente:



El sulfato de cobre utilizado para la determinación de azúcares reductores fue previamente valorado con EDTA, y la concentración encontrado fue de 0.2403M. Una vez obtenida la concentración de la solución de cobre se procede a realizar la determinación de azúcares reductores.

Por ejemplo, para la muestra de miel MM3, se preparó una solución con 0.5254g que se diluyeron en 100.0 mL. Luego, en un vaso de precipitados se agregaron 5.0 mL de la solución de Sulfato de Cobre 0.2403M (Fehling A) y 5.0 mL solución de Tartratos 1.25 M en hidróxido de sodio 2.5M (Fehling B), y se valoró con la solución de miel preparada. La

valoración se siguió de manera potenciométrica, y la curva potenciométrica obtenida se presenta en la Figura 16.

Para determinar el potencial electroquímico en el punto de equivalencia, a partir de la curva de titulación, se toma en cuenta la siguiente Ecuación 3b.

$$E_{eq} = E_{Cu(II)} + \frac{5\Delta E}{6} = E_{Az.Red.} - \frac{\Delta E}{6} \quad (\text{Ecuación 3b})$$

Es decir, el punto de equivalencia se encuentra a 5/6 del potencial condicional del ion cúprico o a 1/6 del potencial condicional del azúcar reductor, en la zona logarítmica de la curva de valoración.

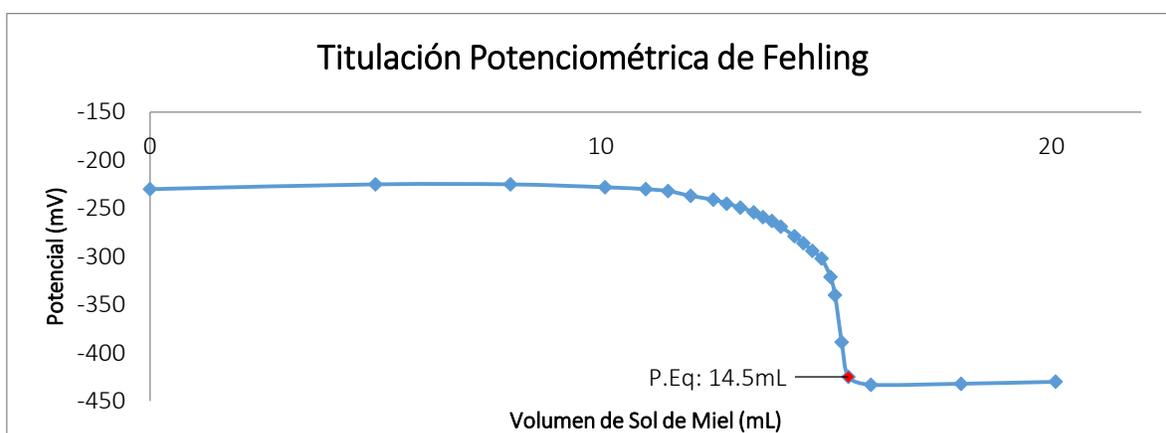


Figura 16: Curva de Valoración Potenciométrica de solución de miel MM3 con reactivo de Fehling.

Para hacer una ilustración de los cálculos necesarios, se toma la muestra de miel MM3. Su punto de equivalencia se encuentra a los 14.5 mL de solución de miel. Para encontrar el porcentaje de azúcares reductores se realizó el cálculo siguiente:

En el punto de equivalencia:

$$\begin{aligned}
 \text{mmoles de } Cu_{in}^{2+} &= \left(\frac{1}{5}\right) \text{mmoles de } Az.Red_{p.eq} \\
 \text{mmoles de } Cu_{p.eq}^{2+} &= \left(5.0 \text{ mL} * \frac{0.2403 \text{ mmol}}{\text{mL}}\right) = 1.2015 \text{ mmol} \\
 \text{mmoles de } Az.Red_{p.eq} &= 1.2015 \text{ mmol} * \left(\frac{1}{5}\right) = 0.2403 \text{ mmol} \\
 \text{masa } Az.Red (g) &= 0.2403 \text{ mmol} * (180 \text{ mg}/1 \text{ mmol}) = 43.25 \text{ mg} = 0.04325 \text{ g} \\
 \text{masa miel (g)} &= 14.5 \text{ mL} * (0.5254 \text{ g}/100 \text{ mL}) = 0.0762 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Para expresarlos en porcentaje:

$$\% \text{ Az. Red}_{\text{miel}} = (\text{masa Az. Red} / \text{masa miel}) * 100$$

$$\% \text{ Az. Red}_{\text{miel}} = (0.04325\text{g} / 0.0762\text{g}) * 100$$

$$\% \text{ Az. Red}_{\text{miel}} = 56.8\%$$

De igual manera se hicieron los cálculos para la valoración de Fehling de las muestras de miel restantes. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14: Resultado del Porcentaje de Azúcares Reductores.

Muestra	Masa de Miel diluida en 100mL (g)	Volumen agregado de Solución de Miel (mL)	Porcentaje de Azúcares Reductores en Miel
MA1	0.5492	12.6	62.5
MA2	0.5995	11.1	65.0
MA3	0.5293	12.6	64.9
MA4	0.5995	11.2	65.4
MA5	0.3059	26.1	54.2
MA6	0.5016	13.3	64.8
MM1	0.5824	12.35	50.4
MM2	0.5234	16.4	60.1
MM3	0.5254	14.5	56.8
MM4	0.6129	12.95	54.5
MM5	0.5717	15.35	49.3
Promedio MA			62.8 ± 4.3
Promedio MM			54.2 ± 4.5

De las mieles de abejas del género Apis estudiadas, todas excepto la muestra MA5 contienen azúcares reductores en una cantidad superior a los límites de la norma salvadoreña. Se puede considerar que cualquier miel de abeja Apis que se encuentre bajo este límite, posiblemente ha sido almacenada en condiciones inadecuadas o ha sido mezclada con otra sustancia; sin embargo, se notará tal como se describe en la Tabla 5, la muestra MA5 es una miel comercial mexicana, y en su viñeta no se dan detalles de origen ni cosecha. Las demás mieles de Apis

(MA) tienen valores superiores a los límites propuestos en las diferentes normas, como se presenta en la Tabla 15.

Tabla 15: Comparación del Porcentaje de Azúcares Reductores en distintas normas.

Normas	% de Az. Reductores mínimo
Norma Salvadoreña	60%
Codex alimentarius	60%
Norma Mexicana	63.88%
Propuesta para Meliponinas *	50%

*(Vit et al., 2004)

En el caso de las mieles de las abejas precolombinas se tienen estudios en Latinoamérica sobre el contenido de azúcares reductores y El Salvador, no es la excepción. Alarcón e Ibañez (2008), reportan porcentajes de azúcares reductores de alrededor de 71.9% y 78.7% para las mieles de *Melipona Becheei* y de 59.13% y 60.55% para las mieles de *Tetragonisca Angustula* estudiadas en municipios del norte del país. Sin embargo, si tomamos en cuenta la propuesta de Vit. et. al. (2004), en la Tabla 15, podríamos mencionar que todas las mieles de abejas sin aguijón tienen porcentajes que aún se pueden considerar altos, y por lo tanto recomendados para su consumo.

Con respecto a la detección del punto de equivalencia de la titulación, se ha realizado a partir de la elaboración de la curva potenciométrica, ya que se conoce la estequiometría de la reacción. Esto permite eliminar posibles errores del analista en torno a la observación del viraje del color del indicador azul de metileno, según lo plantea la metodología clásica propuesta en la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja. El método colorimétrico tiene dificultades considerables con respecto a la percepción visual, ya que el viraje que se sigue es de azul a incoloro y la mezcla de las soluciones de Fehling es de color azul además de la turbiedad nada despreciable de la solución causada por el burbujeo constante provocado por la ebullición en el seno de la solución y las partículas de óxido cuproso producidas como resultado de la reducción de Cu^{2+} .

La cantidad de azúcares reductores es uno de los parámetros más importantes en mieles, por lo que se debe fomentar que las mieles ofrecidas en el mercado reporten en su viñeta ésta y otra información al consumidor como una garantía de un proceso de producción óptimo.

5.1.5 FRUCTOSA

Para la determinación de la fructosa, como se describe con más detalle en la parte experimental (ver página 46), se prepararon soluciones de cada muestra de miel de aproximadamente 1.0 g en 10.0 mL de agua desionizada, además de 10.0 mL de una solución de fructosa patrón de 4.53 mg.mL⁻¹, también preparada con agua desionizada. Se utilizó el método de adiciones patrón y la técnica de polarografía diferencial de impulsos empleando CaCl₂ 1.0 M como medio. Para el caso de la miel MA5, después de seguir el procedimiento descrito, el polarograma obtenido se muestra en la Figura 17 como ejemplo.

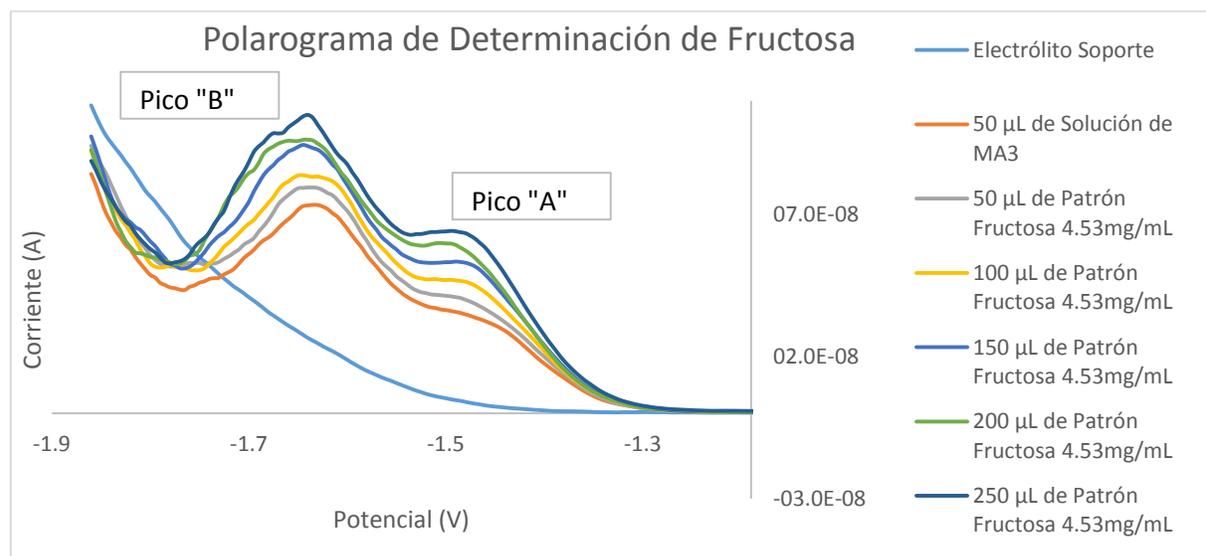


Figura 17: Polarograma de adiciones de solución patrón de fructosa a la muestra de miel MA3. Electrólito soporte: CaCl₂ 1.0M, solvente: agua desionizada, velocidad del barrido: 5.0mV.s⁻¹.

Como se observa en la Figura 17, la fructosa presenta dos señales de reducción en el intervalo de potencial estudiado (picos “A” y “B”). En las condiciones en que se realizó el experimento, el pico “A” está mejor definido, y se puede notar más fácilmente su aumento

directamente proporcional a la concentración de fructosa que con el pico “B”. Por esa razón, para efectos de cuantificación se estudió la variación en la corriente del pico “A”, al hacer el análisis de regresión lineal en dicha señal (ver Figura 18), se observó una buena correlación y por lo tanto se reafirma que es una señal que corresponde a una corriente de difusión, tal y como lo plantean Gazcón (2012) y Preza de la Vega (2007).

Para la elaboración de la curva de adiciones patrón, se graficó la corriente medida en pico “A” contra la cantidad de fructosa en la alícuota de la solución de la muestra de miel y con cada adición de patrón (expresado en mg). Por ejemplo, para la muestra de miel MA3, se realizó una solución de 1.0948g en 10.0 mL de agua desionizada, de la cual se agregó una alícuota de 50 μL a la celda electroquímica, trazándose el polarograma correspondiente; de igual manera se obtuvieron los polarogramas, para adiciones de 50 μL de solución de fructosa patrón 4.53mgmL⁻¹ a la celda. Cada adición contenía:

mg de fructosa por adición de 50 μL de solución patrón :

$$50\mu\text{L} \times \frac{1\text{mL}}{1000\mu\text{L}} \times \frac{4.53\text{mg}}{\text{mL}} = 0.2265\text{mg de fructosa}$$

La cantidad de fructosa en cada adición se gráfica contra la corriente medida correspondiente, obteniéndose el esquema presentado en la Figura 18.

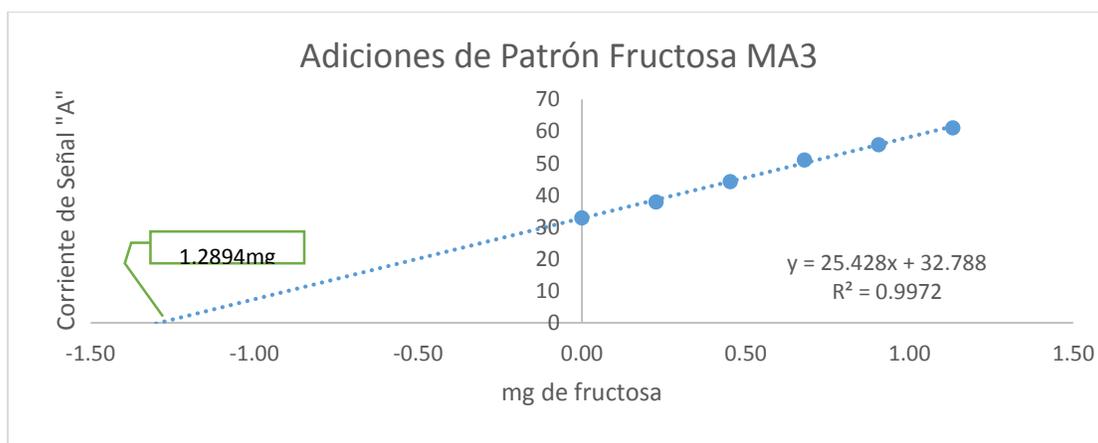


Figura 18: Aplicación del método de adiciones patrón para determinar la concentración de fructosa en la muestra de miel MA3.

La cantidad de fructosa presente en la alícuota de muestra de miel se calcula cuando la línea se intersecta con las ordenadas. Este dato se puede obtener directamente del gráfico o por medio de la ecuación de regresión lineal, es decir:

$$\begin{aligned}y &= 25.428x + 32.788 \\ \text{Si } y &= 0, \quad (\text{intersección con las ordenadas}) \\ 25.428x &= -32.788 \\ x &= -\frac{32.788}{25.428} = -1.2894 \\ \text{masa de fructosa (mg)} &= 1.2894\text{mg} \\ (\text{en alícuota de } 50\mu\text{L de solución de miel})\end{aligned}$$

Para expresar la respuesta en % de fructosa en la miel se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

$$\text{Masa de miel en solución} = 1.0948 \text{ g}$$

$$\text{Volumen de solución de miel} = 10 \text{ mL}$$

$$\text{Volumen de Alícuota de miel adicionada} = 50 \mu\text{L}$$

$$\begin{aligned}\text{Masa de miel en alícuota} &= 50 \times 10^{-3} \text{ mL} * (0.10948 \text{ g mL}^{-1}) \\ &= 5.474 \times 10^{-3} \text{ g} = 5.474 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\text{Masa de Fructosa en alícuota (mg)} = 1.2894 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ de Fruc. en miel} &= (\text{Masa de Fructosa alícuota} / \text{Masa de miel en alícuota}) \times 100 \\ &= (1.2894 \text{ mg} / 5.474 \text{ mg}) \times 100 \\ \% \text{ de Fruc. en miel} &= 23.55 \%\end{aligned}$$

Repitiendo el procedimiento anterior para las demás muestras se obtuvieron resultados presentados en la Tabla 16.

Tabla 16: Resultados de la determinación polarográfica de fructosa en muestras de miel.

Muestra	Coef. de Determinación (r^2)	Ec. de Reg. Lineal	% Fructosa en Miel
MA1	$r^2 = 0.9823$	$y = 23.495x + 36.445$	27.3
MA2	$r^2 = 0.9898$	$y = 24.888x + 39.203$	27.7
MA3	$r^2 = 0.9972$	$y = 25.428x + 32.788$	23.6
MA4	$r^2 = 0.9996$	$y = 27.105x + 49.498$	35.2
MA5	$r^2 = 0.9994$	$y = 25.254x + 31.824$	23.5
MA6	$r^2 = 0.9971$	$160.07x + 95.143$	20.5
MM1	$r^2 = 0.9974$	$y = 26.867x + 24.053$	15.7
MM2	$r^2 = 0.9988$	$y = 27.014x + 20.88$	15.0
MM3	$r^2 = 0.9997$	$y = 29.49x + 31.486$	21.4
MM4	$r^2 = 0.9988$	$y = 26.769x + 7.5358$	5.2
MM5	$r^2 = 0.9997$	$y = 36.654x + 39.374$	20.5
Promedio MA			26.3 ± 5.1
Promedio MM			15.6 ± 6.4

A pesar de que la Norma Salvadoreña no propone el porcentaje de fructosa como una medida del control de calidad en las mieles, en este estudio se consideró que sí es importante la realización de dicha medición ya que la fructosa es el carbohidrato con mayor poder edulcorante (Sarría, 2012), por lo tanto, la cantidad presente en una muestra de miel da una idea de que tan dulce es ésta.

De los resultados presentados en la Tabla 16 se puede observar, claramente, que las mieles de abeja *Apis* tienen un porcentaje de fructosa más alto que las mieles de las abejas del género de las *Meliponini*. El resultado es el esperado, ya que como se puede observar en la Tabla 14, las mieles de abejas precolombinas tienen un porcentaje de azúcares reductores más bajo que las mieles de *Apis*. Sin embargo, se puede notar que la cantidad de fructosa encontrada en este tipo de mieles oscila en un intervalo amplio (desviación estándar = 6.4) y no se observa un comportamiento uniforme. Es necesario hacer un análisis más profundo de la cantidad de fructosa y otros monosacáridos importantes en este tipo de mieles para poder dar una idea más clara de los resultados esperados.

Para finalizar, se considera que el método polarográfico utilizado en este estudio es aplicable al contexto salvadoreño, y se propone que se incluya en la Norma Salvadoreña de Miel. Además de que la manipulación de la muestra es mínima, los costos y el tiempo de análisis también es menor que comparado con otro tipo de técnicas para la determinación de fructosa.

5.1.6 HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

Al igual que la fructosa, la determinación de Hidroximetilfurfural (HMF) se hizo a través de polarografía diferencial de impulsos y el método de adiciones estándar. Ya que el HMF no es un componente natural de la miel (se produce con la exposición al calor y a luz), se encuentra en mucho menor cantidad y se expresa en mg HMF.kg⁻¹ de miel (ppm). Por lo tanto, para la cuantificación de esta sustancia, se prepara una solución de miel más concentrada que en el análisis de fructosa. Por ejemplo, para la muestra de miel MA5, se preparó una solución de 10.0 mL pesando 2.4939 g de miel, y se siguió el procedimiento previamente descrito (ver página 36), obteniéndose el siguiente polarograma:

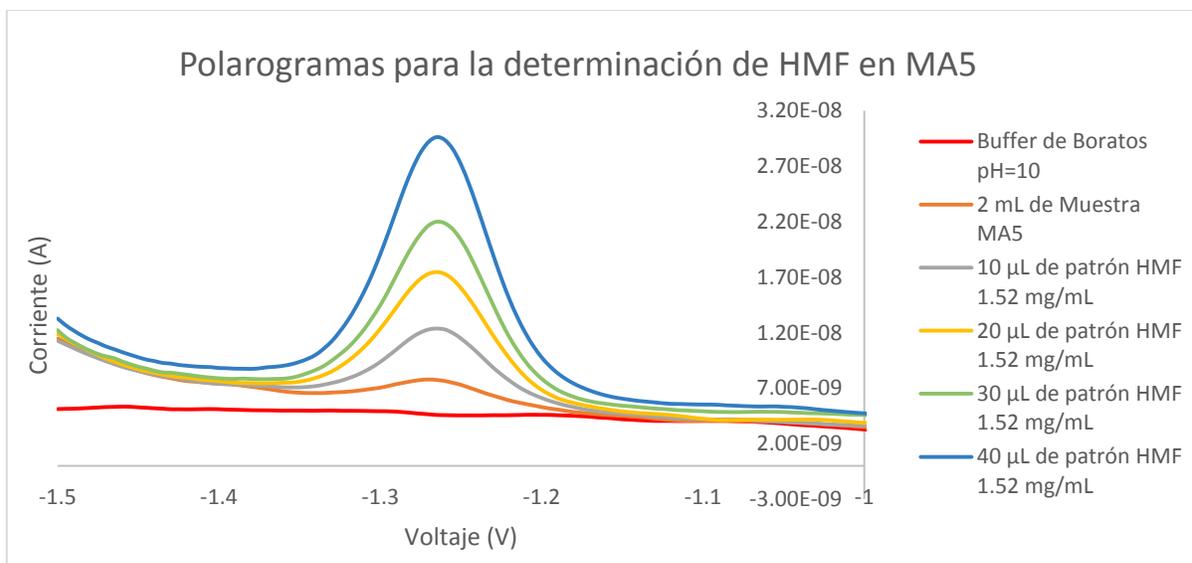


Figura 19: Polarograma de adiciones de solución patrón de HMF a la muestra de miel MA5. Electrólito soporte: Buffer de Boratos pH=10, solvente: agua desionizada, velocidad del barrido: 5.0mV.s⁻¹.

Se hicieron adiciones de 10 μ L de solución patrón de HMF a la alícuota de 2.0 mL de solución de miel en la celda electroquímica. Considerando que la concentración del patrón de HMF que se preparó fue de 1.52mg.mL⁻¹; cada adición de solución patrón contenía 0.0152 mg de HMF. Así, estos valores se presentan en una gráfica contra la corriente límite medida en el pico correspondiente para cada adición del polarograma anterior, obteniéndose la curva de adiciones patrón, como la que se muestra en el ejemplo de la Figura 20.

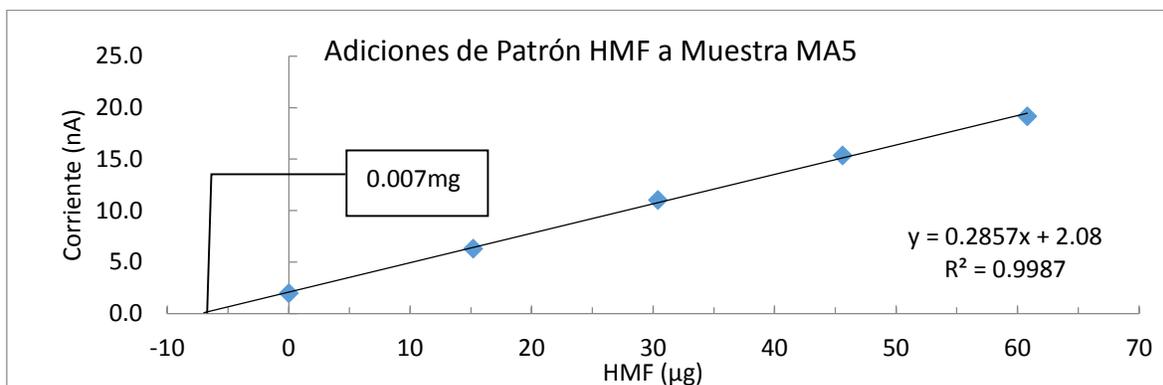


Figura 20: Curva de Adiciones Estándar de HMF para la muestra de miel MA5.

Como se observa en la gráfica de adiciones estándar, se obtiene el resultado en mg de HMF presentes en la alícuota de la solución de miel, para obtener el resultado en mg de HMF.kg⁻¹ de miel, tal y como lo sugiere la Norma Salvadoreña se realiza el siguiente procedimiento:

$$\begin{aligned}
 \text{Masa de miel en solución} &= 2.4939 \text{ g} \\
 \text{Volumen de solución de miel} &= 10.0 \text{ mL} \\
 \text{Volumen de Alícuota de miel} &= 2.0 \text{ mL} \\
 \text{Masa de HMF en Alícuota} &= 0.007 \text{ mg} \\
 \text{Masa de miel en alícuota} &= 2.4939 \text{ g} \times 2.0 \text{ mL (alícuota)} / 10.0 \text{ mL (solución)} \\
 \text{Masa de miel en alícuota} &= 0.4988 \text{ g} = 0.0004988 \text{ kg} \\
 \text{mg HMF/kg de miel} &= 0.007 \text{ mg de HMF} / 0.0004988 \text{ kg de miel} \\
 \text{mg} \frac{\text{HMF}}{\text{kg}} \text{ de miel} &= 14.03 \text{ (ppm)}
 \end{aligned}$$

De la misma manera se procedió para las demás muestras de miel, y se obtuvieron los resultados contenidos en la Tabla 17.

Tabla 17: Resultados de la determinación polarográfica de HMF.

Muestra	Coef. de Determinación (r^2)	Ec. de Reg. Lineal	mgHMF.kg ⁻¹ miel (ppm)
MA1	$r^2 = 0.9993$	$y = 513.4x + 29.113$	70.51
MA2	$r^2 = 0.9915$	$y = 420.09x + 23.905$	113.73
MA3	$r^2 = 1$	$y = 1548.6x + 49.1$	61.10
MA4	$r^2 = 0.9947$	$y = 1469x - 5.4524$	N.D.
MA5	$r^2 = 0.9987$	$y = 285.7x + 2.08$	14.03
MA6	$r^2 = 0.9904$	$y = 411.19x + 11.188$	51.77
MM1	$r^2 = 0.9975$	$y = 606.6x + 2.6372$	16.90
MM2	$r^2 = 0.9949$	$y = 511.98x + 0.5889$	4.52
MM3	$r^2 = 0.9986$	$y = 636.96x + 1.994$	11.20
MM4	$r^2 = 0.997$	$y = 639.4x + 7.2743$	20.02
MM5	$r^2 = 0.9999$	$y = 1585.6x + 353.51$	426.18
Promedio MA			62.23
Promedio MM			95.76

La Norma Salvadoreña plantea el parámetro de HMF como una medición del deterioro de la miel, ya que esta sustancia se forma en condiciones no adecuadas de almacenamiento. Por lo tanto, una baja concentración o la ausencia de HMF en la miel, es indicador de una buena cadena de producción y almacenamiento. Sin embargo en países con clima tropical como es el caso nuestro, la temperatura es una variable que se sale del alcance de los apicultores, y la Norma Salvadoreña tiene un límite superior para la miel proveniente de este tipo de países. En la Tabla 18 se presentan máximos de HMF requeridos en distintas normativas.

Tabla 18: Comparación del máximo de Hidroximetilfurfural en distintas normas.

Normas	mg HMF.kg ⁻¹ miel
Norma Salvadoreña¹	40
Codex alimentarius	40
Norma Mexicana²	40
Propuesta para Meliponini³	40

1) Mielles provenientes de países tropicales, 80 mg/kg. 2) Mielles con más de 6 meses desde su cosecha, 80 mg/kg. 3) Propuesta de Vit et al. (2004).

Se observa que de las mieles de *Apis*, sólo la miel MA2, proveniente de El Salvador, tiene una cantidad de HMF mayor a la tolerada en países con climas tropicales. Sin embargo, es oportuno decir que dicha miel tenía más de diez meses desde su cosecha al tiempo en que se analizó y por lo tanto dicho resultado está dentro de lo esperado. En cuanto a las mieles de abejas *Meliponini*, la muestra MM5 tiene una cantidad de HMF elevada; dicha miel es proveniente del Estado de Campeche, México, que está situado en la Península de Yucatán, un territorio costero y conocido por su clima templado-caluroso. Es posible que durante su traslado al lugar de análisis no se haya conservado de la mejor forma.

Es también importante resaltar el caso de la miel MA4, en la cual, la cantidad de HMF está por debajo del límite de detección del método utilizado. Esta miel fue cosechada a inicios del año 2013 y fue conservada en el laboratorio en buenas condiciones hasta el momento de su análisis, por un período aproximado de seis meses.

Ya que el HMF, es un producto de la degradación de las azúcares, no es un componente natural en ninguna miel, ya sea ésta de *Apis* o *Meliponini*. Por lo tanto es adecuado fijar el mismo valor máximo para todos los tipos de miel. Es más importante aún, fomentar en los apicultores y meliponicultores, los intermediarios y los consumidores, los buenos hábitos de almacenamiento y conservación de la miel, y de esta manera poder conservar este producto en mejor estado.

El método polarográfico utilizado en este estudio para la determinación de HMF, desarrollado por Reyes Salas (2003), es una excelente alternativa al método oficial AOAC 980.23. La metodología propuesta por las normas oficiales tiene algunos inconvenientes desde el punto de vista analítico, tales como: ser una medición indirecta, alta manipulación de la muestra, medición a dos máximos de longitud de onda, entre otros. La alternativa electroquímica sin duda, solventa las limitantes previamente mencionadas del método oficial.

5.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS

5.2.1 ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL TRIYODURO CON REDUCTORES

Para poder realizar la determinación de la actividad antioxidante en propóleos, como primer paso, se establecieron las condiciones experimentales para cuantificar el triyoduro por medio de voltamperometría. La celda electroquímica utilizada estaba compuesta por un microelectrodo de disco giratorio de platino como electrodo de trabajo, un electrodo de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia. Se evaluó la onda voltamperométrica producida por el sistema I_3^-/I^- , específicamente la corriente producida de reducción del I_3^- . Posteriormente, se hicieron titulaciones con reductores considerados como antioxidantes (ácido ascórbico y quercetina), y a definir las condiciones para evitar la posible reacción del triyoduro con glucosa. Finalmente se aplicó el método propuesto para la cuantificación de actividad antioxidante a extractos hidroetánicos de propóleos (expresado en meq o, mejor dicho, en mmol de ácido ascórbico).

5.2.1.1 ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE LA REDUCCIÓN DEL TRIYODURO.

Se evaluó la corriente de reducción del complejo triyoduro a yoduros. Como se estableció previamente, se escogió como electrólito soporte el $LiNO_3$ por dos motivos: el primero, su alta solubilidad en etanol, y el segundo, que la sal no posee aniones con potenciales de reducción cerca del potencial del sistema I_3^-/I^- . Haciendo esta consideración el medio que se preparó fue $LiNO_3$ 0.1M con una mezcla hidroetanólica 50-50 como solvente. Después de hacer una serie de barridos de potenciales al medio, se estableció el dominio electroactivo, desde los -900mV (barrera catódica) hasta los 1200 mV (barrera anódica), también se fijó la velocidad óptima de barrido a los 3mVs⁻¹.

Una vez establecidas las condiciones del experimento, se realizaron los voltamperogramas de una serie de adiciones de 50µL de solución de yodo en exceso de yoduros (I_3^-), a una concentración de 0.00731M, previamente estandarizada; con el objeto de identificar la onda

voltamperométrica correspondiente al sistema I_3^-/I^- , su potencial de media onda y definir si la corriente aumentaba de manera proporcional con la adición de I_3^- (corriente de difusión). En la Figura 21 se puede observar el voltamperograma correspondiente a las adiciones previamente descritas.

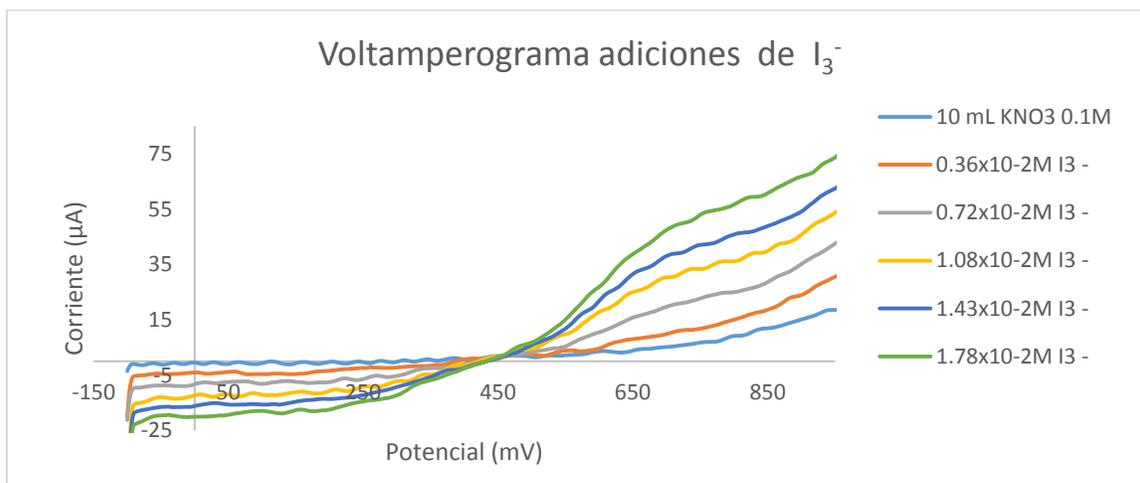


Figura 21: Voltamperograma de adiciones de solución patrón de I_3^- 0.00731M. Electrólito soporte: $LiNO_3$ 0.1M, solvente: mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad del barrido: 3.0 mVs⁻¹.

En las condiciones experimentales, se encontró que el potencial de media onda de la señal de reducción del sistema I_3^-/I^- está cerca de 560 mV (ver Figura 21). La corriente límite que corresponde a la reducción del I_3^- se encuentra en los alrededores de los 200µA (se observa que el sistema presenta una sobretensión). Con los valores de corriente límite de las señales de reducción de cada una de las adiciones de I_3^- y su respectiva concentración en la celda se elaboró una curva de calibración, para evaluar la relación lineal entre la corriente y la concentración (ver Figura 22).

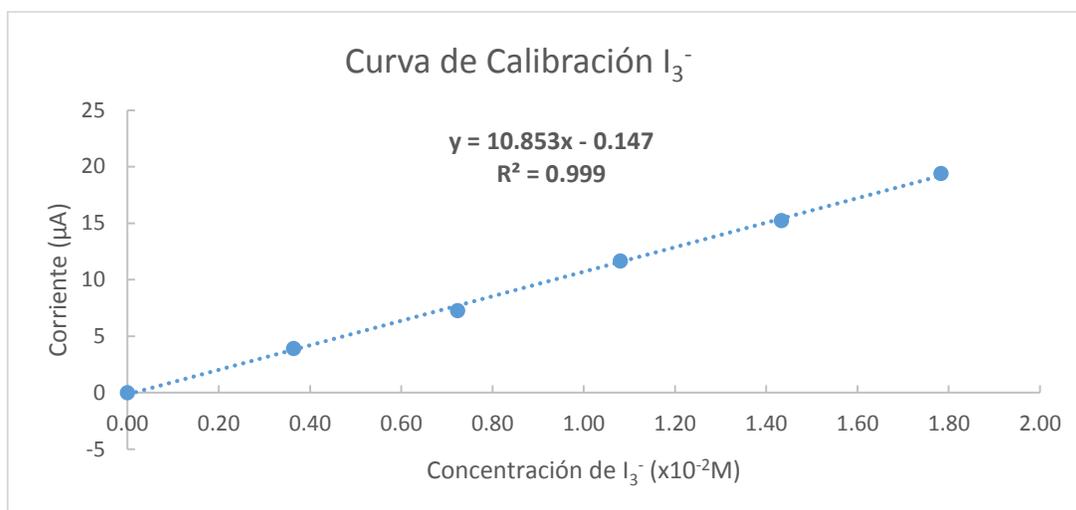


Figura 22: Curva de calibración de triyoduro. Corriente límite medida en 200mV.

Se observa que el coeficiente de determinación ($r^2= 0.999$) de la curva de calibración de triyoduro indica el carácter lineal del experimento. Podemos decir, entonces, que en las condiciones experimentales, se puede cuantificar el triyoduro en solución. Con el objetivo de caracterizar el método de cuantificación de triyoduro, se procede a calcular el límite de detección, y el límite de cuantificación de acuerdo a la ecuación 7 y a la ecuación 8 respectivamente (Miller y Miller, 2005).

$$\text{Límite de Detección} = Y_b + 3s_b \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

Y_b , es la señal analítica del blanco y

S_b es la desviación estándar de la señal analítica del blanco

En el caso particular de este experimento la señal analítica del blanco corresponde a la corriente ocasionada por el medio ($LiNO_3$ 0.1M en mezcla hidroetánica 50-50), que se conoce como corriente residual. El promedio y la desviación estándar de 5 corrientes residuales obtenidos de 5 voltamperogramas diferentes se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19: Corriente residual a 200mV de distintos experimentos de LiNO₃ en mezcla hidroetanólica 50-50.

Experimento	Corriente Residual (μA)
1	0.45
2	0.43
3	0.32
4	0.33
5	0.36
Promedio	0.38
Desviación Estándar	0.06

Aplicando la ecuación 7 a los datos presentados en la Tabla 19, se tiene lo siguiente:

$$\text{Límite de Detección} = Y_b + 3s_b$$

$$\text{Límite de Detección} = 0.38 + 3(0.06)$$

$$\text{Límite de Detección} = 0.56$$

Definimos entonces como el límite de detección de triyoduro en términos de corriente el valor de 0.56 μA. Para expresar el límite de detección en función de la concentración de triyoduro de la solución, se empleará la ecuación de lineal de la curva de calibración de triyoduro (Figura 22), donde la variable “x” corresponde a la concentración de triyoduro y la variable “y” corresponde a la corriente. Por lo tanto se procede a despejar la variable x:

$$y = 10.853x - 0.147$$

$$x = \frac{y + 0.147}{10.853}$$

$$x = \frac{0.56 + 0.147}{10.853}$$

$$x = 0.0651 = 6.51 \times 10^{-2} \text{M}$$

Por lo tanto se tiene que el límite de detección de triyoduro en solución es $6.51 \times 10^{-4} \text{M}$ (nótese que en la figura 22 los valores en el eje correspondiente a la concentración está multiplicado

por 1×10^{-2}). De igual manera se procedió a calcular el límite de cuantificación empleando la ecuación 11 a la corriente residual de los experimentos presentados en la Tabla 19.

$$\text{Límite de Cuantificación} = Y_b + 10s_b \quad (\text{Ecuación 8})$$

El límite de cuantificación y de detección de triyoduro del experimento realizado se presenta en la Tabla 20.

Tabla 20: Límite de detección y cuantificación de triyoduro.

Límite	Corriente (μA)	Concentración (M)
Detección	0.56	6.5×10^{-4}
Cuantificación	0.98	1.0×10^{-3}

5.2.1.2 ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE LA REDUCCIÓN DEL TRIYODURO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

Una vez se definieron las condiciones experimentales en las que el triyoduro se podía cuantificar de manera adecuada, se procedió a realizar valoraciones voltamperométricas con reductores que son conocidos como antioxidantes, el primero, ácido ascórbico.

Se conoce que la estequiometría de la reacción de triyoduro con ácido ascórbico es de 1:1.



Se preparó una solución de ácido ascórbico de aproximadamente 0.01M, y tomando en cuenta la estequiometría, se realizó la titulación voltamperométrica de 250 μL de solución de triyoduro a 0.00731M, haciendo adiciones de 50 μL de la solución de ácido ascórbico. El voltamperograma que resultó de la titulación se presenta en la Figura 23.

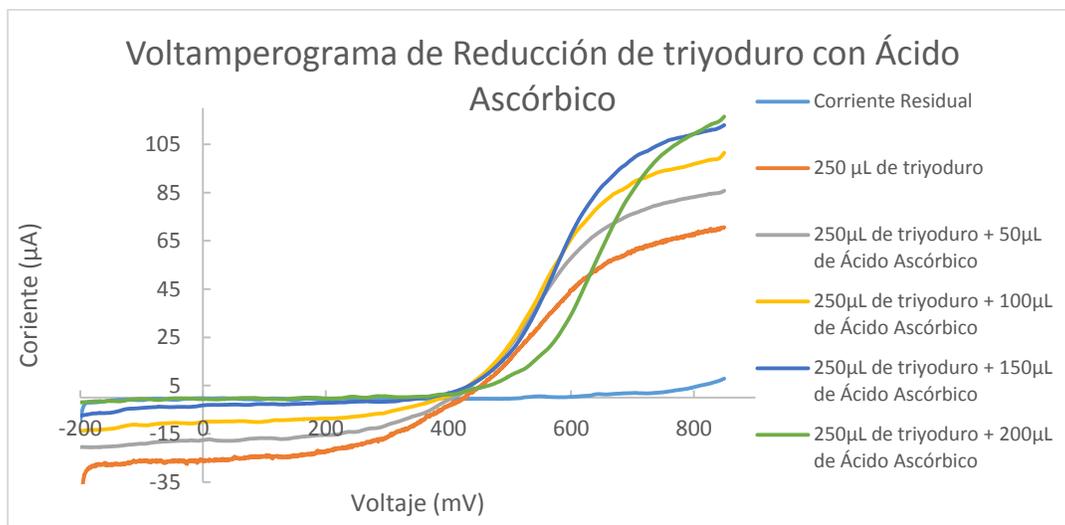


Figura 23: Voltamperograma de la titulación de ácido ascórbico con triyoduro 0.00731M. Electrólito soporte: LiNO_3 0.1M, solvente: mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad del barrido: 3.0mV.s⁻¹.

Tomando la corriente límite de la señal del triyoduro para cada adición de ácido ascórbico, a un potencial de 200mV se elaboró la curva de titulación voltamperométrica, que se encuentra representada en la Figura 24.

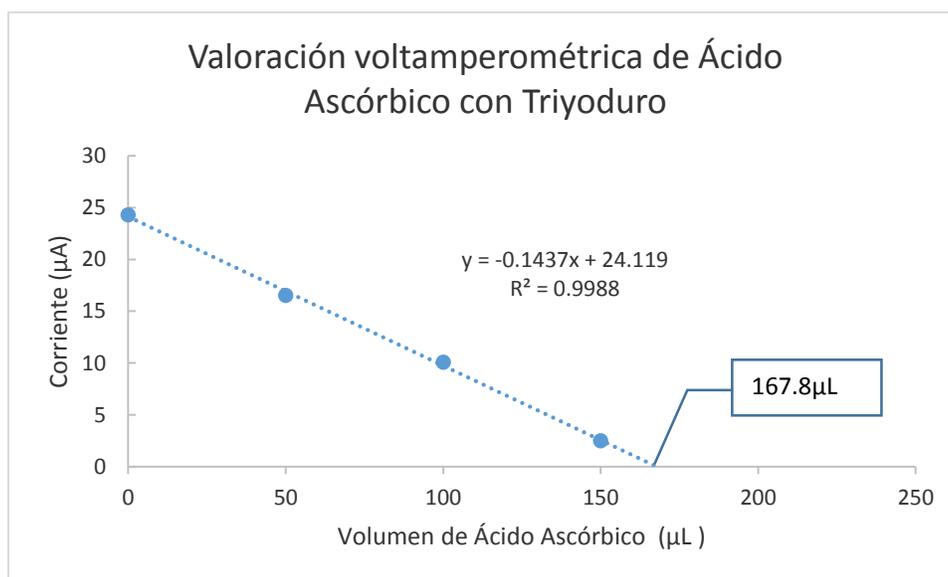


Figura 24: Titulación voltamperométrica de ácido ascórbico con triyoduro 0.00731M.

Conociendo el volumen de solución de ácido ascórbico, necesario para llegar al punto de equivalencia se puede calcular la concentración real del ácido ascórbico:

En el punto de equivalencia:

$$\mu\text{mol de } I_3^- = \mu\text{mol de a. ascórbico}$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (\mu\text{L de } I_3^-) * (\text{Conc. de } I_3^-)$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (250\mu\text{L de } I_3^-) * (0.00731\mu\text{mol}/\mu\text{L})$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = 1.828$$

$$\mu\text{mol de a. ascórbico} = 1.828$$

Concentración de solución de ácido ascórbico:

$$\text{Conc. de a. ascórbico} = \frac{\mu\text{mol de a. ascórbico}}{\mu\text{L a. ascórbico}}$$

$$\text{Conc. de a. ascórbico} = \frac{1.828 \mu\text{mol de a. ascórbico}}{167.8 \mu\text{L a. ascórbico}}$$

$$\text{Conc. de a. ascórbico} = 0.0109M$$

El ácido ascórbico se puede cuantificar con la aplicación de yodimetría voltamperométrica, ya que la señal analítica de cuantificación es la que pertenece a la reducción de triyoduro a yoduros. Esta titulación tiene dos aspectos muy importantes con respecto a su aplicación para la determinación de actividad antioxidante: la primera, es que el ácido ascórbico es un antioxidante muy común, lo que en cierta medida justifica su elección para evaluar la reactividad con triyoduro; el segundo, que la estequiometría de la reacción es de 1:1, y por lo tanto, una manera de expresar el contenido de antioxidantes podría ser en moles o milimoles de equivalentes de ácido ascórbico, ya que es muy común que los métodos de determinación de actividad antioxidante de una sustancia dada se expresen con respecto a un antioxidante conocido.

5.2.1.3 ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE LA REDUCCIÓN DEL TRIYODURO CON QUERCETINA

Se preparó una solución de quercetina previamente estandarizada de 0.0118M, para su posterior titulación voltamperométrica. A diferencia de la reacción de triyoduro con ácido ascórbico, no se conocía la estequiometría de la posible reacción entre triyoduro y quercetina, por lo que se procedió a calcular los coeficientes estequiométricos (a y b) de la reacción planteada a continuación:



De la misma forma que se realizó la titulación del ácido ascórbico, se procedió con la quercetina: se agregaron 250 μL de solución de triyoduro a 0.00731M y se hicieron adiciones de 20 o 10 μL de quercetina valorada. El voltamperograma resultado de la titulación se puede observar en la Figura 25.

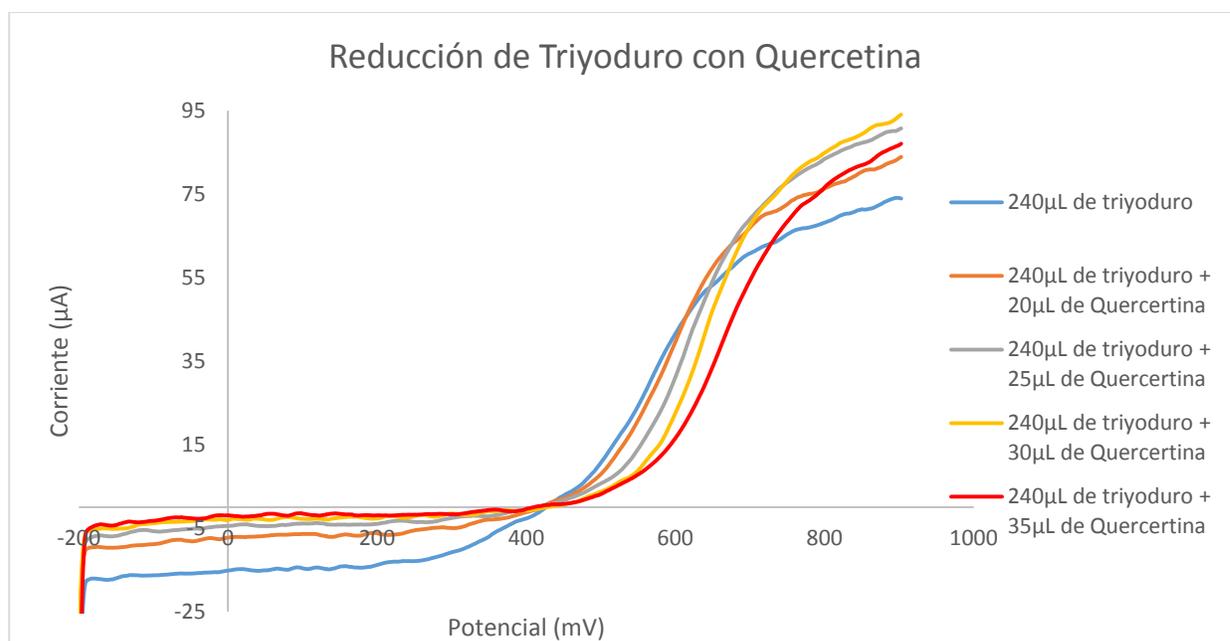


Figura 25: Voltamperograma de la titulación de quercetina 0.0118M con triyoduro 0.00731M. Electrólito soporte: LiNO_3 0.1M, solvente: mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad del barrido: 3.0mV.s.

Se puede observar claramente que la corriente límite correspondiente a la reducción del triyoduro disminuye a medida que se agrega solución de quercetina. El gráfico de la titulación voltamperométrica, con la corriente medida a 200mV, se puede observar en la Figura 26.

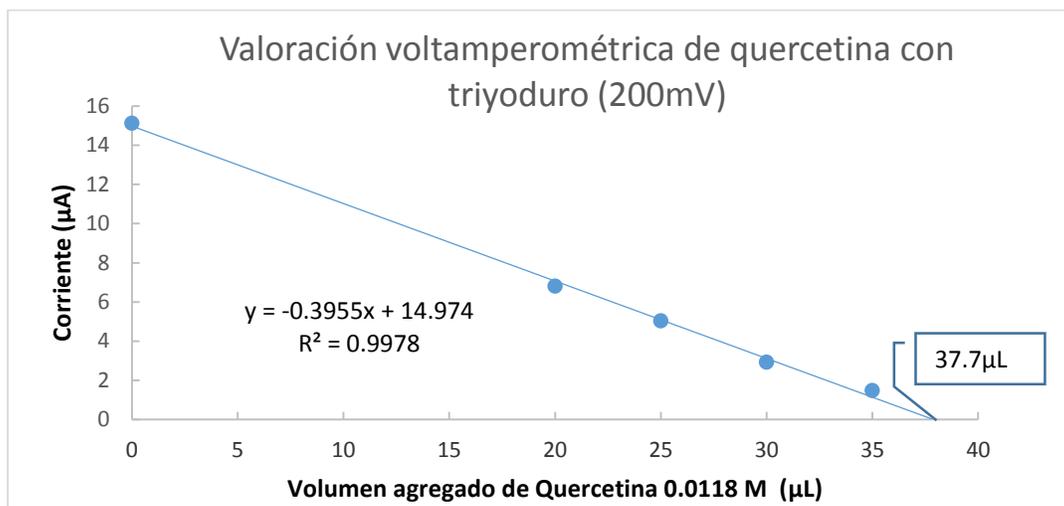


Figura 26: Valoración voltamperométrica de quercetina con triyoduro. Corriente Límite 200mV.

El coeficiente de determinación ($r^2 = 0.9978$) de la titulación, demuestra su carácter lineal. Para conocer la estequiometría de la reacción entre la quercetina y el triyoduro se procedió a hacer los cálculos siguientes:

Cantidad de I_3^- en la celda:

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (\mu\text{L de } I_3^-)(\text{conc. de } I_3^-)$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (240\mu\text{L})(0.0731 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{L}})$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = 1.75 \mu\text{mol}$$

Cantidad de Quercetina (Q) en la celda:

$$\mu\text{mol de } Q = (\mu\text{L de } Q)(\text{conc. de } Q)$$

$$\mu\text{mol de } Q = (37.7\mu\text{L})(0.0118 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{L}})$$

$$\mu\text{mol de } Q = 0.445 \mu\text{mol}$$

Para conocer los coeficientes estequiométricos (a y b) de la reacción entre la quercetina y el triyoduro se plantea la relación molar de la siguiente manera:

$$\frac{a}{b} = \frac{\mu\text{mol de } I_3^-}{\mu\text{mol de } Q}$$

$$\frac{a}{b} = \frac{1.75 \mu\text{mol}}{0.445 \mu\text{mol}}$$

$$\frac{a}{b} = 3.94$$

$$\frac{a}{b} \cong 4$$

De la relación de los coeficientes estequiométrica obtenida, se deduce que, $a = 4$ y $b = 1$.



Y como el sistema de yodo intercambia 2 electrones, se infiere que la oxidación de la quercetina consume 8 electrones.

5.2.1.4 ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE LA REDUCCIÓN DEL TRIYODURO CON GLUCOSA

Los azúcares reductores no se consideran especies antioxidantes ya que no inhiben el estrés oxidativo (Londoño, 2011). Por lo tanto, es necesario establecer las condiciones experimentales en las que el triyoduro no reaccione con estas especies. El triyoduro no reacciona con fructosa sin importar las condiciones; sin embargo, se ha reportado, que sí lo hace con glucosa en condiciones básicas con una estequiometría de 1 a 1 (Lothrop y Holmes, 1931; Cajori, 1922). Ya que el medio en el que se diseñó el experimento de cuantificación no es básico (LiNO_3 0.1M, mezcla hidroetanólica 50-50), se espera que la glucosa no reaccione con el triyoduro. Para comprobar la suposición anterior, se hizo un estudio voltamperométrico para determinar si la corriente de reducción producida por una solución de triyoduro disminuye con la adición de una solución de glucosa. En la Figura 27 se muestra

el voltamperograma correspondiente a 150 μL de una solución de triyoduro 0.00731M, y a la adición de 50 μL de glucosa 0.01M a la solución anterior, tomados cada uno con una diferencia de 30 minutos.

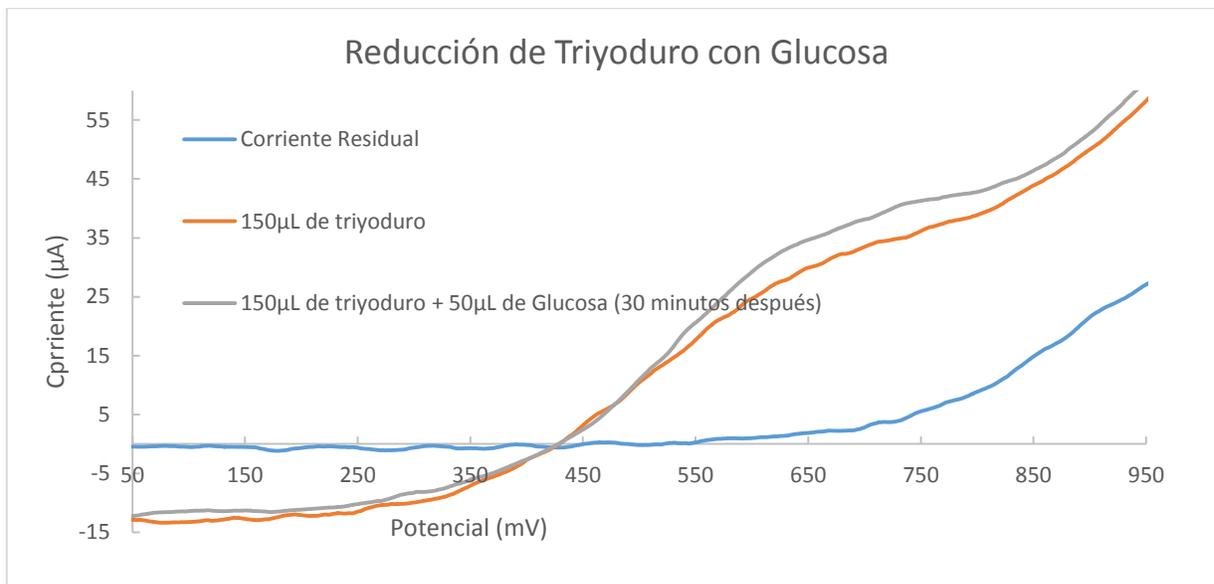


Figura 27: Voltamperograma de la mezcla de glucosa con triyoduro 0.00731M. Electrólito soporte: LiNO_3 0.1M, solvente: mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad del barrido: 3.0mV.s.

Se puede observar que la onda voltamperométrica correspondiente al triyoduro, si bien ha disminuido con la adición de glucosa, no lo ha hecho en la relación estequiométrica reportada, 1 mol de glucosa por 1 mol de triyoduro (Cajori, 1922). Además se debe tomar en cuenta que los voltamperogramas fueron tomados con una diferencia de tiempo de treinta minutos, y por lo tanto la cinética de reacción es lenta.

Se realizó un cronoamperograma de la mezcla de la solución de triyoduro y la solución de glucosa. La intensidad de corriente fue medida durante veinte minutos en el potencial donde se ha identificado la corriente límite de reducción del yoduro (200mV). El cronoamperograma se presenta en la Figura 28.

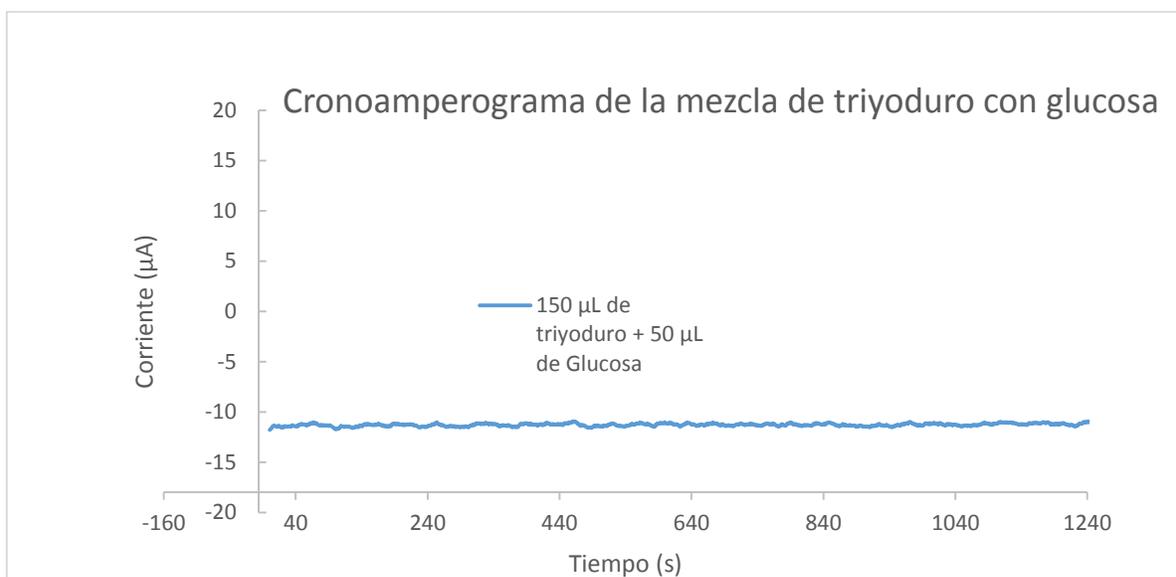


Figura 28: Cronoamperograma de una mezcla de 150 µL de solución de triyoduro 0.00731M y 50 µL de glucosa 0.01M. Potencial = 200mV.

Se puede observar que durante los primeros treinta minutos de contacto entre el triyoduro y la glucosa (Figura 27), la corriente límite correspondiente a la reducción del triyoduro tuvo una ligera variación que no corresponde a la estequiometría reportada en medio básico (Lothrop y Holmes, 1931). Sin embargo, como se observa en el cronoamperograma, en los veinte minutos de contacto posteriores, la corriente ya no varió (Figura 27), lo que indica que la reacción se detuvo. Por lo tanto, en presencia de un reductor que reaccione con triyoduro con una cinética rápida (antioxidantes), la glucosa no interferiría en la reacción.

5.2.2 EXTRACCIÓN DE PROPÓLEOS EN MEZCLA HIDRO-ETÁNOLICA

Se pesaron cerca de 3.0 g de cada propóleo y se hicieron cuatro extracciones con 10.0 mL de mezcla hidroetanólica 70-30 (v/v) cada una. Las primeras dos extracciones se mezclaron y llevaron al aforo en un balón volumétrico de 25.0 mL, denominándose EP₁. Con la segunda y tercera extracción se realizó un procedimiento similar, denominándose EP₂. De tal manera que para cada propóleo se tuvieron dos extractos: EP₁ y EP₂. El esquema de la extracción se presenta en la Figura 29.

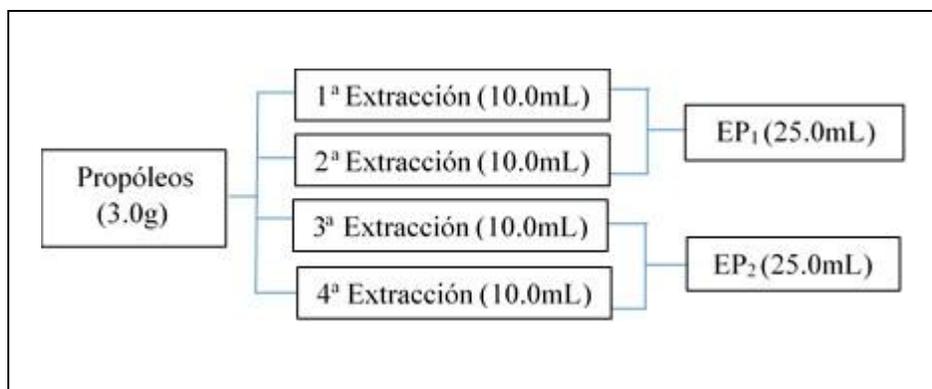


Figura 29: Esquema de extracción de Propóleos.

Por efectos prácticos, la cantidad de masa exacta de cada propóleo utilizada para cada proceso de extracción, se presenta junto a los resultados, en la Tabla 21.

5.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS

En las condiciones experimentales previamente establecidas, se realizaron titulaciones voltamperométricas con triyoduro para cada uno de los extractos de propóleo (EP). Se hicieron adiciones de alguno μL de EP a 250 μL de solución de triyoduro 0.00731M, haciendo un barrido de potencial para cada adición.

Por ejemplo, a cada uno de los dos extractos de la muestra del propóleo 3, EP3₁ y EP3₂, se le realizó una titulación voltamperométrica con triyoduro 0.00731M. En las Figuras 30 y 31 se muestran los voltamperogramas correspondientes a las titulaciones de EP3₁ y EP3₂, respectivamente.

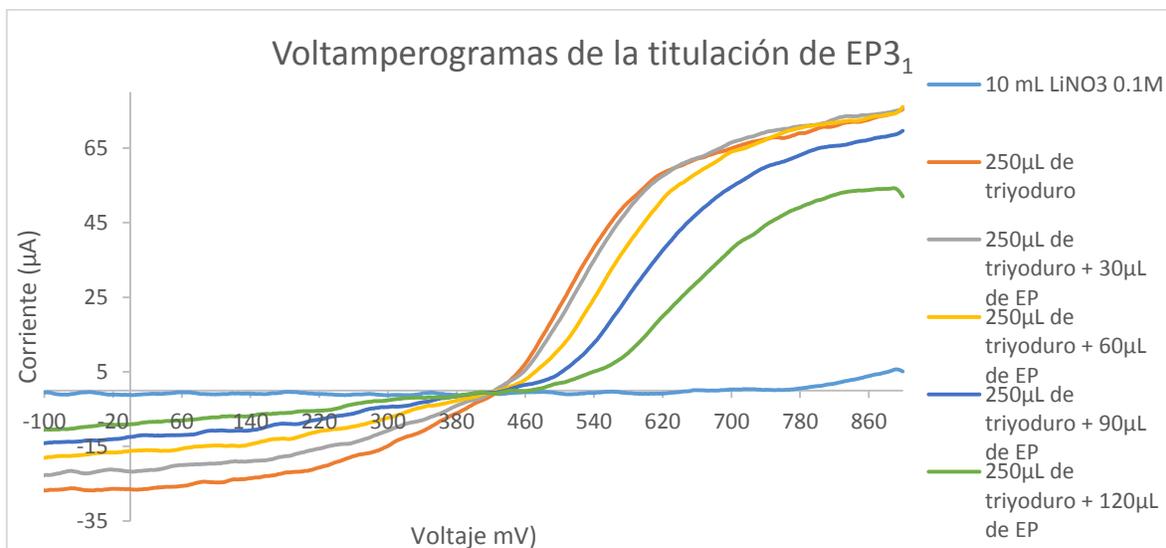


Figura 30: Voltamperograma de la titulación de EP₃₁ con triyoduro 0.00731M. Electrólito soporte: LiNO₃ 0.1M, solvente: mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad del barrido: 3.0mVs⁻¹.

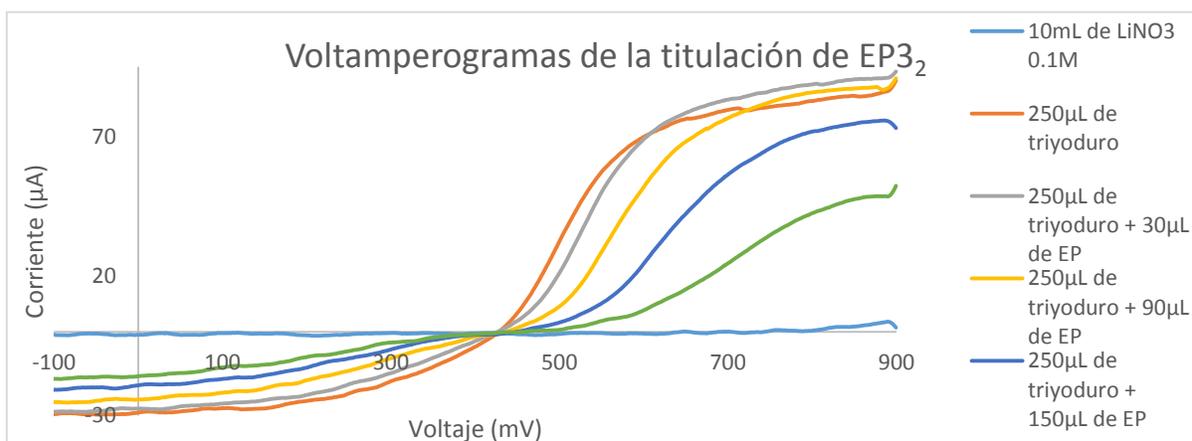


Figura 31: Voltamperograma de la titulación de EP₃₂ con triyoduro 0.00731M. Electrólito soporte: LiNO₃ 0.1M, solvente: mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad del barrido: 3.0mVs⁻¹.

Como se pueden observar en los voltamperogramas correspondientes a los extractos del propóleo 3, la corriente límite producida por la reducción del triyoduro (a un potencial de 200 mV), disminuyó conforme se le agregó el extracto de propóleo. El comportamiento, es a simple vista similar que con quercetina y ácido ascórbico. Se elaboraron los amperogramas

correspondientes a las titulaciones de EP3₁ y EP3₂, midiendo la corriente límite a un potencial de 200 mV, con el objeto de identificar el punto final de cada titulación (ver Figura 32 y Figura 33).

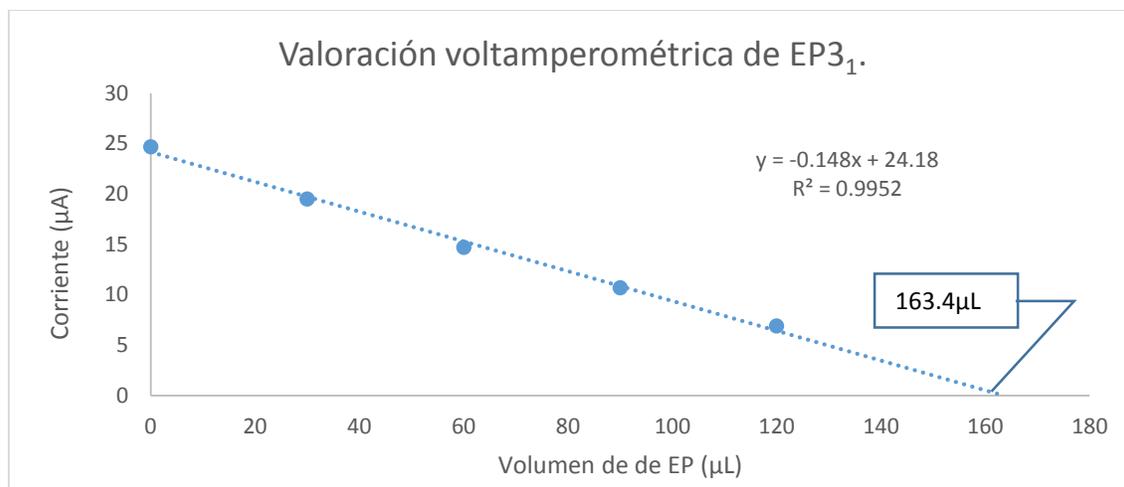


Figura 32: Valoración voltamperométrica de EP3₁ con triyoduro. Corriente Límite 200mV.

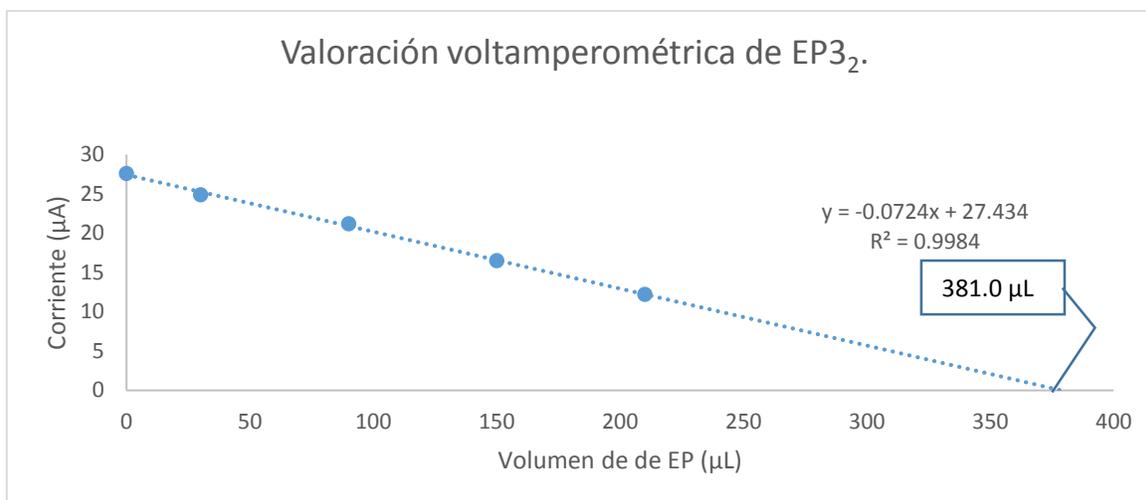


Figura 33: Valoración voltamperométrica de EP3₂ con triyoduro. Corriente Límite 200mV.

Ya se mencionó que algunos métodos de determinación de la actividad antioxidante de alguna sustancia o mezcla, expresan el resultado en función de un antioxidante conocido. El método ORAC, por ejemplo, expresa el contenido en función de miligramos equivalentes

de Trolox, que es un análogo de la vitamina E y el método de Folin- Ciocalteu expresa el contenido de antioxidantes en miligramos de equivalentes de ácido gálico, EAG.g⁻ de alimento (INTA, 2014). Se ha reportado también la capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico, utilizando el método FRAP (Palomino García, 2009). En ese sentido, los resultados de esta investigación se presentarán como milimoles equivalentes de ácido ascórbico (EAAs)¹, ya que convenientemente, la estequiometría entre la especie titulante, triyoduro, y el ácido ascórbico es de 1 a 1; además, el ácido ascórbico es una sustancia relativamente común, barata y que se puede conservar como sólido más fácilmente que otras.

Una vez determinados gráficamente los puntos de equivalencia de las titulaciones de cada extracto, se procedió a hacer el cálculo de la cantidad de antioxidantes expresados en función de ácido ascórbico para EP3₁:

Se calculó la cantidad de triyoduro agregado:

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (\text{conc de } I_3^-)(\mu\text{L de } I_3^-)$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (0.00731M)(250 \mu\text{L de } I_3^-)$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = 1.828 \mu\text{mol}$$

Si expresamos la cantidad de antioxidantes valorados en el extracto de propóleos (EP) en función de equivalentes de ácido ascórbico (EAAs), en el punto de equivalencia tenemos:

$$\mu\text{moles de } I_3^- = \mu\text{moles de EAAs (Antioxidantes)}$$

$$\mu\text{moles de EAAs (Antioxidantes)} = 1.828$$

$$\text{Conc. EAAs} = \frac{\mu\text{mol de EAAs (Antioxidantes)}}{\mu\text{L de EP en el punto de equivalencia}}$$

¹ El término “equivalentes de ácido ascórbico o EAAs” se refiere a todas las sustancias antioxidantes que se reducen en presencia del triyoduro, tal como lo hace el ácido ascórbico. No se debe confundir con el “número de equivalentes” de una solución, relacionado con la concentración de una sustancia expresada en normalidad (N).

$$\text{Conc. EAA} = \frac{1.828 \mu\text{mol}}{163.4 \mu\text{L}}$$

$$\text{Conc. EAA} = 0.0112\text{M}$$

Se calcularon los milimoles equivalentes de ácido ascórbico en EP3₁; tomando en cuenta que el volumen de aforo de la solución fue de 25.0 mL se puede calcular cuántos mmoles EAA se encuentran:

$$\text{mmoles de EAA en EP3}_1 = \text{Conc. de EAA} \times \text{Volumen(mL)}$$

$$\text{mmoles de EAA en EP3}_1 = 0.0112\text{M} \times 25.0 \text{ mL}$$

$$\text{mmoles de EAA en EP3}_1 = 0.28 \text{ mmoles}$$

Se procedió de la misma manera para calcular los milimoles de EAA en EP3₂, dando el siguiente resultado:

$$\text{mmoles de EAA de EP3}_2 = 0.12 \text{ mmoles}$$

Es importante notar que la cantidad de antioxidantes extraídos en EP3₁ es mayor que en EP3₂, lo cual es un comportamiento esperado teniendo en cuenta el proceso de extracción (ver Figura 29). La actividad antioxidante (AO) del propóleo 3, se calcula de la suma de milimoles de EAA en EP3₁ y EP3₂, dividido por la cantidad de masa de propóleo 3 utilizada para el proceso de extracción, es decir:

$$AOP_3 = \frac{(\text{mmoles de EAA EP3}_1 + \text{mmoles de EAA EP3}_2)}{\text{g de propóleos 3}}$$

$$AOP_3 = \frac{(0.28\text{mmol} + 0.12\text{mmoles})}{3.008 \text{ g}}$$

$$AOP_3 = 0.133 \frac{\text{mmoles de EAA}}{\text{gramo de propóleo}}$$

Se procedió de la misma forma con los demás extractos de propóleos, y los resultados se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21: Actividad antioxidante de los propóleos estudiados.

Propóleos	Masa extraída (g)	EP₁ (mmol EAAs) *	EP₂ (mmol EAAs)	EP₁ +EP₂ (mmol EAAs)	Actividad Antioxidante (mmol EAAs.g⁻¹ propóleos)
P1	3.021	0.137	0.066	0.203	0.067
P2	2.816	0.277	0.176	0.453	0.161
P3	3.008	0.280	0.120	0.400	0.133
P4	3.006	0.422	0.196	0.618	0.206
P5	2.995	1.006	0.413	1.419	0.474
P6	3.008	0.140	0.020	0.160	0.053
P7	2.996	0.052	0.045	0.097	0.032
P8	3.009	4.241	0.869	5.110	1.698
P9	3.089	0.317	0.123	0.441	0.143
P10	3.047	0.146	0.110	0.256	0.084

*EAAs: moles de equivalentes de ácido ascórbico.

Se han realizado estudios en propóleos que expresan su contenido de actividad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico (EAAs) en los que los resultados varían entre 0.04 y 0.50 mmol EAAs/g propóleos (Palomino García, 2009). Los resultados de los propóleos estudiados en esta investigación se encuentran en un intervalo muy similar de actividad antioxidante a los de Palomino García, lo que plantea a este método con perspectivas interesantes para posteriores aplicaciones ya que se emplearon distintas técnicas de análisis..

El promedio presentado en la Tabla 21, fue calculado sin tomar en cuenta el propóleo 8, debido a que la actividad antioxidante que se determinó en el experimento, es mucho más elevada que la de los demás y como se puede observar en la Tabla 6, es una muestra comercial, mientras que las demás muestras se tienen sin mayor procesamiento. Este tipo de productos comerciales son preparados alimenticios enriquecidos con distintas sustancias

como vitaminas, por lo tanto, es natural que la adición de estas sustancias incrementen su poder antioxidante. Sin embargo, a pesar de haber separado dicho propóleos, la variación entre la actividad antioxidante de los propóleos es muy grande. Al igual que las mieles, los propóleos cambian su composición química por diversos factores, y establecer límites de actividad antioxidante es una tarea complicada. Es necesario estudiar a profundidad el comportamiento de la actividad antioxidante de los propóleos en condiciones experimentales que garanticen la repetibilidad y la reproducibilidad de los experimentos para poder hacer comparaciones cuantitativas, incluso con resultados obtenidos de diversos métodos de medida.

En el caso de las muestras de El Salvador, el propóleo 9 ($AO = 0.143 \text{ mmol EAAs.g}^{-1}$) es proveniente de un apiario ubicado en la región de la Cordillera del Bálsamo (La Libertad) y su poder antioxidante es mayor que el propóleo 10 ($AO = 0.084 \text{ mmol EAAs.g}^{-1}$), proveniente de una colmena de *Melipona Beecheii*, ubicada en La Palma, Chalatenango. Se sabe que algunas especies de abejas sin aguijón elaboran el propóleo de una mezcla de resinas obtenidas de los arboles con barro (Bankova, 2005a), por lo tanto el contenido de material vegetal por gramo de propóleos sería menor.

Hay diversos factores que podrían interferir en la medida correcta de la actividad antioxidante de cualquier producto natural, uno de ellos es la extracción. La comparación de distintos estudios cuando el proceso de extracción ha sido diferente entre ellos, puede ser una situación que complique el proceso de análisis estadístico. Es necesario tratar de estandarizar el proceso de extracción, al menos, con la finalidad comparar parámetros fisicoquímicos específicos.

5.2.4 DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO, COBRE, PLOMO Y ZINC EN EXTRACTOS DE PROPÓLEOS

Para la determinación de arsénico, cobre, plomo y zinc se utilizaron disoluciones de HNO_3 y KNO_3 ambos 0.1M como electrolitos de soporte, con agua desionizada como disolvente. Se utilizó el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo, un electrodo de platino

como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia. Se realizaron barridos de potencial a una velocidad de $5.0\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ para identificar el dominio electroactivo del electrólito soporte, fijándose éste desde -980mV a 260mV .

Una vez fijado el dominio electroactivo, se realizaron adiciones de soluciones patrón de las especies químicas a determinar, con el objeto de identificar picos que evidencien reacciones redox cuantitativas y elaborar las respectivas curvas de calibración.

Por ejemplo, para la determinación de plomo, se realizaron cinco adiciones de $200\ \mu\text{L}$ de solución de nitrato plomo (II) a $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ al electrólito soporte, haciendo un barrido de potencial después de cada adición. Se identificó un pico correspondiente a la transformación de Pb^{2+} a Pb^0 a un potencial de -325mV , el polarograma obtenido se muestra en la Figura 34.

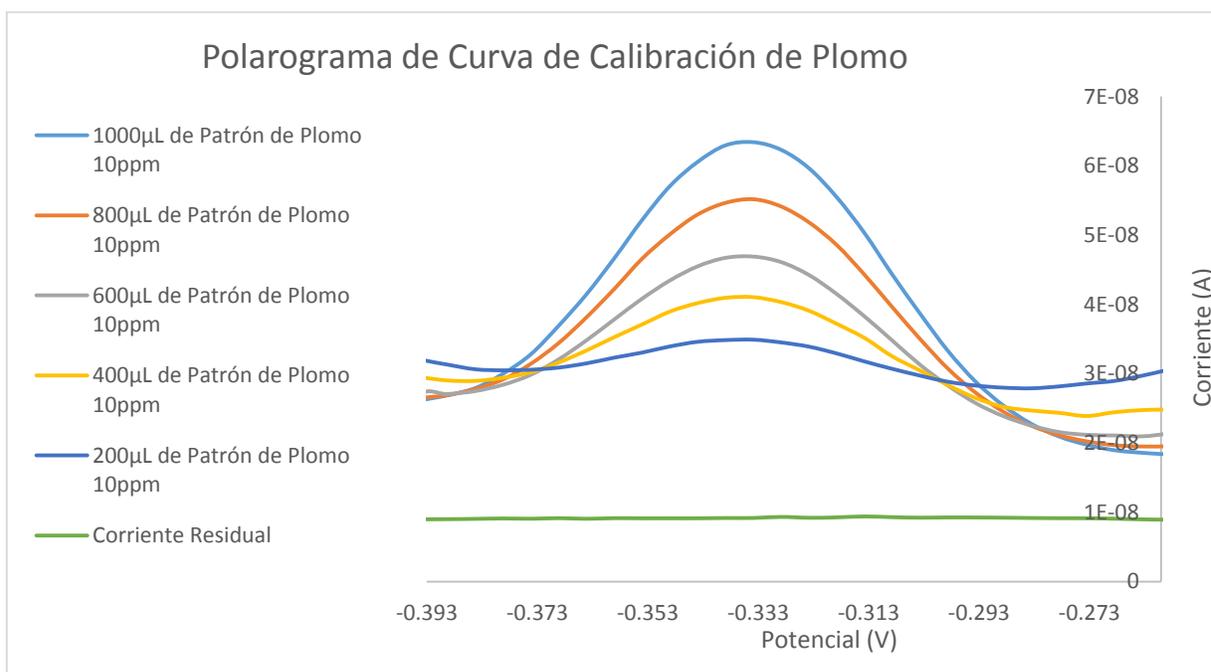


Figura 34: Polarograma de la curva de calibración de solución de patrón de plomo 10 mg/L. Electrólito soporte: KNO_3 y HNO_3 0.1M, solvente: agua desionizada, velocidad del barrido: $5.0\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para realización de la curva de calibración se calculó la concentración de plomo (en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en la celda después de cada adición (tomando en cuenta el factor de dilución). En la tabla 22

se muestran la concentración de la celda después de cada adición de patrón y la corriente correspondiente.

Tabla 22: Concentración de plomo en la celda y corriente correspondiente a cada adición de solución de patrón de plomo.

Adición	Volumen añadido de solución patrón de plomo 10 mg.L⁻¹ (μL)	Concentración de plomo en la celda (mg.L⁻¹)	Corriente (μA) de pico a 325mV
0	0.0	0.000	0.00E+00
1	200.0	0.196	5.59E-03
2	400.0	0.385	1.44E-02
3	600.0	0.566	2.27E-02
4	800.0	0.741	3.06E-02
5	1000.0	0.909	0.04

Una vez obtenida la concentración de plomo en la celda después de cada adición, ésta se graficó versus la corriente obtenida en el respectivo barrido de potencial, para elaborar la curva de calibración y calcular los límites de detección y cuantificación de plomo con la técnica utilizada. La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 35.

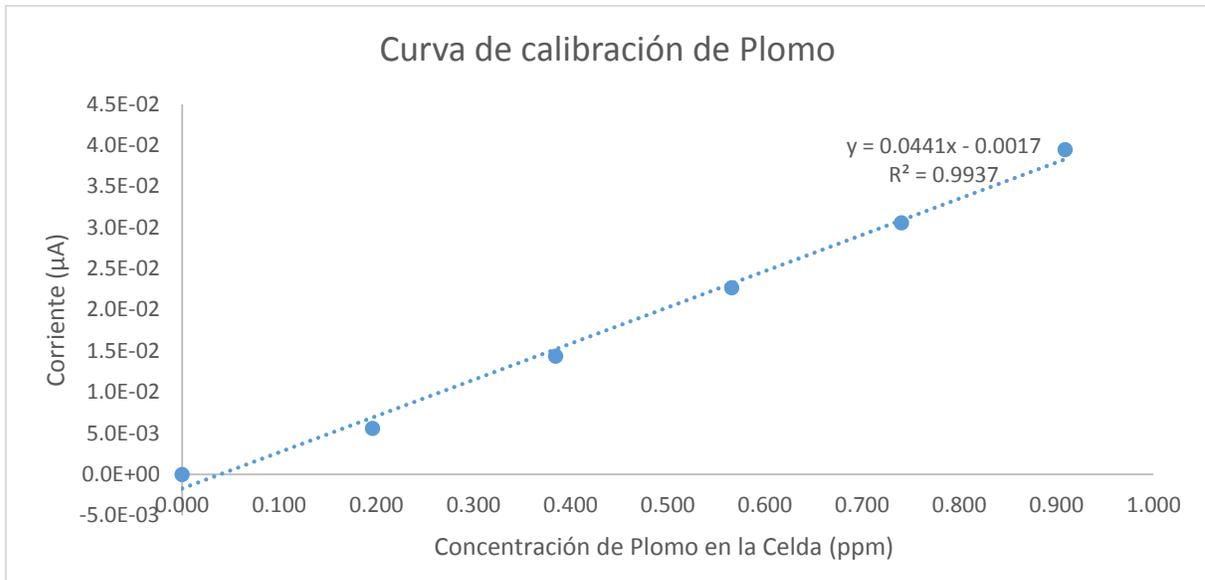


Figura 35: Curva de calibración de plomo. Corriente medida a 325mV.

Con el objeto de calcular el límite de detección se determinó el parámetro $S_{x/y}$ conocido como la varianza de la regresión, o desviación estándar residual que estima los errores aleatorios en la variable “y” (Miller & Miller, 2005):

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde: y_i , es el valor correspondiente a la señal analítica,

\hat{y}_i , es el valor de la señal analítica corregido por la ecuación de regresión lineal,

y n , es el número de datos obtenidos.

Para calcular límites de detección de curvas de calibración en experimentos que no requieren de la medición de blancos repetidamente, como el presente caso, es más práctico sustituir los valores de s_b y Y_b de las ecuaciones 7 y 8, por el intercepto de la ecuación de regresión lineal (a) de la curva de calibración y la desviación estándar residual (Miller & Miller, 2005), es decir:

$$\text{Límite de Detección} = a + 3s_{x/y} \quad (\text{Ecuación 7a})$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = a + 10s_{x/y} \quad (\text{Ecuación 8a})$$

Donde: a , es la ordenada al origen de la regresión lineal, ($y = a + bx$)

y $3s_{x/y}$, es la desviación estándar residual.

Por ejemplo, en el caso de la curva de calibración del plomo, se calculó primero la suma de cuadrados de la diferencia residual ($\sum_i^n (I_i - \hat{I}_i)^2 = 7.51 \times 10^{-6}$), y luego se aplicó la fórmula de la Ecuación 9.

$$s_{x/y} = \sqrt{\frac{7.51 \times 10^{-6}}{4}}$$

$$s_{x/y} = 1.34 \times 10^{-3}$$

Una vez obtenido el valor de la desviación estándar residual se procede a calcular los límites de detección y cuantificación de acuerdo a la curva de calibración aplicando las Ecuaciones 7a y 8a:

Límite de detección:

$$\text{Límite de Detección} = a + 3s_{x/y}$$

$$= -1.7 \times 10^{-3} + 3(1.34 \times 10^{-3})$$

$$\text{Límite de Detección} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ (en } \mu\text{A)}$$

En el caso del límite de cuantificación:

$$\text{Límite de Cuantificación} = -1.7 \times 10^{-3} + 10(1.34 \times 10^{-3})$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ (en } \mu\text{A)}$$

Puede notarse que el límite de detección está calculado en función de la corriente en μA , para expresar los valores de los límites de detección y cuantificación en términos de concentración se hizo uso de la ecuación de la regresión lineal obtenida en la curva de calibración (Figura 35 para el plomo). En la Tabla 23 se presenta un resumen de datos de interés de las curvas de calibración de arsénico, cobre plomo y zinc.

Tabla 23: Resumen de algunos parámetros analíticos de las curvas de calibración.

Metal	Potencial de pico (mV)	Ecuación de regresión lineal	Coefficiente de determinación (r^2)	Límite de detección (mg.L⁻¹)	Límite de cuantificación (mg.L⁻¹)
Arsénico	-686	$y = 0.0495x - 0.0034$	0.9908	1.4	4.7
Cobre	-509	$y = 0.1212x + 0.0056$	0.992	1.0×10^{-1}	2.9×10^{-1}
Plomo	-325	$y = 0.0441x - 0.0017$	0.994	9.1×10^{-2}	3.0×10^{-1}
Zinc	70	$y = 0.0561x - 0.0019$	0.991	1.1×10^{-1}	3.4×10^{-1}

Una vez determinado el carácter lineal del método y los límites de detección y cuantificación a cada una de las especies químicas, se realizaron los experimentos para la determinación de estas sustancias en cada uno de los extractos de propóleos.

Se añadieron 10.0 mL del electrolito soporte (HNO_3 y KNO_3 ambos a 0.1M) a la celda electroquímica y se hizo en barrido de potencial para determinar la corriente residual; luego se añadieron de 2.0 mL del extracto de propóleo, y por último se hicieron adiciones de patrón de cada uno de los metales, haciendo el barrido de potencial correspondiente a cada adición.

A pesar que se encontraron diversos picos en diferentes potenciales en los experimentos, ninguno de ellos coincidía con los potenciales señalados en la Tabla 23. Lo que indica que la cantidad de arsénico, cobre, plomo y zinc en todos los extractos de propóleos se encontraban por debajo de sus respectivos límites de detección, tal y como se presenta en la Tabla 24.

Tabla 24: Resultados de la determinación por polarografía diferencial de impulsos de arsénico, cobre, plomo y zinc de los extractos de propóleos.

Propóleos	Arsénico	Cobre	Plomo	Zinc
P1	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.
P2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
P10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*No detectable.

A pesar que se sabe que la composición química de los propóleos es variable y depende de una variedad de factores, en ninguno de los propóleos estudiados se encontraron concentraciones elevadas de arsénico, cobre, plomo y zinc. La ausencia de estas sustancias en cada uno de los propóleos indica una buena ubicación de las colmenas, ya que las abejas que lo elaboran emplearon insumos no contaminados por alguna de estas sustancias.

6. CONCLUSIONES

- I. El porcentaje de humedad de las mieles estudiadas, tanto las elaboradas por abejas melíferas como las abejas sin aguijón, es adecuado, según a la Norma Salvadoreña de Miel y el parámetro propuesto por Vit. et al (2004), respectivamente.
- II. El porcentaje de cenizas puede ser determinado por la medida de su conductividad, siendo una ruta más rápida, simple y barata. A pesar de que este parámetro no está contemplado en la Norma Salvadoreña de Miel, si tomamos en cuenta la propuesta de 0.6% de las normas brasileñas y mexicanas, todas las mieles de abejas melíferas tienen resultados aceptables. En el caso de las mieles de abejas sin aguijón, se ha propuesto un límite de 0.5% (Vit et al., 2004), con el que de igual forma, todas las muestras estudiadas tienen resultado aceptable.
- III. Los puntos finales de las titulaciones ácido-base para la determinación de la acidez libre, fueron obtenidos gráficamente por la curva de titulación de cada muestra de miel. En ninguno de los casos el pH del punto final de la reacción coincidió con el establecido por el método propuesto por la norma oficial salvadoreña.
- IV. Con respecto a la acidez libre, todas las muestras de miel de abejas melíferas tienen resultados aceptables de acuerdo a la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja. Se ha propuesto hacer una diferencia en el valor aceptado de acidez de las mieles sin aguijón (Vit et al., 2004) de acuerdo al género al que pertenecen. En el caso de las mieles MM1 y MM4, procedentes del género *Trigona*, ambas tienen una acidez por encima del valor propuesto. En el caso de las mieles del género *Melipona* (MM2, MM3 y MM5), solo la miel procedente de El Salvador (MM2) cumple el valor propuesto.
- V. Las mieles de *Apis mellifera* estudiadas cumplen el requisito de la Norma Salvadoreña de Miel de Abeja en el aspecto de azúcares reductores, con excepción de la miel comercial catalogada como MA5. En el caso de las mieles de abejas sin

aguijón, tomando en cuenta los parámetros de calidad propuestos por Vit. et al (2004), sólo la muestra de MM5 estaría por debajo del límite.

- VI. La determinación de fructosa no está considerada en ninguna de las normas oficiales consultadas. Sin embargo, se considera un parámetro importante ya que es el monosacárido reductor en mayor cantidad en las mieles y con mayor poder edulcorante. Se encontró una tendencia similar que en los azúcares reductores: menor cantidad en las mieles de las abejas sin aguijón que en las de abejas melíferas.
- VII. La determinación polarográfica de HMF es una medida directa, con una manipulación reducida de la muestra y con una cantidad de reactivos necesarios muy reducida, a diferencia de la propuesta por la Norma Salvadoreña de Miel. Ya que se forma a partir de la exposición de los azúcares al calor y la luz, no se hace distinción entre las mieles de abejas de distinto género. La norma oficial salvadoreña establece un límite especial para las mieles provenientes de países tropicales, y en este estudio todas las mieles provienen de la región tropical. Con esta consideración, sólo las mieles MA2 y MM5 están por encima del límite permitido. Lo que indica que dichas mieles no han sido conservadas en condiciones adecuadas de almacenamiento y tienen un alto grado de deterioro.
- VIII. La yodimetría voltamperométrica ha sido utilizada satisfactoriamente en la determinación de actividad antioxidante de propóleos. Los resultados obtenidos son similares a los de otros estudios que han empleado distintos métodos de determinación. Es apropiado expresar la actividad antioxidante determinada a partir de las titulaciones yodimétricas en moles de equivalentes de ácido ascórbico (EAAs).
- IX. Los extractos de propóleos contenían cantidades de arsénico, cobre, plomo y zinc por debajo de los respectivos límites de detección y cuantificación de la técnica utilizada, a pesar de que ambos, en todos los casos, están por debajo de los 5 mg/mL.

7. RECOMENDACIONES

- I. Realizar los procesos de estandarización y validación de las metodologías electroquímicas para la determinación de HMF, azúcares reductores, cenizas y fructosa con el objeto de proponer con propiedad alternativas de los métodos de análisis, a los contenidos en las normas oficiales de miel.
- II. Diseñar investigaciones de carácter nacional, con el objeto de caracterizar química y físicamente las mieles de las distintas especies de abejas sin aguijón, para la posterior adecuación de los parámetros de calidad presentes en la normativa de los productos de abejas melíferas y finalmente, generar una norma oficial propias que regulen su calidad, en el marco de una política regional de desarrollo de la meliponicultura, que contemple aspectos sociales, culturales, ecológicos y económicos.
- III. Profundizar en la química ácido-base de las mieles, y hacer una revisión de los valores de los puntos finales de la titulación ácido-base propuesta en el método oficial 962.19 de la AOAC, que se considera en la Norma Salvadoreña de Miel.
- IV. Evaluar la estequiometría de las reacciones del triyoduro con el trolox, ácido gálico y otros agentes antioxidantes con el objeto de poder expresar la actividad antioxidante obtenida por este método en TEAC, EAG, y otros. De esta manera se podrá comparar los resultados con algunos otros métodos de determinación de actividad antioxidante, sin importar las unidades en las que se expresen lo resultados.
- V. Validar el método de determinación de actividad antioxidante por yodimetría voltamperométrica, para que pueda ser considerado como una metodología analítica.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acquarone C., Buera P., Elisalde B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 695-703.
2. Agudo L. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Revista de la Educación en Extremadura* .
3. Alarcón R.C., Ibañez L.C. (2008). Determinación de las Características Fisicoquímica de de la miel producida por las especies de Abejas sin aguijón: *Melipona Beecheii* y *Tetragonisca Angustula* de meliponiculturas en la Zona Norte del Departamento de Chalatenango. Tesis de Lic.: Universidad de El Salvador.
4. Amerine M.A., Thoukis G. (1958). The Glucose- Fructose Ratio of California Grapes. *Vitis*, 224-229.
5. AOAC. (2005). *Officials Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. Arlinton: AOAC.
6. Bankova V., De Castro S.L., Marcucci M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 3-15.
7. Bankova, V. (2005). Recent Trends and important developments in propolis research. *Evid. Based. Complem. Altern. Medecine*, 29-32.
8. Bankova, V. (2005a). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117.
9. Baquero L., Stamatti G. (2006). *Cría y manejo de abejas sin aguijón*. Tucumán, Argentina: Ediciones del Subtrópico.
10. Bedascarrasbure, E. (2011). Propóleos: un Valios Producto de la Colmena. *Horizonte Agroalimentario*, 4-7.
11. Benzie I.F.F, Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power". *Analytical Biochemistry*, 239(292), 70-76.
12. Bolaños K., Maldonado M., Pineda K. (2008). Uso de la Miel de Chumelo (*Tetragonisca angustula*) como coadyuvante en el proceso de cicatrización de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de encaste neozelandés. Tesis de Lic.: Universidad de El Salvador.

13. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebesm. Wiss. Technol.*, 25-30.
14. Caballero H.D., (2009). Nuevos criterios de calidad para la miel basados en procedimientos electroquímicos. Tesis de Lic.: Universidad Nacional Autónoma de México.
15. Cajori, F. A. (1922). The use of iodine in the determination of glucose, fructose, maltose and sucrose. *J. Biol. Chem.*, 617-626.
16. Campos J., Cañénguez J., Sandoval T. (2010). Desarrollo Productivo del Sector Apícola en el Departamento de Morazán. Tesis de Maestría: Universidad de El Salvador.
17. Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for oxidants. *Free Radical. Biol. Med.*, 303-311.
18. Cao G., Prior R.L. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol*, 20-62.
19. Castaldo S., Capasso F. (2002). Propolis, and old remedy in modern medicine. *Fitoterapia*, S1-S6.
20. Codex Alimentarius. (2001). Norma de Miel.
21. Cortopassi-Laurino M. Imperatriz-Fonseca V., Roubik D., Dollin A., Heard T., Aguilar I., Venturieri G., Eardley C., Nogueira-Neto P. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie* , 37, 275–292.
22. Cruz E., Melara C., Portillo L. (2008). Diagnóstico sobre el estado de la apicultura salvadoreña y diseño de una propuesta económico empresarial para el desarrollo del sector apícola de el salvador. San Salvador: Universidad José Matías Delgado.
23. Dardón M.J. (2005). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel blanca producida por *Melipona Beecheii* en Guatemala. Tesis de Lic.: Universidad de San Carlos de Guatemala.
24. Dardón M.J., Enríquez E. (2008). Caracterización Fisicoquímica y Antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Guatemala. *Interciencia*, 33(12), 916-922.
25. de Jaime Lorén J.M. (2003). Sobre la primica hispana en cuanto a los envíos de abejas europeas a América. *ILUIL*, 26, 595-612.

26. Díaz D.A.K. (2012). Métodos electroanalíticos aplicados al control de calidad de la miel de abeja en Colombia. Tesis de grado. Universidad del Atlántico. Barranquilla, Colombia.
27. DYGESTIC. (13 de Marzo de 2014). Dirección General de Estadística Censos . Obtenido de <http://www.digestyc.gob.sv/>.
28. Ehara M.A., Amarante M.K., Conti B.J., Sforcin J.M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1378–1386.
29. FAO. (13 de 03 de 2014). FAOSTAT, Estadísticas de la FAO. Obtenido de <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>.
30. Fisher G., Brum M., Alves L., Paulino L., Scremin A., de Oliveira C., Souza F., Storch T. (2007). Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116, 79–84.
31. Gazcón N. (2012). Aplicación de la electroquímica analítica a el control de calidad de productos apícolas. Tesis de Doctorado: Universidad Nacional a Distancia. Madrid, España.
32. Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.*, 29-36.
33. Glazer A. N. (1993). Phycoerythrin fluorescence assay for reactive oxygen especies. *Free Radycal Biol. Med.*, 161-168.
34. Gorjanović S., Novakovic M.M., Pastor F., Suznjevic D. (2010). Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenging in Determination of Antioxidant Activity of Strong Alcohol Beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8400–8406.
35. Gorjanović S., Alvarez-Suarez J.M., Novakovic M.M., Pastor F., Pezo L., Battino M., Suznjevic D. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and varius spectrophotometric assays. *Journall of Food Composition anda Analysis*, 30, 13-18.
36. Grange J., Davey R. (1990). Antibacterial Properties of Propolis (Bee Glue). *Journal of Royal Society of Medicine*, 83, 159-160.

37. Gutiérrez M.G., Enríquez E., Lusco L., Rodríguez-Malaver A., Persano L., Vit P. (2008). Caracterización de Mieles de Melipona Beecheii y Melipona Solani de Guatemala. *Rev Fac Farm* , 50(1), 2-6.
38. Harris, D. (2012). *Análisis Químico Cuantitativo (Sexta Edición)*. Barcelona: Reverté.
39. Hernández J., Goycoolea F., Acosta A., Castañeda M., Dominguez Z., Robles R., Vasquez-Moreno L., Velazquez E., Astiazaran H., Lugo E., Velazquez C. (2007). Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Med*, 73, 1469-1474.
40. IHC. (2009). HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION.
41. Instituto de Nutrición y Tecnología Alimentaria (INTA), Chile. (28 de abril de 2014). *Portal de Antioxidantes*. Obtenido de: <http://www.portalantioxidantes.com/>.
42. Juárez D. (2003). Determinación Electroquímica de HMF en Miel de Abeja. Tesis de Lic.: Universidad Nacional Autónoma de México.
43. Kikuchi K., Murayama T., (1976). Polarographic anodic wave of hydrogen. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 49, 1554–1556.
44. Kline G., Acree S. (1930). A study of the method for titrating aldose sugars with iodine and alkali. *Bureau of Standars Journal of Research*, 5, 1063-1084.
45. Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* , 84, 329–339.
46. Londoño J., (2011). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En C. U. Lasallista, *Desarrollo y transversalidad*. (págs. 129-162). Itagüí.
47. Lothrop R.E., Holmes R.L. (1931). Determination of Dextrose and Levulose in Honey by Use of Iodine-Oxidation Method. *Analytical Edition*, 334-339.
48. Manrique A., Santana W. (2008). Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela.
49. Mayorga Cerón J. H. (2012). Caracterización de la Cadena Productiva de Miel en El Salvador. Ministerio de Agricultura y Ganadería, San Salvador.
50. McGregor S. E. (1962). *La Apicultura en los Estados Unidos*. Limusa.

51. Mercedes Gochez. (2008). Diagnóstico de la Situación Actual de la CONAPIS. San Salvador: FAO.
52. Michlack A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. Polish J. of Environ. Stud. , 15(4), 523-530.
53. Miller N.J., Diplock A., Rice-Evans C., Davies M., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci., 407-412.
54. Miller, J., & Miller, J. (2005). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (Cuarta Edición ed.). Madrid: Prentice Hall.
55. Miorin P.L., Levy N., Custodio A., Bretz W., Marcucci M. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology, 95, 913–920.
56. Mishima S., Narita Y., Chikamatsu S., Inoh Y., Ohta S., Yoshida C., Araki Y., Akao Y., Suzuki K., Nozawa Y. (2005). Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. Journal of Ethnopharmacology , 99, 5–11.
57. Nagai T., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. Food Chemistry, 80, 29–33.
58. Nakajima y., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. Life Science, 80, 370–377.
59. Nates G., Rosso J.M. (2013). Diversidad de Abejas sin Aguijón (Hymenoptera:Meliponini) utilizadas en Meliponicultura en Colombia. Acta biol. Colomb, 18(3), 415-426.
60. Palomino García. (2009). *Caracterización Fisicoquímica y Evaluación Antioxidante de Propóleos en Antioquía*. Sede de Antioquía: Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Maestría.
61. Park Y.K., Ikegaki M. (1998). Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(11), 2230-2232.
62. Parra A., Nates G. (2007). Variación de la comunidad de abejas de las orquídeas (Hymenoptera: Apidae) en tres ambientes perturbados del piedemonte llanero colombiano. Revista de Biología Trópica, 54, 931-941.

63. Piazza M., Accorti M., Oddo L. (1991). Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura* 7.
64. Pingarrón y Sánchez. (2003). *Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones*. Madrid: Síntesis.
65. Platero E., Linares C., Polanco R. (2010). Propuesta para el fortalecimiento de la cadena de valor del sector apícola de la zona de Chalatenango y Metapan. Tesis de Lic.: Universidad de El Salvador.
66. Popova M., Bankova V., Bogdanov S., Tsvetkova I., Naydenski C., Marcazzan G.I., Sabatini A-G. (2007). Chemical characteristics of popular type of different geographic origin. *Aidologie*, 306-311.
67. Posey J.M.F., Camagrao D.A. (1985). Additional notes on the classification and knowledge of stingless bees (Meliponinae, Apidae, Hym). nye Kayapo Indians of Gorotide (Para, Barzil). *Ann. Carnegie Mus.*, 54, 247-274.
68. Potkonjak N., Veselinovec D., Novakovic M., Gorjanovic S., Pezo L., Suznjevic D. (2012). Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach. *Food and Chemical Toxicology* , 50, 3614–3618.
69. Preza de la Vega J. (2007). Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles. Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México.
70. Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.
71. Quezada Euán J.J.G. (2011). Xunancab, la señora abeja de Yucatán. En S. d. Yucatán, *Miel y Las Abejas* (págs. 13-30). Yucatán: Secretaría de Educación del Gobierno del Estado de Yucatán.
72. Quintero-Mora M.L., Londoño-Orozco A., Henández-Hernández F. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento invitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*, 25, 22-26.
73. Reyes Salas E.O., Manzanilla J., Juárez D., Reyes Salas M. (2006). Direct Electrochemical Determination of Hidoxymethylfurfural (HMF) and its Application to Honey Samples. *Analytical Letters*, 39, 161–171.
74. Roubik D.W. (2000). Pollination System Stability in Tropical America. *Conservation Biology*, 14(5), 1235-1236.

75. Salatino A., Weinstein E., Negri G., . (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *eCAM* 2005, 2(1), 330-338.
76. Sánchez-Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol. Int*, 8, 121-137.
77. Sanz Cervera, S. (1994). Humedad, Cenizas y Conductividad Eléctrica en Mieles de la Rioja. *Zubía*, 143-158.
78. Sarría, A. (2012). Bioquímica Nutricional de los Carbohidratos. En A. Sarría , & M. Bueno, *Nutrición en Pediatría* (Tercera edición ed.). Ergon.
79. Sicili S., Kutluca S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 69–73.
80. SIECA. (13 de Marzo de 2014). Sistema de Estadísticas de Comercio de Centroamérica. Obtenido de <http://estadisticas.sieca.int/>.
81. Skoog D., West D., Holler F. (2005). *Química Analítica* (octava edición Ed.. McGraw-Hill).
82. Skoog D., Holler F., Crouch S. (2001). *Principios de Analisis Instrumental*. McGraw-Hill.
83. Suznjevic D., Pastor F., Gorjanovic S. (2011). Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta*, 85, 1398–1403.
84. Thainpong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros Zevallos L., Hawkins D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.
85. Valencia D., Alday F., Robles-Zepeda R., Garibay- Escobar A., Galvez-Ruiz J. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645-651.
86. Velásquez Reales J. (2014). Aplicación de técnicas electroquímicas en el control de calidad de miel. Tesis de Lic.: Universidad de El Salvador.
87. Vit P. (2008). La Miel Precolombina de Abejas sin Aguijón (Meliponini), aún no tiene Normas de Calidad. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 42(3), 415-423.

88. Vit P., Enríquez E., Medina M. (2004). Quality standars for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico anda Venezuela. *Bee World*, 85, 2-5.
89. Vit P. (2009). Caracterización Fisicoquímica de Mieles de Abejas Sin Aguijón (Meliponini) de Venezuela. *Revista del Instituto Nacional de Higienen "Rafael Rangel"*, 40(2), 7-12.
90. Vit P., Barth O., Enríquez E., Matsuda A., Almeida-Muradian L. (2006). Necesidad del Control de la Miel de Abejas sin Aguijón. *Médula*, 15.
91. Viuda Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis and Royal Jelly. *Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, 73(9), R117-124.
92. Vorwohl G. (1964). Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honig und ihrer tratchmässigen Herkunft. *Ann de Abeille*, 7, 51-63.
93. Walker P., Crane E. (1987). Constituents of Propolis. *Apidologie*, 18(4), 327-334.
94. Wayner D., Burton g., Ingold K., Locke S. (1985). Quantitative measurment of total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human plasma by controlled peroxidation- the important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, 33-37.
95. Wayner D., Burton g., Ingold K., Barclay L., Locke S. (1987). The relative contribution of vitamin E, urate ascorbate .and protiens to total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biofphys. Acta*, 408-419.
96. White J., Doner W. (1980). Honey Composition and Properties. *Agriculture Handbook*, 82-91.