



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN POR MÉTODOS ANALÍTICOS DE LA CALIDAD DE LA MIEL  
DE ABEJAS NATIVAS SIN AGUIJÓN (APIDAE: MELIPONINI) EN LA CUENCA  
DEL BALSAS, MICHOACÁN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

JAIME DAVID MARTÍNEZ LÓPEZ



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Eugenio Octavio Reyes Salas

**VOCAL:** Francisco Rojo Callejas

**SECRETARIO:** Silvia Citlalli Gama González

**1er. SUPLENTE:** Carolina Flores Ávila

**2° SUPLENTE:** Gustavo Adolfo López Zelada Guillen

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de química analítica DEPg.

Laboratorio 114. Sótano del edificio B.

Universidad Nacional Autónoma de México.

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_

Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_

Jaime David Martínez López

## ***Índice***

<b>1. <u>INTRODUCCION.</u></b>	<b>1</b>
<b>2. <u>OBJETIVOS</u></b>	<b>3</b>
<b>3. <u>ANTECEDENTES.</u></b>	<b>5</b>
<b>3.1. ASPECTOS GENERALES.</b>	<b>5</b>
<b>3.2. ABEJA SIN AGUIJÓN: Familia: APIDAE,     Subfamilia: APINAE y Tribu: MELIPONINI.</b>	<b>6</b>
<b>3.2.1. La Meliponicultura.</b>	<b>7</b>
<b>3.2.2. Propiedades medicinales de la miel de abejas         meliponinas.</b>	<b>12</b>
<b>3.2.3. Normatividad de la miel de abejas meliponinas.</b>	<b>14</b>
<b>3.3. APIS MELÍFERA: Familia: APIDAE,     Subfamilia: APINAE, Tribu: APINI y Genero: APIS.</b>	<b>14</b>
<b>3.3.1. La Apicultura.</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2. Composición química de la miel.</b>	<b>16</b>
<b>3.4. PROPOLEOS.</b>	<b>17</b>
<b>3.4.1. Composición química.</b>	<b>19</b>
<b>3.4.2. Propiedades medicinales.</b>	<b>20</b>
<b>3.4.3. Actividad antioxidante.</b>	<b>21</b>
<b>4. <u>METODOLOGÍA.</u></b>	<b>24</b>
<b>4.1. MIELES.</b>	<b>24</b>
<b>4.1.1. Determinación del porcentaje de humedad.</b>	<b>25</b>
<b>4.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas.</b>	<b>26</b>
<b>4.1.3. Determinación de pH.</b>	<b>27</b>
<b>4.1.4. Determinación de azúcares reductores en miel.</b>	<b>28</b>

4.1.5. Determinación de Sacarosa.	29
4.1.6. Determinación de Acidez libre, láctónica y total.	30
4.1.7. Determinación de Fructosa y HMF.	33
<b>4.2. PROPÓLEOS.</b>	35
4.2.1. Descripción de los propóleos.	35
4.2.2. Estudio electroquímico de la reacción del triyoduro con reductores.	36
4.2.3. Estudio para la extracción de propóleos.	36
4.2.4. Determinación de actividad antioxidante en extractos de propóleos.	37
4.2.5. Determinación de azúcares reductores en propóleos.	37
<b>5. <u>PARTE EXPERIMENTAL.</u></b>	39
5.1. REACTIVOS.	39
5.2. EQUIPOS.	39
5.3. MUESTRAS.	40
<b>6. <u>RESULTADOS.</u></b>	43
6.1. MIELES.	43
6.1.1. Humedad.	43
6.1.2. Cenizas.	45
6.1.3. pH.	47
6.1.4. Azúcares reductores.	48
6.1.5. Determinación de sacarosa.	52

6.1.6.Acidez libre y lactónica.	53
6.1.7.Fructosa.	58
6.1.8.Hidroximetilfurfural (HMF).	62
<b>6.2. PROPÓLEOS.</b>	67
6.2.1.Estudio electroquímico del triyoduro con reductores.	67
6.2.2.Estudio voltamperométrico de la reducción del triyoduro con ácido ascórbico.	72
6.2.3.Estudio voltamperométrico de la reducción del triyoduro con 1,1-difenil-2 picrilhidrazil (DPPH).	76
6.2.4.Estudios de extracción de propóleos.	78
6.2.5.Determinación de azúcares reductores en propóleos.	86
<b>6.3. TABLAS DE RESULTADOS GLOBALES.</b>	90
<b>7. <u>CONCLUSIONES.</u></b>	93
<b>8. <u>BIBLIOGRAFÍA.</u></b>	96
<b>9. <u>ANEXOS</u></b>	108
9.1. ANEXO 1	108
9.2. ANEXO 2	111

## **1. INTRODUCCIÓN.**

La miel se puede definir como una sustancia dulce sin fermentar, producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de exudación de otras partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con otras sustancias específicas y maduran en sus colmenas.

Las abejas que tienen aguijón pertenecen a la familia *Apis* (como la *Apis* melífera) y las que no tienen o lo tienen atrofiado al de *Meliponini*. Las abejas meliponinas también se caracterizan por hacer sus nidos en cavidades que encuentren disponibles como árboles huecos, muros o nidos abandonados. Estas abejas se adaptan a las condiciones locales y es por eso que en cada región existen diferentes especies. De las cuales sólo algunas se utilizan para la obtención de sus productos naturales principales (miel, cera y polen).

La meliponicultura es una actividad que data desde la época precolombina. Las poblaciones indígenas de México y Centroamérica, criaron y manejaron a las abejas sin aguijón para la producción de miel y cera (Nates- Parra et al., 2009). En México hay muy poca información disponible referente a la Meliponicultura.

Cabe destacar que la producción de miel de estas abejas sin aguijón es mucho menor a la miel producida por la *Apis* melífera la cual es la especie más conocida y productora de la miel más consumida en todo el mundo, con una cantidad mundial que en el 2013 ascendió a 1, 663,798.00 toneladas. (FAO, 2013). La cantidad producida de miel *Meliponini* anual es desconocida debido a que la extracción de estas mieles es muy escasa.



En México la producción promedio de miel de abeja *Apis* melífera en los últimos ocho años fue de 56 mil 500 toneladas, lo que sitúa al país en el quinto lugar mundial por debajo de China, Argentina, Turquía y Ucrania. (SAGARPA, Octubre 2014).

Aunque la producción de miel de *Apis* melífera es mucho mayor que la de las abejas *Meliponini*, su precio es mucho menor que la miel de esta última; uno de los factores es que el comercio de la miel de *Meliponini* tiene un mercado limitado a un consumo regional, por su relativamente baja producción. A la miel de *Meliponini* se le atribuyen propiedades medicinales conocidas y es a lo que le han dado mayor valor los meliponicultores y los consumidores.

Una ventaja significativa que tiene el proceso de crianza de las abejas *Meliponini* es que no requieren equipo sofisticado pues no representan un peligro ya que tienen el aguijón atrofiado. (Baquero y Stamatti, 2006; Cortopassi-Laurino, 2006). Las mieles de este tipo de abejas no están reguladas por normas nacionales ni internacionales.

Es de vital importancia el estudio de parámetros fisicoquímicos en las mieles de abejas sin aguijón ya que existen pocos estudios sobre su composición y ningún país ha elaborado estándares para su control de calidad. Este estudio posiblemente a futuro incentivará la meliponicultura, lo cual permitirá el comercio de estas mieles a un nivel más amplio del que actualmente tienen; esto podría ayudar a regiones de escasos recursos, que comercian estas mieles sin el respaldo de la calidad que tienen.

## **2. OBJETIVOS:**

- Analizar mieles tanto de *Meliponini* como de *Apis* melífera por medio de técnicas electroquímicas para determinar los parámetros de calidad de diferentes muestras.
- Con los resultados que se obtengan se hará una comparación entre las mieles de abejas de *Meliponini* como de *Apis* melífera para intentar establecer los criterios para una futura normativa en las mieles de *Meliponini*, como ya se tiene en las mieles de *Apis* melífera.
- Analizar la actividad antioxidante de distintos extractos de propóleos por medio de una yodimetría voltamperométrica.

Para el primer objetivo se determinan los siguientes parámetros de calidad (HMF, azúcares reductores, % fructosa, % humedad, % cenizas, pH y acidez), basados en la norma mexicana (NMX-F-036-MORMEX-2006) y normas internacionales para el control de calidad (CODEX ALIMENTARIUS) y la directiva del consejo de la *Unión Europea* de miel de *Apis* melífera.

Cabe aclarar que estas normas oficiales y sus criterios de calidad no se pueden aplicar rigurosamente a las mieles de *Meliponini*, ya que los estándares de estas mieles varían mucho dependiendo de diversos factores como: especie de abeja, región geográfica, época del año, vegetación circundante y el clima. La mayoría de las mieles de abejas *Meliponini* rebasa el límite de porcentaje de humedad establecido por estos documentos nacionales e internacionales ( $\leq 20\%$ ). También la mayoría de estas mieles presenta un contenido aparente de azúcares reductores por debajo del mínimo establecido en estos organismos (contenido aparente de azúcares reductores en mieles de *Apis* melífera  $\geq 63\%$ ).

Sin embargo, un criterio de calidad, quizás para ambas mieles consiste en el contenido de HMF pues esto depende sobre todo del manejo que hace el apicultor o el meliponicultor.

Se harán estos análisis a diferentes muestras de mieles tanto de *Apis* como de *Meliponini* de diferentes regiones del país y de Guatemala (en este caso son 5 mieles de *Apis* melífera); de las abejas *Meliponini* además de diferentes regiones, se analizarán mieles de distintas especies de este tipo de abejas y en el caso de mieles de *Meliponini* de Michoacán se hará una comparación de 4 especies de abejas de la misma región de las que se han contado con 2 colectas en distintas épocas del año.

### **3. ANTECEDENTES.**

#### **3.1. ASPECTOS GENERALES.**

Sabemos que desde los tiempos primitivos el hombre buscó en la naturaleza alimento para su mantenimiento y, entre otros, debió conocer desde épocas muy remotas, por casualidad quizás como tantas casualidades que han hecho que la humanidad sea lo que es hoy en día, las abejas salvajes, de las que supo aprovechar básicamente la miel y la cera.

Es fácil suponer que el trabajo preciso de la abeja, su laboriosidad y su curiosa organización social llamaran la atención del hombre primitivo, transformándola en un animal doméstico, cuando aprendió a fabricarle colmenas artificiales. Es muy abundante la representación de la relación entre el hombre y la abeja, tanto en estado salvaje como domesticado.



**Figura 1: Pintura rupestre Toghwana Dam, en Zimbabwe (7500-1000 a.C.).**

Desde las representaciones en la Cueva de la Araña de Bicorp (Valencia) hasta el bajo Egipto, Mesopotamia, la Anatolia hitita, la costa sirio-palestina, Chipre o Éfeso; desde el Mediterráneo oriental hasta el occidental; desde tablillas de Hatussas, o los papiros del reino del Antiguo Egipto, hasta la Biblia, los testimonios sobre la abeja y la miel son innumerables.

Tanto en joyas como monedas o esculturas (Artemisa efesia), dioses y héroes de la mitología clásica se relacionan con ellas. (Pilar Fernández Uriel, Dones del cielo, abeja y miel en el Mediterráneo antiguo, 2011).



**Figura 2: Pendiente de oro formado de dos abejas. Malia, Creta (1700-1450 a.C.).**

### **3.2. ABEJA SIN AGUIJÓN:**

**Familia:** *APIDAE*, **Subfamilia:** *APINAE* y **Tribu:** *MELIPONINI*.

Existen cerca de 500 especies de abejas de *Meliponini* mejor conocidas como "abeja sin aguijón", (Crane E. 1992). Evolutivamente, el aguijón de estas especies se encuentra atrofiado y por eso no pueden picar (Michener 1974). Estas abejas fueron criadas por culturas indígenas en diversas regiones tropicales y subtropicales del planeta; también existen evidencias con los mayas en la isla Cozumel, frente a las costas de Cancún (Weaver y Weaver 1981).

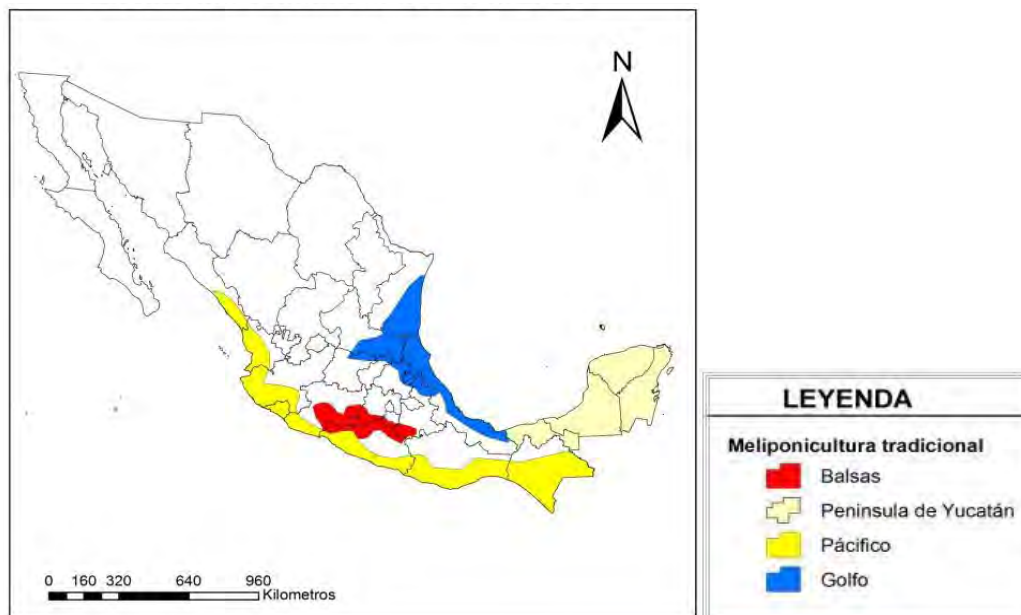


**Figura 3: Scaptotrigona Mexicana. Ilustración digital. Junio 2013.**

### **3.2.1. La Meliponicultura.**

La Meliponicultura, que es como se llama a la técnica de gestión de las abejas sin aguijón, ha sido de gran relevancia en la cultura humana, en la vida social y religiosa de varios pueblos que se han dedicado a este cultivo (Quezada-Euán, 2001). En algunas zonas tropicales de América esta actividad se originó en la época precolombina, con avances importantes particularmente en Mesoamérica, el área cultural comprendida entre el sur de México y Noreste de Costa Rica, así como en la región andina (Crane E, 1992; Quezada-Euán, 2001).

La meliponicultura mesoamericana tradicional tenía como objetivo proporcionar cera y miel (la cual era un alimento y medicina muy importante), por lo que este producto jugaba un papel relevante tanto económicamente como en el aspecto religioso (Cortopassi-Laurino M; 2006). Durante la época precolombina se reconocen cuatro zonas principales donde tuvo gran auge la meliponicultura: 1) La Península de Yucatán, 2) La costa del Golfo de México, 3) La costa del Pacífico entre los actuales Estados de Jalisco y Sinaloa y 4) La cuenca del Río Balsas, principalmente en los actuales Estados de Guerrero y Michoacán (Bennett C, 1964; Hendrichs P, 1941; Kent R, 1984).



**Figura 4: Meliponicultura tradicional prehispánica en México. Fuente: Reyes González A. (2013).**

En la actualidad, las prácticas de la meliponicultura mesoamericana deben ser consideradas como una fuerte y persistente cultura de los pueblos indígenas y campesinos. La presencia de estas técnicas a través del tiempo ha sido documentada hasta la actualidad, donde actualmente se lleva a cabo esta técnica entre los mayas de la península de Yucatán (González-Acereto JA, 2005), los Nahuas y Totonacas de la Sierra Norte de Puebla, en el sur de Veracruz (Popolucas), (Foster GM, 1942) y en el Istmo de Tehuantepec (Zapoteco, Mixe, Zoque, Nahuas y Popolucas), (Vásquez-Dávila M, 1991). Basados en el artículo de González-Acereto (González-Acereto JA, 2005), en la península de Yucatán y en el sur de México, el uso tradicional de varias especies de abejas sin aguijón **todavía persiste, la más representativa es "Xunan-cab" (Melipona Beecheii)**, la más importante especie trabajada cuya miel y polen se utilizan en medicina tradicional y comercio regional.



**Figura 5: Representación maya de la abeja "Xunan-cab" (Melipona Beecheii), (Quezada Euan, 2011).**

Los pueblos de la Sierra Norte, Náhuatl y Totonaca en Puebla, administran la "*Pisil-nejmej*" (*Scaptotrigona Mexicana*), que tiene una importante comercialización regional debido a que se le atribuyen propiedades medicinales (Foster GM, 1942).



**Figura 6: Scaptotrigona mexicana ("Yakeme" en náhuatl). (2014).**

En estas regiones, organizaciones civiles e instituciones académicas han colaborado en la documentación, el rescate tradicional de la meliponicultura y han innovado con técnicas y materiales modernos. Es de vital importancia aplicar estas técnicas y materiales innovadores en los Estados del sureste de Tabasco y Chiapas (Guzmán-Díaz, 2004), así como en las áreas de la costa del Estado de Guerrero, donde se han registrado dos especies (*Melipona Fasciata* y *Scaptotrigona Hellwegeri*) que es trabajado por personas nahuas en un pueblo de Atoyac de Álvarez (González-Acereto, 2005).



Un total de 46 especies de 11 géneros han sido registradas en México, 12 de ellas (casi 26%) son endémicas del país. Las abejas sin aguijón están asociadas principalmente a climas de bosques tropicales seco y húmedo, en las tierras bajas y cálidas aunque algunas especies se pueden encontrar en bosques de niebla y bosques de pino y encino en tierras altas.

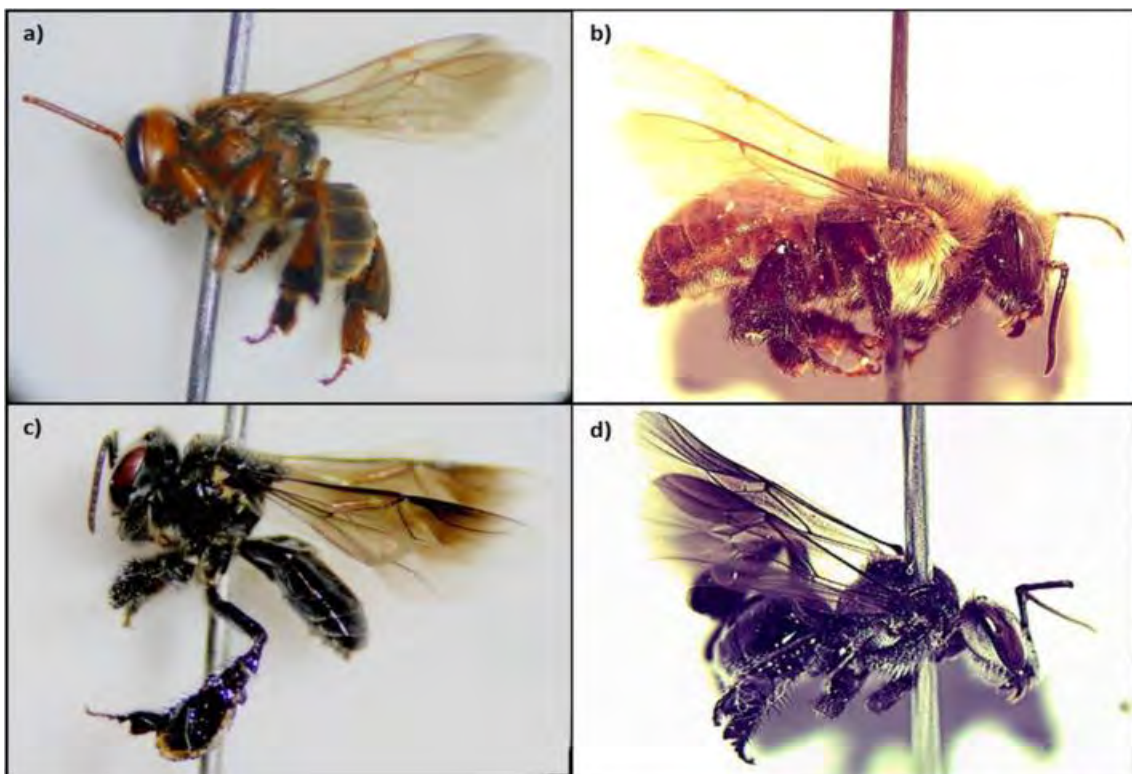
Particularmente, en la región centro occidental de México; existe una gran variedad y endemismo de abejas sin aguijón; se han registrado sobre todo en tres zonas principales: la Costa del Pacífico, la zona montañosa de la Sierra Madre del Sur y la Cuenca del Río Balsas. (Ayala R, 1999). De las 46 especies de abejas sin aguijón descubiertas en México, 19 de ellas se utilizan en la actualidad para diversas actividades o usos; entre los más importantes se encuentran la polinización de cultivos, la miel, el polen y el cerumen aplicados como: alimento, medicamento y para artesanías y arte popular.

Por ejemplo, un grupo de meliponicultores michoacanos de la región del Balsas trabaja principalmente con las abejas bermejas (*Scaptotrigona hellwegeri*) y la Colmena real (*Melipona fasciata*), las cuales se encuentran solamente en las zonas templadas del bosque de encino y pino, siendo una de las dos especies de montaña que existen en México (Ayala R, 1999). Otras especies que son criadas y se aprovechan en la región del Balsas son las que se plantean en la Tabla 1.

**Tabla 1: Lista de especies y nombres locales de abejas criadas y manejadas por los meliponicultores de la región del Balsas.**

<b>Nombre común en el Balsas, Michoacán, México</b>	<b>Especie</b>
1. Abeja bermeja	<i>Scaptotrigona hellwegeri</i> Friese, 1900
2. Abeja zopilota	<i>Frieseomelitta nigra</i> Cresson, 1878
3. Abeja real	<i>Melipona fasciata</i> Latreille, 1811
4. Abeja esculcona	<i>Partamona bilineata</i> Say, 1837
5. Abeja trompetera	<i>Nannotrigona perilampoides</i> (Cresson, 1878).
6. Abeja zapito	<i>Plebeia</i> sp

\*Fuente: Reyes-González A. (2014)



**Figura 7: Abejas sin aguijón de la región del Balsas: a) *Scaptotrigona hellwegeri*, b) *Melipona fasciata*, c) *Frieseomelitta nigra* y d) *Geotrigona acapulconis*.** Fuente y fotografía: Reyes-González A. (2014).

Aunque es reconocida como una región importante en términos de la diversidad y la cultura de las abejas sin aguijón, la cuenca del Río Balsas es actualmente pobre en información sobre la riqueza que proporciona cada especie de abeja sin aguijón y la calidad de la miel de dichas abejas. Por lo cual es muy importante para esta región tener información sobre las propiedades fisicoquímicas de la miel y algunos otros conocimientos adicionales.

Todos estos conocimientos principalmente pueden ayudar a la conservación de estas especies que son de vital importancia en el ecosistema de estos lugares. Por otro lado, puede apoyar a las comunidades que trabajan de forma tradicional a llevar a cabo esta actividad de manera más controlada y también a fomentar un comercio informado de los productos de estas abejas, que daría un precio más proporcional a la calidad de los productos y con esto ayudar a la gente de estas regiones a seguir subsistiendo, manteniendo y mejorando esta actividad precolombina.

### **3.2.2. Propiedades medicinales de la miel de abejas *Meliponini.***

De manera local a la miel y los derivados de las abejas sin aguijón, se les asignan propiedades farmacológicas y medicinales, desde la época precolombina hasta el día de hoy. Hasta el momento los únicos productos que el grupo mencionado anteriormente de meliponicultores de la región del Balsas, obtiene de manera natural sin procesar y sin control químico de calidad, son la miel, el polen y los cerúmenes.



**Figura 8: Prácticas de extracción local para la obtención de productos de las abejas sin aguijón. a)** Extracción con hacha buscando el nido, **b)** Productos de abejas sin aguijón: Miel (H), cera (W) y polen “pasacuareta” (P). Fuente Reyes González A. (2014).

De los productos del meliponario, la miel se utiliza como alimento pero su principal uso es el medicinal para afecciones oculares, dolores musculares y heridas cutáneas, así como también para enfermedades respiratorias y gastrointestinales ( Reyes-González, A. 2014). Estos usos que la gente da a la miel de manera local ha despertado el interés de investigarlos, por lo que se han reportado diversos artículos que reportan actividades antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, antiinflamatorias (Bolaños et al., 2008; Dardón, 2005; Dardón y Enríquez, 2008), y el tratamiento de afecciones respiratorias, gastrointestinales y oculares (Vit et al., 2008).

Los usos de estas mieles para tratamientos médicos son muchos, lo cual nos lleva a la necesidad de tener un control de calidad de estas mieles y de los propóleos, ayudados de algún tipo de regulación.

### **3.2.3. Normatividad de la miel de abejas *Meliponini*.**

Como se mencionó anteriormente en la introducción, la composición química de estas mieles depende de diversos factores entre ellos, la especie de abeja, la región geográfica, la época del año, la vegetación circundante y el clima. Esto hace que la normalización de estas mieles sea un reto bastante difícil de lograr debido a la diversidad de factores que intervienen en su composición. Sin embargo, la International Honey Commission (IHC) ha planteado adecuar los parámetros fisicoquímicos que indican la calidad en las mieles de *Apis* melífera a las mieles de *Apidae: Meliponini* (Vit, 2008).

En Centroamérica y Sudamérica, se han realizado varios estudios utilizando la normativa para *Apis* melífera a las mieles de abejas sin aguijón. Los parámetros que se determinan con mayor frecuencia son: HMF, Azúcares reductores, Acidez Libre, Conductividad, Humedad, pH, entre otros, (Almeida-Muradian, 2013; Gutiérrez et al., 2008; Vit P, 2009; Alarcón e Ibáñez, 2008; Dardón, 2005; Dardón y Enríquez, 2008). Sin embargo, debido a que la composición química de estas mieles depende de muchos factores la normativa de *Apis* melífera no es la adecuada para las abejas sin aguijón.

### **3.3. APIS MELÍFERA: Familia: APIDAE, Subfamilia: APINAE, Tribu: APINI y Genero: APIS.**

También conocida como abeja europea, abeja melífera o abeja africana. Es la especie de abeja con mayor distribución y fama en todo el mundo, debido a que es la mejor productora de miel, en cuestión de cantidad.

Originaria de Europa, África y parte de Asia, se introdujo a América posteriormente, en la época de la colonia. Son insectos sociales que viven en colonias aproximadamente de 30 a 60 mil individuos. Estas abejas han estado apegadas al hombre desde tiempos prehistóricos y con ellas se lleva a cabo una actividad comercial importante en nuestros días llamada Apicultura.



**Figura 9: *Apis melífera*. Ilustración digital.**

### **3.3.1. La Apicultura.**

La Apicultura es como se llama a la técnica de gestión de las abejas *Apis melífera*, esta actividad ha estado presente en el desarrollo humano desde épocas muy remotas. Existen registros de la colecta de miel hace más de 7000 años antes del nacimiento de Cristo; en culturas como la egipcia, mesopotámica o griega se han hecho hallazgos históricos que muestran los inicios en el manejo y control de las abejas *Apis melífera* con los que se da inicio a la apicultura (SAGARPA, 2009).

En América, esta actividad inició cuando los colonizadores españoles llevaron colmenas a Cuba en 1543 y los ingleses las introdujeron en el continente en 1617 (Jaime Lorén, 2003); hoy en día es una de las actividades agropecuarias de mayor importancia a nivel mundial.

En México la producción promedio de miel en los últimos ocho años fue de 56 mil 500 toneladas, lo que sitúa al país en el quinto lugar mundial por debajo de China, Argentina, Turquía y Ucrania.

Esta privilegiada posición se debe a los aumentos de consumo de miel y a la calidad del producto. La producción apícola en México está concentrada en Europa como primer comprador y Estados Unidos de Norteamérica como segundo, pero la diferencia entre las exportaciones está en esta razón: de cada 10 kilogramos que se exportan 8.2 van dirigidos a Europa y 1.5 kilogramos van dirigidos a E.U.A. (SAGARPA, Octubre 2014).

### **3.3.2. Composición química de la miel.**

La SAGARPA define la miel como la sustancia azucarada que las abejas producen a partir del néctar que recogen de las flores. Es el alimento básico de las abejas y a través de él adquieren energía necesaria para desarrollar todas las actividades de la colonia. Lo transportan a la colmena para ser almacenado y madurado con ayuda de sus propias abejas en los panales, constituyendo una reserva de alimento de donde las abejas obtienen las calorías necesarias para su vida.

La miel es una mezcla compleja de sustancias cuya composición varía con diversos factores como: flora de origen, zona de pecoreo de las abejas, zona geográfica, época del año, entre otras. (Gorgarovic et al., 2013; Acquarone et al., 2007). Aunque la miel tiene muchas sustancias, contiene principalmente agua, una mezcla de carbohidratos (en mayor proporción Glucosa, Fructosa y Sacarosa), diversas enzimas, minerales, ácidos orgánicos, aminoácidos, sustancias aromáticas, pigmentos, cera y polen (Crane E. 1992). En la tabla 2 Se presenta los contenidos aproximados, resultado de 492 muestras de miel (Bogdanov S., 2011).

**Tabla 2: Composición Química promedio de la miel en porcentaje respecto al total.**

	Miel de flores		Miel de mielada	
	Promedio	Min-Max	Promedio	Min-Max
<b>Contenido de agua</b>	17.2	15-20	16.3	15-20
<b>Fructosa</b>	38.2	30-45	31.8	28-40
<b>Glucosa</b>	31.3	24-40	26.1	19-32
<b>Sacarosa</b>	0.7	0.1-4.8	0.5	0.1-4.7
<b>Otros disacáridos</b>	5.0	28	4.0	16
<b>Melecitosa</b>	<0.1		4.0	0.3-22
<b>Erlosa</b>	0.8	0.56	1.0	0.16
<b>Otros oligosacáridos</b>	3.6	0.5-1	13.1	0.1-6
<b>Azúcares totales</b>	<b>79.7</b>		<b>80.5</b>	
<b>Minerales</b>	0.2	0.1-0.5	0.9	0.6-2
<b>Amino ácidos, proteínas</b>	0.3	0.2-0.4	0.6	0.4-0.7
<b>Ácidos</b>	0.5	0.2-0.8	1.1	0.8-1.5
<b>pH</b>	3.9	3.5-4.5	5.2	4.5-6.5

### **3.4. PROPÓLEOS.**

Otro producto derivado de las abejas, de mucho interés desde que el hombre empezó a manejar a las abejas son los propóleos. La palabra "*propóleos*" es de etimología griega que deriva de la palabra "*propolis*" la cual significaba (*pro*: en defensa de y *polis*: ciudad; es decir "*en defensa de la ciudad*").



El propóleo es un término genérico usado para denominar el material resinoso y balsámico colectado y procesado por las abejas melíferas a partir de fuentes vegetales, a las cuales se les agrega algunas enzimas (Bankova, 2005). Las *Meliponini* producen propóleos, los cuales están formados por cera, tierra y otros materiales que utilizan del entorno donde habitan; razón por la cual en muchos casos se les denomina geopropóleos (Nogueira-Neto, 1962; 1997). La actividad biológica de los propóleos de las *Meliponini* ha sido escasamente estudiada en México.

En las colmena tanto de *Meliponini* como de *Apis*, las abejas utilizan el propóleo con diversos fines, como: reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir, cerrar grietas, aislar restos de animales que se hayan introducido a la colmena, evitar vibraciones y barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes (Asís M, 1989; González Guerra y Bernal Méndez, 1997; Bedascarrasbure, 2011; Castaldo y Caspaso, 2002).

Esta última aplicación como desinfectante es una característica muy útil para los seres humanos y ha sido aprovechada desde tiempos antiguos. En años recientes los investigadores han dedicado muchos artículos al estudio de la composición química y las aplicaciones farmacológicas y terapéuticas del propóleo (Bankova, 2005; Bankova et al., 2000).

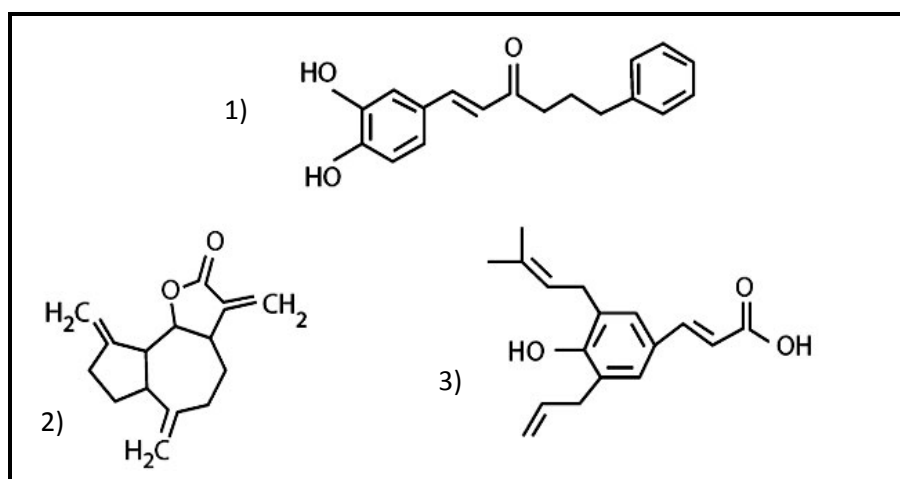


**Figura 10: Estructura interna de la colmena de meliponinas: a) ollas de almacenamiento de miel y polen (tarros o tarritos), b) Cera y c) enjambre, mazorca con huevera o agrios).** Fuente y fotografía: Reyes-González A. (2014)

### **3.4.1. Composición Química.**

Los propóleos en años recientes han captado la atención de los investigadores debido a las propiedades medicinales que han sido aplicadas desde tiempos antiguos (Popova et al., 2007). Se sabe que los propóleos fueron utilizados por estas propiedades desde las culturas más antiguas. La referencia más lejana del propóleo proviene del antiguo Egipto, donde sus sacerdotes eran los encargados de la medicina, la química y el arte de embalsamar los cadáveres; dentro de esta última actividad el propóleo era una de las sustancias más utilizadas. Las momias egipcias se han conservado hasta nuestros días, gracias a los propóleos. Los griegos lo usaban con fines médicos además de fabricar unos perfumes muy valiosos para ellos. (Asís, M. 1979; Asís, M. 1996).

El propóleo es una sustancia de composición compleja constituida por más de 300 compuestos, que se han descrito en los propóleos de diversos orígenes (Castaldo y Capasso, 2002; Pereira et al, 2002). Los principales componentes de los propóleos son: las flavonas, flavones y las flavononas. Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinamílico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y aminoácidos. (Walker, P y Crane, E. 1987; Propravko, S. A., 1975; Salatino et al., 2005).



**Figura 11: Estructuras de algunos compuestos químicos representativos de propóleos: 1) feniletíl éster del ácido caféico ,2) Dihidrocostus-lactona y 3) Ácido 3[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil]-2(E)-propenoico, que actúa como eficiente antioxidante.**

Fuente: (Nakanishi et al., 2003).

### **3.4.2. Propiedades medicinales.**

Como se mencionó anteriormente, desde los antiguos egipcios y griegos, se utilizaban los propóleos para fines médicos. En el primer libro médico, libro de preparación de medicamentos para todo el cuerpo humano, en el papiro de Ebers (que se escribió aproximadamente en el año 1700 a.C.), se menciona la cera y el propóleo como medicamentos.

Ha sido utilizado por casi todas las civilizaciones antiguas como: china, romana, hindú, persa, inca, maya, entre otras. (Asís, M. 1979; Asís, M. 1996).

En años recientes se han realizado diversos estudios de gran importancia que investigan sus aplicaciones médicas. Se han reportado resultados importantes en la reducción de células cancerígenas (Hernández et al., 2007; Ehara et al., 2011), como antileucémico (Murtala B. Abubakar, 2014), antiinflamatorio y cicatrizante (Bolaños et al., 2008; Viuda Martos, 2008), actividad antimicrobiana (Viuda Martos, 2008; Grange y Davey, 1990; Manrique y Santana 2008; Fisher et al., 2007) y actividad antioxidante (Beatriz Mello y Miriam D. Hubinger, 2012; Potkonjac et al., 2012; Blanca Rivero y Alejandra Martínez, 2014; Kumazawa et al., 2004).

Debido a esas atribuciones los propóleos se han convertido en un producto natural de mucho interés y un objeto de investigación en todo el mundo. (Popova M, 2007). En el mercado regional los propóleos se encuentran en forma de extractos de cantidades variables de etanol-agua y se utilizan para las diversas propiedades medicinales ya mencionadas. Se destaca para este trabajo la actividad antioxidante que tienen, lo cual hace que sea de gran interés investigar para fines médicos su empleo en la reducción del estrés oxidativo en las células humanas. (Castaldo y Capasso, 2002).

### **3.4.3. Actividad antioxidante.**

Las enfermedades modernas que hoy en día son motivos de investigación son las asociadas al estrés oxidativo como por ejemplo: Cáncer, diabetes, envejecimiento prematuro, hipertensión, leucemia, Parkinson, Alzheimer, entre otras.

El estrés oxidativo es causado cuando se presenta un desequilibrio en las células donde la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), presentan un importante aumento; este desbalance ocasiona efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo lípidos, proteínas y ADN.

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero en ese tiempo puede reaccionar con lo que esté a su alrededor causando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos; nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra virus y bacterias (Marcia A. y Mario S., 2006).

Aunque se sabe que varias son las fuentes generadoras de ERO, se considera que la mitocondria es la más importante (Floyd RA., 1994; Benzi G., 1995; García C., 1994); en la tabla 3 se indican los principales productores endógenos de especies reactivas del oxígeno (ERO).

**Tabla 3: Producción endógena de ERO.**

<b>Enzima o Sistema</b>	<b>ERO</b>
CTE: Coenzima Q, cit b <sub>566</sub>	O <sup>2-</sup>
NADH deshidrogenasa SOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Monoaminooxidasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
NADPH oxidasa (neutrófilos)	O <sup>2-</sup>
Xantinoxidasa	O <sup>2-</sup>
Reacción de Fenton	OH <sup>-</sup>
Óxido nítrico sintetasa	NO <sup>-</sup>

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos donde la célula anula la reactividad o inhibe la generación de ERO. (Greenwald 1990; Palamanda y Kehrer 1992).

Estos mecanismos son eficientes a la muy corta vida media de los radicales libres y son moléculas sencillas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos (no producidos por el cuerpo) provienen de los alimentos y dentro de este grupo se encuentran la vitamina E, la vitamina C y carotenoides. En la sangre la vitamina C es el antioxidante hidrosoluble más abundante y se le considera un antioxidante nutriente.

También se ha descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes como: los compuestos fenólicos del tipo de las isoflavonas, flavonoides, quercetina y polifenoles (Thornalley y Vasak, 1985).

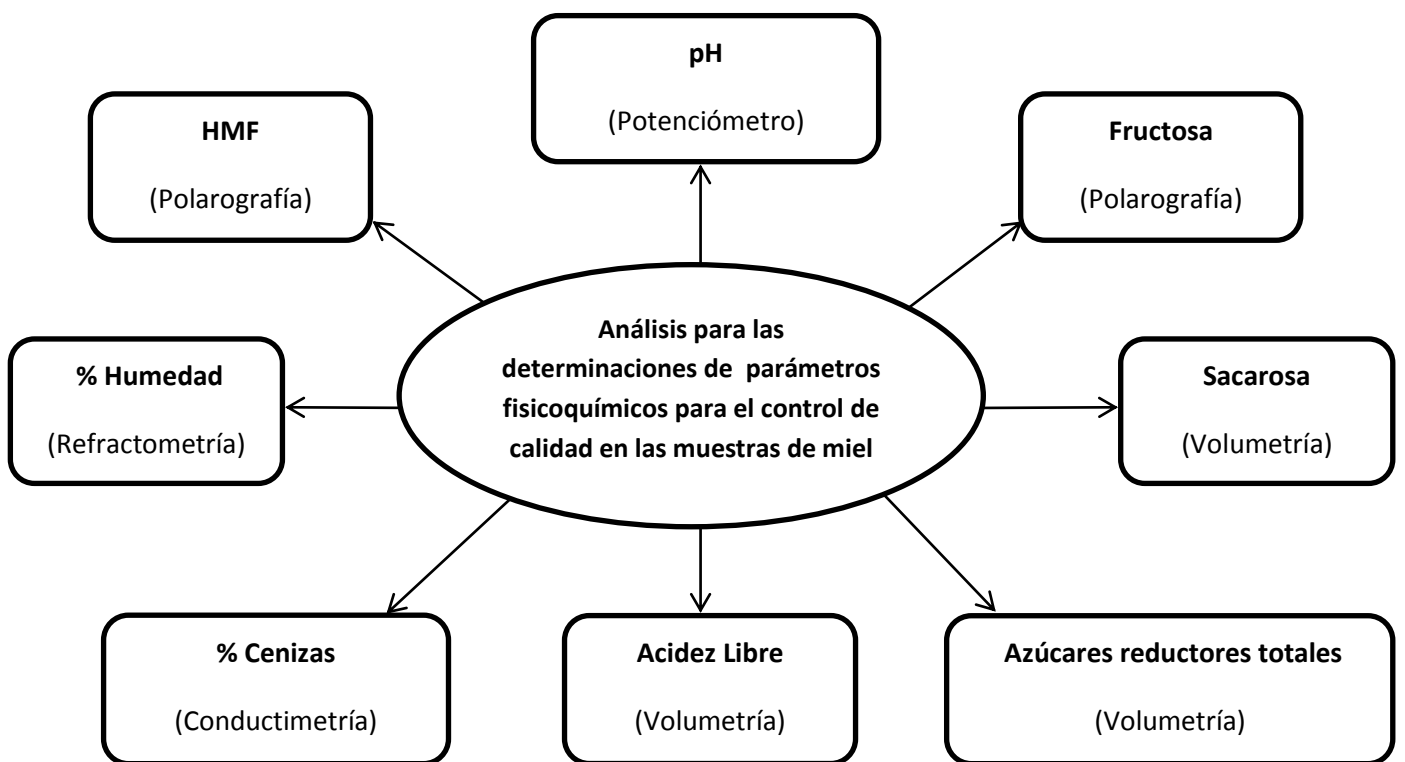
Estos descubrimientos científicos han motivado la investigación de más antioxidantes que pueden ser incluidos en la dieta del ser humano, por lo cual también se ha despertado el interés de conocer el contenido de estos compuestos en diversos alimentos ofrecidos para nuestro consumo.

La determinación de la capacidad antioxidante de algún producto podría considerarse también como un elemento de calidad o de vitalidad de dicho producto.

#### **4. METODOLOGIA.**

##### **4.1. Mieles.**

Diagrama de los análisis para las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos para el control de calidad de las muestras de miel.



A diferencia de las mieles de abeja *Apis* melífera, las mieles de abeja *Meliponini* se producen en mucha menor cantidad; esto es una fuerte limitante en la metodología ya que los diversos análisis deben llevarse a cabo con pocas cantidades de muestra.

Para solucionar esto para cada muestra de miel se hizo una disolución madre, de la cual se tomó una cierta cantidad para cada determinación. La disolución madre se elaboró de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente cuatro gramos de las mieles de meliponinas, se disolvieron y se llevaron al aforo con agua desionizada en un matraz aforado de diez mililitros.

#### **4.1.1. Determinación del porcentaje de Humedad.**

La norma mexicana de miel NMX-F-036 NORMEX 2006 establece que el cálculo de humedad se puede realizar mediante el método refractométrico de Wedmore, que determina la humedad a través de la medición de sólidos disueltos expresados en grados Brix. Se realiza con ayuda de un refractómetro, colocando una o dos gotas en el prisma del refractómetro, se enfoca y se ve directamente la escala (grados Brix). El refractómetro utilizado estaba calibrado a 20°C, por lo cual, si la medición se hace a una temperatura distinta, se debe aplicar el siguiente factor de corrección.

Para temperaturas mayores a 20°C se suma a la medición obtenida con el refractómetro 0.00225 por cada grado Celsius.

Para temperaturas menores a 20°C se resta a la medición obtenida con el refractómetro 0.00225 por cada grado Celsius.



**Figura 12: Refractómetro ATAGO modelo N-3E empleado para la determinación de humedad en miel.**



#### 4.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas.

La conductividad eléctrica en miel, está dada por la cantidad de sustancias minerales presentes en la muestra. Se puede establecer esta relación debido a que las cenizas (sustancias minerales) en medio acuoso se transforman en iones capaces de conducir la electricidad.

La **conductividad específica** ( $\chi_i$ ), de una solución cualquiera es la medida de la facilidad con la que la corriente eléctrica fluye a través de dicho sistema y depende de la concentración de cada especie conductora (es decir la cantidad total de iones en la solución) y la temperatura.

Esta determinación se hizo utilizando un conductímetro, el cual mide la conductancia (L). Pero la conductancia (L) se transforma en **conductividad específica** ( $\chi_i$ ) de manera sencilla, solamente se multiplica la conductancia (L) por el valor de la constante de celda del aparato ( $K_c$ ).

$$L = \frac{\chi_i}{K_c} \quad \text{despejando} \quad \chi_i = L \times K_c$$

La conductividad de la miel está relacionada con el porcentaje de cenizas de la misma. Se ha propuesto una ecuación matemática que relaciona directamente estos 2 parámetros (Volwohl, 1964; Piazza et al., 1991).

$$\chi_m = 1.74 A + 0.14 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

$\chi_m$  es la conductividad específica de la miel expresada en mS/cm.

$A$  es el porcentaje de cenizas de la miel.

Al despejar el porcentaje de cenizas de la miel se obtiene:

$$A = \frac{Xm - 0.14}{1.74} \times 100 = \% \text{ Cenizas} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Para la determinación del porcentaje de cenizas, se tomó 1.25 mL de la disolución madre de cada una de las muestras y se llevó al aforo con agua desionizada en un matraz aforado de 5.0 mL. A cada una de las muestras se les midió la conductancia a temperatura ambiente. Para obtener el valor de conductancia de la miel, fue necesario restar el valor de la conductancia del agua desionizada utilizada, este valor de conductancia del agua es el mismo para todas las muestras pues todas se prepararon con el mismo lote de agua desionizada.

El valor de conductancia del agua se restó al de la disolución de miel y así se obtuvo el valor de la conductividad específica de la miel, valor que se sustituye en la ecuación 2.

#### **4.1.3. Determinación de pH.**

Para esta determinación se utilizó la misma disolución elaborada para determinar el porcentaje de cenizas (1.25 mL de solución madre y llevada a un aforo de 5.0 mL con agua desionizada). Se calibró la sonda de vidrio con disoluciones amortiguadoras de pH=4, pH=7 y pH=10. El valor de pH se mide directamente en el equipo.

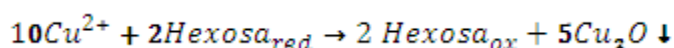
Es importante realizar esta medición en el momento en que las disoluciones fueron preparadas ya que si no se hace de esta manera puede ocurrir que la solución fermente y eso altere el resultado de la medición. Esto se debe a que, al agregar agua a la miel se favorece el desarrollo de microorganismos, los cuales pueden fermentar los azúcares de la miel con una consecuente alteración del pH.

#### 4.1.4. Determinación de azúcares reductores en miel.

Para esta determinación, se empleó el método de Fehling; este análisis para azúcares reductores está especificado en la Norma Mexicana de Miel. Este método consiste en valorar el cobre (II) presente en la solución del reactivo A de Fehling (Sulfato de Cobre,  $\text{CuSO}_4$ ), en medio alcalino del reactivo B de Fehling (Tartrato de sodio y potasio con  $\text{NaOH}$ ) a temperatura de ebullición o cercana, con una disolución de miel.

Como se conoce la estequiometría de la reacción con hexosas reductoras, la valoración se sigue de manera potenciométrica con ayuda de un electrodo de cobre (alambre de cobre) y un electrodo de referencia ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ), conforme al procedimiento de medición propuesto por Preza de la Vega J. y Reyes O. 2007.

De las hexosas reductoras, la mayor parte son fructosa y glucosa, aunque pueden encontrarse en proporciones menores otros azúcares reductores. (White y Doner, 1980). De manera general la reacción de hexosas reductoras con el ion cúprico sucede de la siguiente manera:



El reactivo A de Fehling (Sulfato de cobre) utilizado para estas determinaciones fue valorado previamente con EDTA, que fue valorado con una solución de cobre electrolítico 99.5% de pureza; esta solución fue tomada como patrón primario para titular el EDTA. La concentración que se encontró para el reactivo A de Fehling fue de  $0.261 \text{ molL}^{-1}$ . Ya obtenida esta concentración se procedió a realizar la determinación de azúcares reductores.

Para esta determinación se tomó de la disolución madre de cada muestra de miel, 1.0 mL y se llevó al aforo, con agua destilada en un matraz aforado de 100.0 mL. De esta solución se tomaron 40.0 mL para la determinación de sacarosa, el resto de la solución se utilizó para esta

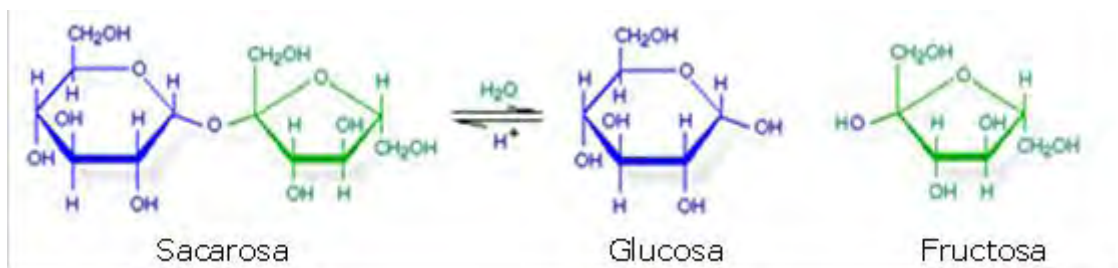
determinación por lo cual se colocó en una bureta de 25.0 mL. Aparte, en un vaso de precipitados de 30 mL se colocaron 2.0 mL de reactivo A y 2.0 mL de reactivo B de Fehling, se agregó una gota de azul de metileno 1% como indicador y se adicionó agua destilada hasta cubrir el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el electrodo de trabajo (alambre de cobre); después se puso a calentar hasta ebullición y posteriormente se procedió a analizar las soluciones de miel de cada muestra que se colocaron en la bureta de 25.0 mL. Para localizar el punto de equivalencia se tienen 2 formas: el viraje del indicador azul de metileno y de manera potenciométrica, al medir los valores del potencial de equilibrio en el curso de la titulación.

#### **4.1.5. Determinación de Sacarosa.**

La sacarosa es un disacárido que está compuesto por una molécula de fructosa y una de glucosa unidas por un enlace glucosídico; la sacarosa no presenta poder reductor, por lo cual no se puede determinar por el método de Fehling de manera directa.

Para cuantificarla, la sacarosa se debe hidrolizar para romperse en fructosa y glucosa, los cuales sí presentan poder reductor y pueden ser determinadas por el método de Fehling.

Existen diversas maneras de hidrolizar la sacarosa una puede ser por ácidos diluidos o por enzimas como por ejemplo la sacarasa (invertasa). La formación de glucosa y fructosa será proporcional al contenido de sacarosa, es decir, una molécula de sacarosa hidrolizada dará una molécula de fructosa y una molécula de glucosa. El método que se utilizó fue el de la hidrólisis ácida.



**Figura 13: Hidrólisis de la sacarosa.**

Esta determinación se hizo con los 40.0 mL, de la solución que se utilizó para determinar azúcares reductores (1.0 mL de la disolución madre disuelto con agua destilada y llevado al aforo a 100.0 mL). Estos 40.0 mL se colocaron en un matraz aforado de 50.0 mL y se adicionaron 10 gotas de HCl concentrado, se dejó en reposo 24 horas aproximadamente y después se llevó al aforo con agua destilada.

Esta disolución se valoró por el método de Fehling, por lo cual, colocamos la solución de miel en la bureta. Se repitió el mismo procedimiento que en la determinación de azúcares reductores. La determinación del contenido de sacarosa, se hizo restando el resultado de la determinación de azúcares reductores (explicado anteriormente) al resultado de esta determinación.

La metodología empleada fue comprobada experimentalmente con otros trabajos en el mismo laboratorio (Preza de la Vega J.; Reyes O., 2007); en particular, la cantidad de ácido, otras disoluciones conocidas agregadas y el tiempo de espera.

#### **4.1.6. Determinación de Acidez libre, láctónica y total.**

La determinación de acidez en muestras de miel es un problema muy complejo ya que la miel es una matriz que contiene compuestos muy diversos que varían dependiendo de factores como: la flora de origen, zona de pecoreo de las abejas, zona geográfica, época del año, etc.

Así pues, las especies químicas que aportan protones a la miel e intervienen en los equilibrios ácido-base, al estar en distintas concentraciones y tener pKa distintos, dificultan de manera significativa la homogenización de puntos finales de acidez libre y láctónica. La acidez total en la miel puede ser explicada por la presencia de ácidos orgánicos, lactonas o por ésteres internos y algunos iones inorgánicos, posiblemente fosfatos.

Para la miel se consideran tres tipos de acidez: libre, láctónica y total. La diferencia entre la acidez libre y láctónica se debe al hecho de que algunos ácidos de la miel son hidroxilos, es decir, son ácidos y alcoholes a la vez. En este tipo de compuestos, y en los casos en que es posible la formación de un anillo de cinco o seis miembros, se produce una esterificación intermolecular en medio ácido, lo que produce espontáneamente un éster cíclico que se conoce como lactona.

El tratamiento con base (para producir la hidrólisis del éster) abre rápidamente el anillo láctónico para producir una sal de cadena abierta. La acidez total es la suma de la acidez libre y la láctónica. Existe una relación entre estos 3 tipos de acidez, el pH y el origen botánico de la miel. Para abejas *Apis* melífera se ha descrito cómo las mieles de pH más elevados suelen tener una menor acidez láctónica (Susana y Mercedes Sanz Cervera; 1994.; White et al., 1962).

La alteración de la miel por microorganismos supone un aumento en el contenido en ácidos libres. Por ello, la legislación mexicana a través de la Norma de calidad de la miel NMX-F-036-NORMEX-2006, prohíbe la comercialización de miel de *Apis* melífera destinada a consumo directo que presente una acidez libre superior a 40 meq/Kg, así como cualquier cambio artificial de la acidez.

Sin embargo, son muchas las investigaciones en la que se han analizado mieles de calidad que, sin presentar ningún indicio de contaminación microbiana poseen valores de acidez libre superiores al límite marcado por la norma (Demianowicz, 1971; Borque, 1982; Riobos, 1990). Los mayores valores de acidez libre para mieles de abejas *Apis* melífera, son encontrados en mieles denominadas de mielada o de bosque, es decir, aquellas producidas por las abejas a partir principalmente de secreciones azucaradas de las partes vivas de las plantas o que se encuentran sobre ellas, no del néctar de las flores.

El contenido de acidez libre puede ser una medida indirecta de la frescura de la miel, aun cuando existen parámetros más directos y más confiables para cerciorarse de la frescura de una miel. La acidez libre expresa la acidez independientemente de los ácidos presentes. Se ha encontrado que el ácido Glucónico es el más abundante y como su nombre lo indica procede principalmente de la descomposición de la glucosa, debido a la acción de la enzima glucosa oxidasa presente de manera natural en la miel. Como producto intermedio de esta descomposición se produce gluconolactona, la cual influye también en la concentración de la acidez (Mato I. y Huidobro F., 1997).

Para la determinación de acidez libre y lactónica se preparó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) aproximadamente  $0.01 \text{ molL}^{-1}$ . Para tener un valor más exacto de la concentración de NaOH, se valoró con biftalato de potasio (patrón primario); se obtuvo una concentración de  $0.01041 \text{ molL}^{-1}$  para la primera solución de hidróxido de sodio y  $0.01096 \text{ molL}^{-1}$  para la segunda. La sosa ya valorada, se colocó en la bureta de 10.0 mL y se procedió a valorar cada muestra de miel; para esto se tomó de la solución madre de cada muestra 0.5 mL en un vaso de precipitados de 20 mL, se adicionó agua desionizada cubriendo el electrodo del potenciómetro y se colocó con agitación contante, para medir de manera correcta el pH.

Y se procedió a titular adicionando de 0.1 mL en 0.1 mL la solución de sosa para tener una curva de valoración ácido-base de cada muestra de miel y así poder determinar la acidez libre y la láctónica.

#### **4.1.7. Determinación de Fructosa y HMF.**

El HMF y la Fructosa se cuantifican por electroquímica analítica, estos métodos se encuentran reportados en la literatura y han sido comprobados (Reyes-Salas et al 2006; Heyrovsky, J., Zuman, P., 1968). Por polarografía (técnica voltamperométrica que utiliza el electrodo de gota de mercurio) se detectaron las señales de reducción que dan tanto el HMF como la Fructosa.

Estos métodos electroquímicos nos permiten mejorar las cualidades analíticas de las determinaciones (precisión, reproducibilidad, exactitud, etc.) y también los tiempos de análisis. La determinación de fructosa se realiza con una señal de reducción directa de la fructosa; en las condiciones de trabajo la glucosa no interfiere.

La cuantificación de HMF y fructosa presentes en la miel, se realizan por Polarografía Diferencial de Impulsos (abreviado PDI o también DPP), en condiciones en que se tiene la reducción directa del HMF y de Fructosa, con las ventajas analíticas mencionadas pero además, a diferencia de los otros métodos comúnmente empleados para su cuantificación, el método electroquímico, al ser directo, elimina todas las imprecisiones clásicas de reacciones químicas de derivatización o transformación previa. Por otro lado, al no emplear reactivos químicos diferentes se bajan costos y riesgos a la salud que algunos de esos reactivos involucran. Las cantidades de HFM y fructosa en la miel se determinaron por el método de adiciones patrón (Gazcón Orta N.E., 2012; Reyes Salas E. O. y Gazcón Orta N.E, 2014).



Para la determinación de fructosa se utilizó como electrolito soporte 10 mL de una disolución de  $\text{CaCl}_2$   $1 \text{ molL}^{-1}$  con un barrido de potencial de -1000mV a -2100mV y una velocidad de barrido de 5mV/s. Se trazó la curva residual; una vez finalizado, se adicionaron directamente 50  $\mu\text{L}$  de la solución madre de miel. La disolución patrón de fructosa fue de concentración  $0.01824 \text{ molL}^{-1}$  en agua desionizada; esta disolución fue valorada previamente por medio del método de Fehling utilizando el mismo procedimiento que en la determinación de azúcares reductores (mencionada anteriormente), solamente se cambió la solución de miel en la bureta por la solución de fructosa. A los 10mL de electrolito soporte se agregaron 100mL de la muestra y se hicieron adiciones del patrón de fructosa de 100 $\mu\text{L}$  en 100 $\mu\text{L}$ ; se trazaron los respectivos polarogramas.

Para la determinación de HMF se utilizó como electrolito soporte 10 mL de una solución amortiguadora de Boratos a pH=10 con un barrido de potencial de -1000mV a -2100mV y una velocidad de barrido de 5mV/s., Se trazó la curva residual, y luego se adicionaron directamente 500  $\mu\text{L}$  de la solución madre de miel; si no se llega a ver señal se adicionan nuevamente 500  $\mu\text{L}$ , si no se observa señal no se adiciona mas solución de miel. El estándar empleado para las adiciones patrón fue: una solución patrón de HMF con concentración 1261.1 ppm en **agua desionizada de la cual se agregaron de 10  $\mu\text{L}$  en 10  $\mu\text{L}$**  y se trazaron los respectivos polarogramas; si no se llega a ver señal en las adiciones de la muestra solamente se adiciona HMF patrón para corroborar que el contenido de HMF en esa muestra de miel está por debajo del límite de detección de la metodología.

## 4.2. PROPÓLEOS.

Según el procedimiento elaborado por Octavio Reyes Salas y Diego Francisco Chicas Baños (2014), se plantea una metodología para la determinación de la actividad antioxidante en los extractos de propóleo dividida en 3 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. Por otro lado se plantea en esta tesis la determinación de azúcares reductores en propóleos utilizando el método de Fehling.

### 4.2.1. Descripción de los propóleos.

Se estudiaron 8 propóleos de distinta especie de abeja y distinta procedencia. Los datos de colección y procedencia se resumen en la tabla 4:

**Tabla 4: Información de las muestras de los distintos propóleos analizados.**

<b>Propóleos</b>	<b>Fecha de Colecta</b>	<b>Información</b>	<b>Método de Colección</b>
<b>P1</b>	Mayo, 2015	Melipona Fasciata Latreille, 1811. Cuenca del Balsas, Michoacán, México.	Raspado
<b>P2</b>	Mayo, 2015	Plebeia sp Cuenca del Balsas, Michoacán, México.	Raspado
<b>P3</b>	Mayo, 2015	Nannotrigona Perilampoides Cresson, 1878. Cuenca del Balsas, Michoacán, México.	Raspado
<b>P4</b>	Mayo, 2015	Scaptotrigona Hellwegeri Friese, 1900. Cuenca del Balsas, Michoacán, México.	Raspado
<b>P5</b>	Mayo, 2015	Apis melífera Yotatiro, Michoacán México.	Raspado
<b>P6</b>	Junio, 2008	Apis melífera, Rancho "Los ahogados", Michoacán, México.	Raspado
<b>P7</b>	2013	Apis melífera, Cordillera del Bálsamo, El Salvador.	Trampa
<b>P8</b>	Enero, 2013	Apis melífera, Rancho "San Pedro", Yucatán México.	Raspado

#### **4.2.2. Estudio electroquímico de la reacción del triyoduro con reductores.**

El procedimiento consiste en medir la concentración del complejo triyoduro, para la determinación de la actividad antioxidante. La concentración del complejo triyoduro se mide a través de la intensidad de su señal de reducción en un electrodo de disco giratorio de platino. Este se considera un método directo ya que se observa la señal de la onda voltamperométrica del sistema  $I_3^-/I^-$ . Se realizaron valoraciones voltamperométricas con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y Ácido ascórbico que son compuestos antioxidantes comunes.

Como se indica en la tesis de Chicas Baños (2014), se realizó un análisis electroquímico en el que se estableció la relación directa entre la corriente límite de reducción de la especie  $I_3^-$  y su concentración en la celda del Polarógrafo. Se utilizó como electrolito soporte  $LiNO_3$   $0.1 \text{ molL}^{-1}$ . Al agregar el antioxidante a la celda con el triyoduro, la concentración de yodo disminuye.

#### **4.2.3. Estudio para la extracción de propóleos.**

Para determinar una manera más efectiva de extraer los componentes que le asignan la propiedad antioxidante a los propóleos, se realizó un estudio con 3 propóleos de distinta procedencia a los cuales se le hicieron ocho extracciones con una mezcla compuesta de 70% etanol y 30% agua (v/v). Algunos estudios han demostrado que la mayoría de los compuestos fenólicos y flavonoides se extraen cuantitativamente en esta mezcla (Park e Ikegaki, 1998).

Para esto se pesaron aproximadamente 3.0 g de propóleo y se colocaron en un vaso de precipitados, se realizaron las ocho extracciones durante dos horas cada vez, con 10.0 mL de mezcla hidroetanólica, a temperatura ambiente y con agitación constante, una

vez acabado el tiempo de extracción el extracto obtenido se colocó en un matraz aforado de 25.0 mL y se llevó al aforo.

Con esto se buscó conocer el coeficiente de reparto de la extracción con la mezcla hidroetanólica y así poder obtener una metodología adecuada para la extracción de más componentes con propiedades antioxidantes a los propóleos, con un menor gasto de disolvente.

#### **4.2.4. Determinación de actividad antioxidante en extractos de propóleos.**

Con las condiciones experimentales bien definidas, basados en los resultados del estudio electroquímico de la reacción del yodo con ácido ascórbico y DPPH, se realizaron titulaciones voltamperométricas del yodo ( $I_3^-$ ) con los extractos de propóleos; es decir, se definieron los parámetros de la celda electroquímica como la velocidad de barrido, potencial inicial y final con ayuda del estudio electroquímico antes mencionado.

#### **4.2.5. Determinación de azúcares reductores en propóleos.**

Para esta determinación, se empleó el método de Fehling, de manera distinta a la determinación de azúcares reductores en la miel, ya que la concentración de azúcares reductores en los propóleos es mucho menor que en la miel, por esto se procedió a hacer la titulación de Fehling de la siguiente manera:

Por un lado, se preparó un extracto de propóleos como se describe a continuación: se pesaron aproximadamente 5.0 g de propóleos y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL, se agregaron 20 mL de

agua destilada y se dejaron a temperatura ambiente y agitación constante durante 3 horas.

Después de estas 3 horas, se filtró el extracto y las aguas madres se colocaron en un matraz de 25.0 mL y se llevó a la marca con agua destilada. Los extractos en los propóleos analizados se elaboraron con agua destilada, ya que los azúcares reductores son solubles en agua evitando así extraer otros compuestos reductores, que pudieran interferir en la determinación que se desea.

Para la titulación de Fehling, en un vaso de precipitados de 50 mL se adicionó 1.0 mL de sulfato de cobre (Reactivo A) y 1.0 mL de tartrato de sodio y potasio (Reactivo B), se agregó una gota de azul de metileno 1% como indicador y se adicionó agua destilada hasta cubrir lo necesario el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el electrodo de trabajo (alambre de cobre), después se puso a calentar hasta ebullición y se adicionó lentamente el extracto de propóleo como se describió anteriormente.

Los azúcares reductores del extracto reaccionan con el Cu (II) y el exceso de Cu (II) se tituló con una disolución de glucosa patrón  $0.1304 \text{ molL}^{-1}$ . Una vez conocido el volumen necesario de glucosa para alcanzar el punto de equivalencia y conociendo las concentraciones tanto de glucosa como de sulfato de cobre II se puede conocer el porcentaje de azúcares reductores en los gramos de propóleo pesado.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL.

### 5.1. REACTIVOS.

**Tabla 5: Reactivos.**

<b>Reactivo</b>	<b>Pureza</b>	<b>Marca comercial</b>
Fructosa	R.A. (99%)	Sigma Aldrich
Cloruro de calcio	R.A.	Mallinckrodt
Hidroximetilfulfuraldehido (HMF)	R.A.	Sigma Aldrich
Ácido Bórico	R.A.	Analytyka
Bórax (Borato de Sodio)	R.A.	J.T.Baker
Sulfato de cobre pentahidratado	R.A.	J.T.Baker
Tartrato de sodio y potasio	R.A.	J.T.Baker
Azul de metileno	R.A.	G:T: Gury
Yoduro de Potasio	USP	Are Quim. S.A. de C.V.
1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	R.A.	Sigma Aldrich

### 5.2. EQUIPOS.

- pH metro "827 Metrohm".
- Conductímetro "644 Metrohm".
- Balanza Analítica "Mettler AE 240".
- Refractómetro "Atago N-3E".
- Parrilla de calentamiento y agitación "Corning".
- Milivoltímetro "Tacussel électronique tipo S6N".
- Polarógrafo "Radiometer Analytical MDE 150".
- Módulos "VoltaLab PST 050" y "TraceLab POL 150"
- Electrodo de trabajo:
  - Electrodo de gota de mercurio.
  - Electrodo de disco giratorio de platino.

### 5.3. MUESTRAS.

El formato que se utilizó para identificar cada muestra de miel considera varios criterios; se toma como ejemplo la primer muestra. Con la primera letra se especifica la tribu de la abeja (Ejemplo: **(M)** de *Meliponini*), La segunda y tercera letras especifican la especie de abeja (si se conoce la especie, es decir es opcional; Ejemplo: **(Mf)** *Melipona fasciata Latreille*). Las siguientes 3 a 4 letras especifican el Estado o país donde se originan las mieles (Ejemplo: **(Mich)** de Michoacán) y para el caso de las mieles colectadas en la cuenca del Balsas se especifica la temporada de colecta (Ejemplo: **(P)** de Primavera); por último se le da un número consecutivo y único a cada muestra para su mejor diferenciación (en este caso es **1**).

Ejemplo completo: **MfLMichP1**.

**Tabla 6: Información de las muestras de las distintas mieles.**

<b>Muestra de miel</b>	<b>Información</b>
<b>MMfMichP1</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Melipona fasciata Latreille</i> ) Michoacán, colecta primavera 2014, cuenca del Balsas
<b>MMfMichO2</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Melipona fasciata Latreille</i> ) Michoacán, colecta otoño 2014 cuenca del Balsas
<b>MPIMichP3</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Plebeia sp</i> ) Michoacán, colecta primavera 2014, cuenca del Balsas
<b>MPIMichO4</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Plebeia sp</i> ) Michoacán, colecta otoño 2014 cuenca del Balsas
<b>MShMichP5</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Scaptotrigona hellwegeri Friese</i> ) Michoacán, colecta primavera 2014, cuenca del Balsas.
<b>MShMichO6</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Scaptotrigona hellwegeri Friese</i> ) Michoacán, colecta otoño 2014 cuenca del Balsas

<b>Muestra de miel.</b>	<b>Información</b>
<b>MNpMichP7</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Nannotrigona perilampoides Cresson</i> ) Michoacán, colecta primavera 2014, cuenca del Balsas.
<b>MNpMichO8</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Nannotrigona perilampoides Cresson</i> ) Michoacán, colecta otoño 2014 cuenca del Balsas.
<b>MHidH9</b>	Miel de abeja meliponina, Huejutla, Hidalgo. 2013.
<b>MMich10</b>	Miel de abeja meliponina, Michoacán.
<b>MMich11</b>	Miel de abeja meliponina, Comercial Marca: "Don Omar", Michoacán.
<b>MbnOax12</b>	Miel de abeja meliponina Nombre local: "Abeja bichillo o negrita". Oaxaca, Colectada: 12 de Abril del 2014.
<b>MMbOax13</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Melipona Beecheii</i> ). Oaxaca, Colectada: 12 de Abril del 2014.
<b>MSpOax14</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Scaptotrigona Pectoralis</i> ). Oaxaca, Colectada: 12 de Abril del 2014.
<b>MsmOax15</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Scaptotrigona Mexicana</i> ) Oaxaca, Colectada: 12 de Abril del 2014.
<b>MMbOax16</b>	Miel + polen de abeja meliponina ( <i>Melipona Beecheii</i> ) Oaxaca, Colectada: 12 de Abril del 2014.
<b>MMbOax17</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Melipona Beecheii</i> ). Meliponario "Don Emilio", Oaxaca.
<b>MPfOax18</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Plebeia Frontalis</i> ). Meliponario "Don Felix", Oaxaca.
<b>MMbOax19</b>	Miel de abeja meliponina ( <i>Melipona Beecheii</i> ). Meliponario "Don Manuel", Oaxaca.



<b>Muestra de miel</b>	<b>Información</b>
<b>AGuat20</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera. Guatemala. Colectada: 2014
<b>AGuat21</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera. Quetzaltenango, Guatemala. Colectada: 2014
<b>AGuat22</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera. Amatitlán, Guatemala. Colectada: 2014
<b>AGuat23</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera con canela. Comercial Marca: "Guatebec". Presentación en Frasco.
<b>AGuat24</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera con café. Comercial Marca: "Guatebec". Presentación en tubo de hule.
<b>AGuat25</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera con Canela. Comercial Marca: "Guatebec". Presentación en tubo de hule.
<b>ACHi26</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera, tipo Mantequilla. Marca: "Maya vicic". Chiapas. Colectada: otoño 2014.
<b>AMor27</b>	Miel de abeja <i>Apis</i> melífera, tipo Mantequilla. Morelos. Colectada: otoño 2014.

## **6. RESULTADOS.**

### **6.1. MIELES.**

#### **6.1.1. Humedad.**

La determinación de humedad se realizó con el refractómetro. Se colocaron 1 o 2 gotas de miel (sin tratamiento) en el cristal del instrumento. El refractómetro empleado estaba calibrado a 20°C; por lo que si alguna muestra de miel no fue determinada a esta temperatura se necesita aplicar un factor de corrección; se hace la resta a 100 del valor obtenido para poder expresar la humedad como un porcentaje. Los resultados obtenidos en las muestras analizadas fueron los siguientes:

**Tabla 7: Resultados del porcentaje de humedad.**

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Factor de corrección</b>	<b>Brix medidos</b>	<b>% Humedad</b>
MMfMichP1	22	0.0050	73.0	26.99
MMfMichO2	20	0.0000	74.2	25.80
MPIMichP3	20	0.0000	63.6	36.40
MPIMichO4	20	0.0000	68.6	31.40
MShMichP5	22	0.0050	57.0	42.99
MShMichO6	20	0.0000	72.2	27.80
MNpMichP7	20	0.0000	74.0	26.00
MNpMichO8	20	0.0000	72.0	28.00
MHidH9	22	0.0050	70.4	29.59
MMich10	22	0.0050	66.2	33.79
MMich11	21	0.0025	71.8	28.19
MbnOax12	21	0.0025	69.4	30.60
MMbOax13	21	0.0025	81.0	19.00
MSpOax14	21	0.0025	76.8	23.20

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Factor de corrección</b>	<b>Brix medidos</b>	<b>% Humedad</b>
MSmOax15	20	0.0000	77.2	22.80
MMbOax16	21	0.0025	79.4	20.60
MMbOax17	20	0.0000	76.8	23.20
MPfOax18	22	0.0050	73.0	26.99
MMbOax19	22	0.0050	76.4	23.59
AGuat20	21	0.0025	81.0	19.00
AGuat21	20	0.0000	81.0	19.00
AGuat22	21	0.0025	81.6	18.40
AGuat23	22	0.0050	80.8	19.20
AGuat24	20	0.0000	82.2	17.80
AGuat25	22	0.0050	82.2	17.79
AChi26	19	-0.0025	80.2	19.80
AMor27	20	0.0000	81.4	18.60

Como se puede observar en la tabla 7 todas las mieles de *Apis* melífera (muestras de Guatemala: AGuat20, AGuat21, AGuat22, AGuat23, AGuat24, AGuat25 y de México: AChi26 y AMor27) cumplen con la norma mexicana de miel (máximo porcentaje de humedad del 20%). Si se comparan los resultados de las mieles de *Meliponini* de la cuenca del Río Balsas en Michoacán se observa que en la primera colecta de primavera (muestras MMfMichP1, MPIMichP3, MShMichP5 y MNpMichP7), las muestras presentan una mayor humedad, excepto para la especie *Nannotrigona perilampoides* Cresson, la cual tiene mayor porcentaje de humedad en la segunda colecta de otoño. La mayoría de las mieles de meliponinas superó lo establecido por la norma mexicana de miel de abeja *Apis* melífera (excepto la MMbOax13).

### 6.1.2. Cenizas.

Para esta determinación se utilizó la misma solución elaborada a partir de la solución madre para medir el pH (1.25 g pesados y después llevados al aforo con agua desionizada a 5.0 mL).

Se midió la conductancia de cada una de estas soluciones en mS (miliSiemens), se restó el valor de la conductividad del agua (al usar la misma agua desionizada este es un valor constante). Expresado algebraicamente, se tiene la siguiente ecuación:

$$Xm = X_{SM} - X_{Agua}$$

El resultado se colocó en la ecuación para la determinación de cenizas.

$$A = \frac{Xm - 0.14}{1.74} = \% \text{ Cenizas}$$

Este procedimiento se realizó para todas las muestras de miel. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8:

En general, las mieles de *Apis* melífera tienen un porcentaje bajo en cenizas y sobre todo son valores muy similares entre cada muestra; sin embargo, para las abejas meliponinas hay una variación enorme entre los porcentajes ya que hay valores muy bajos (incluso por debajo de la miel de abejas *Apis* melífera; MMfMichP1) y porcentajes muy altos (hasta 5 veces más alto: MNpMichP7).

De las mieles de abejas meliponinas de Michoacán (y en general de todas), la especie que presentó los porcentajes más bajos fue la especie *Melipona fasciata Latreille*, que en las 2 colectas presentó los porcentajes de cenizas más bajos de todas las mieles sin importar la especie. También podemos observar una disminución del porcentaje de cenizas en las segundas colectas (otoño) con respecto de la primera colecta (primavera).

**Tabla 8: Resultados del porcentaje de cenizas.**

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (g/mL)</b>	<b>Conductividad específica de la solución de miel <math>X_{sm}</math> (mS/cm)</b>	<b>Conductividad específica de la miel <math>X_m = X_{sm} - X_{H_2O}</math> (mS/cm)</b>	<b>% Cenizas</b>
MMfMichP1	0.102	0.175	0.171	0.018
MMfMichO2	0.101	0.156	0.152	0.007
MPIMichP3	0.103	0.750	0.746	0.348
MPIMichO4	0.100	0.370	0.366	0.130
MShMichP5	0.101	0.310	0.306	0.095
MShMichO6	0.100	0.260	0.256	0.067
MNpMichP7	0.100	0.580	0.576	0.251
MNpMichO8	0.101	0.490	0.486	0.199
MHidH9	0.100	0.340	0.336	0.113
MMich10	0.100	0.270	0.266	0.072
MMich11	0.101	0.380	0.376	0.136
MbnOax12	0.100	0.320	0.316	0.101
MMbOax13	0.101	0.200	0.196	0.032
MSpOax14	0.100	0.290	0.286	0.084
MSmOax15	0.101	0.285	0.281	0.081
MMbOax16	0.100	0.450	0.446	0.176
MMbOax17	0.100	0.200	0.196	0.032
MPfOax18	0.100	0.630	0.626	0.279
MMbOax19	0.101	0.230	0.226	0.049
AGuat20	0.100	0.220	0.216	0.044
AGuat21	0.102	0.275	0.271	0.075
AGuat22	0.101	0.250	0.246	0.061
AGuat23	0.107	0.220	0.216	0.044
AGuat24	0.101	0.300	0.296	0.090
AGuat25	0.100	0.280	0.276	0.078
AChi26	0.101	0.199	0.195	0.032
AMor27	0.101	0.210	0.206	0.038

### 6.1.3. pH.

Como ya se describió en la metodología, las medidas de pH se hicieron de manera directa en las soluciones de miel que se usaron para la medición de % de cenizas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9: Resultados de la medición de pH**

Muestra	pH de la solución
MMfMichP1	3.34
MMfMichO2	3.86
MPIMichP3	3.8
MPIMichO4	3.4
MShMichP5	3.31
MShMichO6	3.18
MNpMichP7	4.25
MNpMichO8	3.88
MHidH9	3.42
MMich10	3.19
MMich11	3.08
MbnOax12	2.93
MMbOax13	3.12
MSpOax14	3.06

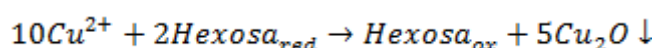
Muestra	pH de la solución
MSmOax15	3.14
MMbOax16	3.5
MMbOax17	3.14
MPfOax18	3.01
MMbOax19	3.11
AGuat20	3.74
AGuat21	4.4
AGuat22	4.08
AGuat23	3.71
AGuat24	4.19
AGuat25	4.02
AChi26	3.83
AMor27	3.94

Se puede apreciar claramente que la mayoría de las soluciones de mieles de meliponinas presentan un pH más bajo que las soluciones de miel de *Apis* melífera, con excepción de unas cuantas (muestras: MNpMichP7, MNpMichO8, MMfMichO2). En las mieles de abejas meliponinas de Michoacán se puede apreciar que hay una disminución del pH en la segunda colecta (otoño) a excepción de la miel de *Melipona fasciata Latreille* (MMfMichO2), la cual en su segunda colecta tuvo un aumento de pH respecto a la primera (MMfMichP1).

#### 6.1.4. Azúcares reductores.

Para esta determinación, se tomó de la disolución madre de cada muestra de miel 1.0 mL y se llevó al aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 100.0 mL. De esta solución se tomaron 40.0 mL para la determinación de sacarosa que se presentará más adelante; el resto de la solución se utilizó para esta determinación, por lo cual se colocó en una bureta de 25.0 mL. Aparte, en un vaso de precipitados de 30 mL se colocaron 2.0 mL de reactivo A y 2.0 mL de reactivo B de Fehling, se agregó una gota de azul de metileno al 1% como indicador y se adicionó agua destilada hasta cubrir el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el electrodo de trabajo (alambre de cobre); después se puso a calentar hasta ebullición y posteriormente se procedió a agregar la solución de miel de cada muestra que se encontraba en la bureta.

Para localizar el punto de equivalencia se tienen 2 posibilidades: el viraje del indicador azul de metileno y de manera potenciométrica con una curva de valoración experimental elaborada de la titulación. De manera general la reacción de hexosas reductoras con el ion cúprico sucede de la siguiente manera (Preza de la Vega J. y Reyes O. 2007).

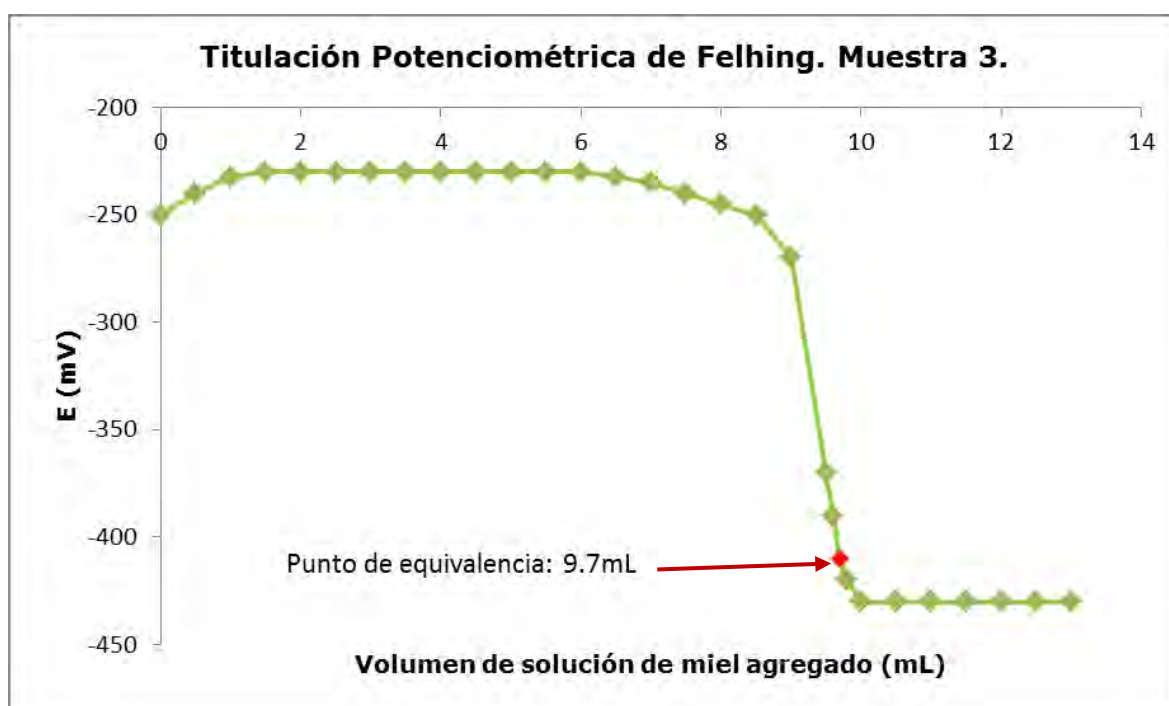


Por lo cual para determinar el potencial electroquímico en el punto de equivalencia, a partir de la curva potenciométrica, se deduce de la siguiente ecuación:

$$E_{\text{Eq}} = E_{\text{Cu(II)}} - \frac{5\Delta E}{6} = E_{\text{Az.Red.}} + \frac{\Delta E}{6}$$

La ecuación anterior explica que el punto de equivalencia se encuentra a 5/6 partes del potencial condicional del ion cúprico o a 1/6 parte del potencial condicional del azúcar reductor, en la zona logarítmica de la curva de valoración.

Para explicar de mejor manera los resultados, se presenta como ejemplo la muestra número 3 (Miel de abeja meliponina (*Plebeia* sp) Michoacán, Colecta: 2014, cuenca del Balsas, colecta de primavera). La solución madre de esta muestra fue elaborada pesando 4.0489 gramos de esta miel, que se llevan al aforo a 10.0 mL con agua desionizada (en un matraz volumétrico); de esta solución madre se tomó 1.0 mL, se llevó al aforo a 100.0 mL y con esta disolución se llenó la bureta de 25.0 mL. La reacción se siguió de manera potenciométrica; un ejemplo de las curvas obtenidas se observa en la figura 14.



**Figura 14: Ejemplo de curva de Titulación potenciométrica inversa de solución de miel (muestra 3) con reactivo de Felhing (con rojo se indica el vire del indicador azul de metileno 1%).**



Se determina el volumen gastado al punto de equivalencia; en este ejemplo, se encuentra en 9.7 mL de disolución de miel. Para encontrar el porcentaje de azúcares reductores se realizó el cálculo siguiente:

$$\text{mmol de } Cu_{total}^{2+} = \left(\frac{1}{5}\right)\text{mmol de Az. Red}_{p.eq}$$

$$\text{mmol de } Cu_{total}^{2+} = \left(2.0\text{mL} \times \frac{0.261\text{mmol}}{\text{mL}}\right) = 0.522\text{mmol}$$

$$\text{mmol de Az. Red}_{p.eq} = 0.522\text{mmol} \times \left(\frac{1}{5}\right) = 0.1044\text{mmol}$$

$$\text{masa de Az. Red}(g) = 0.1044\text{mmol} \times \left(\frac{180.16\text{mg}}{1\text{mmol}}\right)$$

$$18.81\text{mg} = 0.01881\text{g Az Red}$$

$$\begin{aligned} \text{masa de miel}(g) &= 9.7\text{mL}_{\text{sol de miel}} \times \left(\frac{1\text{mL}_{\text{sol mad}}}{100\text{mL}_{\text{sol de miel}}}\right) \times \left(\frac{4.0489\text{g}}{10\text{mL}_{\text{sol mad}}}\right) \\ &= 0.03927\text{g} \end{aligned}$$

Expresándolo en porcentaje:

$$\% \text{ Az. Red}_{\text{miel}} = \left(\frac{\text{masa de Az. Red}}{\text{masa de miel}}\right) \times 100$$

$$\% \text{ Az. Red}_{\text{miel}} = \left(\frac{0.01881\text{g}}{0.03927\text{g}}\right) \times 100 = 47.89\%$$

De la misma manera se hicieron los cálculos para la determinación de azúcares reductores de cada miel. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 10.

**Tabla10: Resultados del porcentaje de azúcares reductores.**

<b>Muestra.</b>	<b>Masa de miel diluida en solución madre (g).</b>	<b>Volumen agregado de solución de miel al P.E. (mL).</b>	<b>Porcentaje de Az. Reductores de la miel.</b>
MMfMichP1	4.0691	7.5	62.04
MMfMichO2	4.0304	7.1	65.73
MPIMichP3	4.0489	9.7	47.89
MPIMichO4	4.0025	9.4	49.99
MShMichP5	4.0538	9.5	48.84
MShMichO6	4.0036	7.9	59.47
MNpMichP7	4.0198	10.9	42.93
MNpMichO8	4.0420	9.9	47.00
MHidH9	4.0078	8.7	53.94
MMich10	4.0141	8.6	54.80
MMich11	4.0448	9.3	49.81
MbnOax12	4.0084	9.2	51.00
MMbOax13	4.0300	6.9	67.64
MSpOax14	4.0142	8.0	58.57
MSmOax15	4.0426	7.8	59.65
MMbOax16	4.0060	8.1	57.96
MMbOax17	4.0065	7.4	63.44
MPfOax18	4.0016	9.9	47.48
MMbOax19	4.0238	15.2	61.50
AGuat20	4.0099	6.6	70.80
AGuat21	4.0830	6.5	70.87
AGuat22	4.0286	6.6	70.74
AGuat23	4.2647	6.7	65.83
AGuat24	4.0519	6.5	71.41
AGuat25	4.0018	6.7	70.15
AChi26	4.0556	6.6	70.27
AMor27	4.0430	6.3	73.84

**\*P.E. : Punto de Equivalencia**

Basados en los resultados obtenidos observamos que la mayoría de las mieles de *Apis* melífera, presenta un mayor porcentaje de azúcares reductores respecto a las mieles de *Meliponini*, también se observa que el porcentaje de azúcares reductores en las mieles de estas últimas varía mucho una de la otra. Respecto a las mieles de *Meliponini* de Michoacán se puede observar claramente que la segunda cosecha (otoño), tiene en todas las especies analizadas un aumento en el porcentaje de azúcares reductores respecto a la primera cosecha (primavera).

#### **6.1.5. Determinación de sacarosa.**

Esta determinación se hizo separando los 40.0 mL, de la solución que se utilizó para determinar azúcares reductores (1.0 mL de solución madre disuelto con agua destilada y llevado al aforo a 100 mL). Estos 40.0 mL se colocaron en un matraz aforado de 50.0 mL y se adicionaron 10 gotas de HCl concentrado, se dejó en reposo 24 horas aproximadamente y después se llevó al aforo con agua destilada.

Esta disolución se valoró por el método de Fehling, por lo cual, colocamos la solución de miel en la bureta. Se repitió el mismo procedimiento que en la determinación de azúcares reductores. Para determinar el contenido de sacarosa, se hizo restando el resultado de la determinación de azúcares reductores explicado anteriormente al resultado de esta determinación. Los resultados de esta determinación se presentan en la tabla 11.

**Tabla 11: Resultados de la determinación de sacarosa**

Muestra	Porcentaje de sacarosa en la miel
MMfMichP1	0.587
MMfMichO2	0.308
MPIMichP3	0.427
MPIMichO4	2.055
MShMichP5	0.000
MShMichO6	0.000
MNpMichP7	0.000
MNpMichO8	0.000
MHidH9	0.882
MMich10	0.410
MMich11	0.000
MbnOax12	0.000
MMbOax13	0.000
MSpOax14	0.000

Muestra	Porcentaje de sacarosa en la miel
MSmOax15	0.000
MMbOax16	0.000
MMbOax17	0.345
MPfOax18	0.000
MMbOax19	0.000
AGuat20	2.212
AGuat21	0.917
AGuat22	0.430
AGuat23	2.226
AGuat24	0.220
AGuat25	0.000
AChi26	1.301
AMor27	0.710

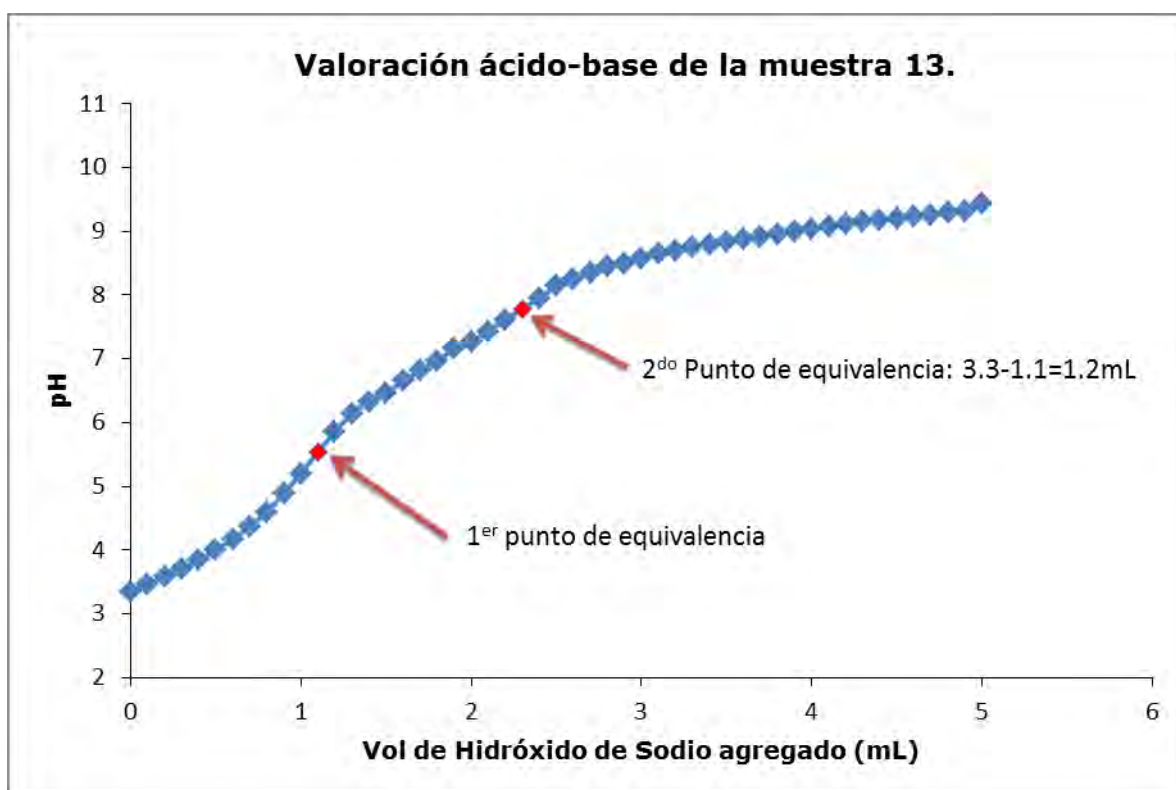
Se observa claramente que la mayoría de las mieles de *Apis* melífera analizadas presentan sacarosa en contenidos variados pero todos pueden considerarse bajos, e incluso, la muestra 25 no contiene sacarosa. Las mieles de meliponinas presentan contenidos variados y muchas no presentan sacarosa. El contenido de sacarosa es bajo; todas las mieles se encuentran dentro de lo que pide la Norma Mexicana NMX-F-036-2006, que indica que la miel debe presentar un contenido menor al 5% para ser apta para consumo humano.

#### **6.1.6. Acidez libre y láctica.**

Para la determinación de acidez libre y láctica se preparó una solución de hidróxido de sodio NaOH aproximadamente  $0.01 \text{ molL}^{-1}$ . Para tener un valor más exacto de la concentración de NaOH, se valoró con biftalato de potasio (patrón primario), con el cual se determinó la concentración de la sosa de manera más precisa: de  $0.01041 \text{ molL}^{-1}$  para la primera solución de hidróxido de sodio y  $0.01096 \text{ molL}^{-1}$  para la segunda.

La sosa ya valorada, se colocó en la bureta de 10.0 mL y se procedió a valorar cada muestra de miel: para esto se tomó 0.5 mL de la solución madre de cada muestra en un matraz de 30.0 mL, se adicionó agua desionizada cubriendo el electrodo combinado y se colocó con agitación contante, para medir de manera correcta el pH. Se procedió a titular con adiciones de 0.1 mL en 0.1 mL de la solución de sosa para tener una curva de valoración ácido-base de cada muestra de miel y así poder determinar la acidez libre y la lactónica.

Para explicar de mejor manera los resultados, se ha tomado como ejemplo la muestra 13 (Miel de abeja meliponina (*Melipona Beecheii*) de Oaxaca (colectada: 12 de Abril del 2014), en la cual se puede ver claramente los 2 puntos de equivalencia de la acidez libre y de la lactónica. (Un detalle importante a mencionar es que para la determinación del segundo punto de equivalencia al volumen total gastado se le resta el volumen del primer punto de equivalencia).



**Figura 15: Curva de valoración ácido-base de la solución de miel, muestra 13 con Hidróxido de sodio  $0.01096 \text{ molL}^{-1}$ .**

Al observar la curva de valoración de la muestra 13 se pueden distinguir los 2 puntos de equivalencia en las 2 zonas logarítmicas de cambio brusco del gráfico; en algunos casos donde no se observan claramente estas zonas se procede a sacar la primera derivada para observar de mejor manera los puntos de equivalencia. Tomando el primer punto de equivalencia se calcula el número de equivalentes de ácidos libres (acidez libre), en la miel.

$$Eq H^+ \text{ alicuota miel} = \text{mmol de NaOH gastado al } 1^{\text{er}} \text{ P.E.}$$

$$Eq H^+ \text{ alicuota miel} = \text{Conc. NaOH} \times \text{Vol. NaOH gastado al } 1^{\text{er}} \text{ P.E.}$$

$$Eq H^+ \text{ alicuota miel} = 0.01096M \times 1.1mL = 0.012056meq H^+$$

Para expresar la acidez libre en los términos que exige la Norma mexicana (meq ácidos/Kg de miel), se toma en cuenta cómo se elaboró la solución madre y cuánto volumen se tomó de esta misma.

$$m \text{ de miel en alic. (kg)} = \left( \frac{\text{Vol de Sol. Mad. tom}}{\text{Vol de Sol. Mad. tot}} \right) \times m \text{ de miel en Sol. Mad. (kg)}$$

En el caso de la muestra 13:

$$\text{masa de miel en alicuota (kg)} = \left( \frac{0.5mL}{10mL} \right) \times 0.00403kg$$

$$\text{masa de miel en alicuota (kg)} = 2.015 \times 10^{-4}kg$$

$$meq H^+ / kg \text{ de miel} = 0.012056meq H^+ / 2.015 \times 10^{-4}kg = 59.831meq/kg$$

Para la acidez láctica se repite el mismo procedimiento con el gasto de sosa para la segunda valoración (1.2 mL).

$$Eq H^+ \text{ alicuota miel} = \text{mmol de NaOH gastado al } 2^{\text{do}} \text{ P.E.}$$

$$Eq H^+ \text{ alicuota miel} = \text{Conc. NaOH} \times \text{Vol. NaOH gastado al } 2^{\text{do}} \text{ P.E.}$$

$$Eq H^+ \text{ alicuota miel} = 0.01096M \times 1.2mL = 0.03152meq H^+$$

Se expresa la acidez lactónica en las mismas unidades que la acidez libre, para tener un buen punto de comparación entre los 2 tipos de acidez y para obtener la acidez total en las mismas unidades.

$$m \text{ de miel en alic. (kg)} = \left( \frac{\text{Vol de Sol. Mad.tom}}{\text{Vol de Sol. Mad.tot}} \right) \times m \text{ de miel en Sol.Mad. (kg)}$$

$$\text{masa de miel en alicuota(kg)} = \left( \frac{0.5\text{mL}}{10\text{mL}} \right) \times 0.00403\text{kg}$$

$$\text{masa de miel en alicuota(kg)} = 2.015 \times 10^{-4}\text{kg}$$

$$\text{meq H}^+/\text{kg de miel} = 0.013152\text{meq H}^+/2.015 \times 10^{-4}\text{kg}$$

$$= 65.27\text{meq/kg de acidez lactónica}$$

Este procedimiento se repitió para el cálculo de la acidez libre, lactónica y total, en las demás muestras de miel; los datos se presentan en la tabla 12.

**Tabla12: Resultados de acidez libre, lactónica, total y pH en los 2 puntos de equivalencia.**

Muestra	Conc. de NaOH (molL <sup>-1</sup> )	Vol. Para 1 <sup>er</sup> Punto de equiv.	pH 1 <sup>er</sup> punto de equiv.	Vol. Para 2 <sup>do</sup> Punto de equiv.	pH 2 <sup>do</sup> punto de equiv.	Acidez Libre (meq/kg)	Acidez Lactónica (meq/kg)	Acidez total (meq/kg)
MMfMichP1	0.0104	0.35	7.20	-----	-----	17.9	----	17.9
MMfMichO2	0.0110	0.1	5.50	----	-----	5.5	----	5.4
MPIMichP3	0.0104	3.5	6.60	----	-----	180.0	----	180.0
MPIMichO4	0.0110	0.9	4.74	----	-----	49.3	----	49.3
MShMichP5	0.0104	1.7	7.26	----	-----	87.3	----	87.3
MShMichO6	0.0110	1.5	5.57	----	-----	82.1	----	82.1
MNpMichP7	0.0104	1	7.60	----	-----	52.0	----	52.0
MNpMichO8	0.0110	1.3	5.31	----	-----	70.5	----	70.5
MHidH9	0.0104	2.6	5.75	0.90	6.69	135.1	46.7	181.8
MMich10	0.0104	1.5	7.17	1.15	10.85	77.0	59.1	136.1
MMich11	0.0104	3.2	5.62	2.00	7.75	164.8	102.9	267.7
MbnOax12	0.0110	2.1	5.75	1.40	8.02	114.8	76.6	191.4
MMbOax13	0.0110	1.1	5.54	1.20	7.78	59.8	65.3	125.1

Muestra	Conc. de NaOH (molL <sup>-1</sup> )	Vol. Para 1 <sup>er</sup> Punto de equiv.	pH 1 <sup>er</sup> punto de equiv.	Vol. Para 2 <sup>do</sup> Punto de equiv.	pH 2 <sup>do</sup> punto de equiv.	Acidez Libre (meq/kg)	Acidez Lactónica (meq/kg)	Acidez total (meq/kg)
MSpOax14	0.0110	3	6.75	1.50	8.06	163.8	81.9	245.7
MsmOax15	0.0110	2.3	7.97	1.60	10.35	124.7	86.8	211.5
MMbOax16	0.0110	3.6	6.05	1.00	7.95	197.0	54.7	251.7
MMbOax17	0.0110	1.5	8.10	----	----	82.1	----	82.1
MPfOax18	0.0110	5.2	6.78	----	----	284.8	----	284.8
MMbOax19	0.0110	1.6	5.93	0.80	7.99	87.7	43.8	131.5
AGuat20	0.0104	0.4	6.29	----	----	20.8	----	20.8
AGuat21	0.0104	0.3	7.63	----	----	15.3	----	15.3
AGuat22	0.0104	0.4	7.43	----	----	20.7	----	20.7
AGuat23	0.0104	0.5	7.50	----	----	24.4	----	24.4
AGuat24	0.0104	0.4	7.04	----	----	20.5	----	20.5
AGuat25	0.0104	0.3	6.79	----	----	15.6	----	15.6
AChi26	0.0110	0.2	5.51	----	----	10.8	----	10.8
AMor27	0.0110	0.2	5.49	----	----	10.8	----	10.8

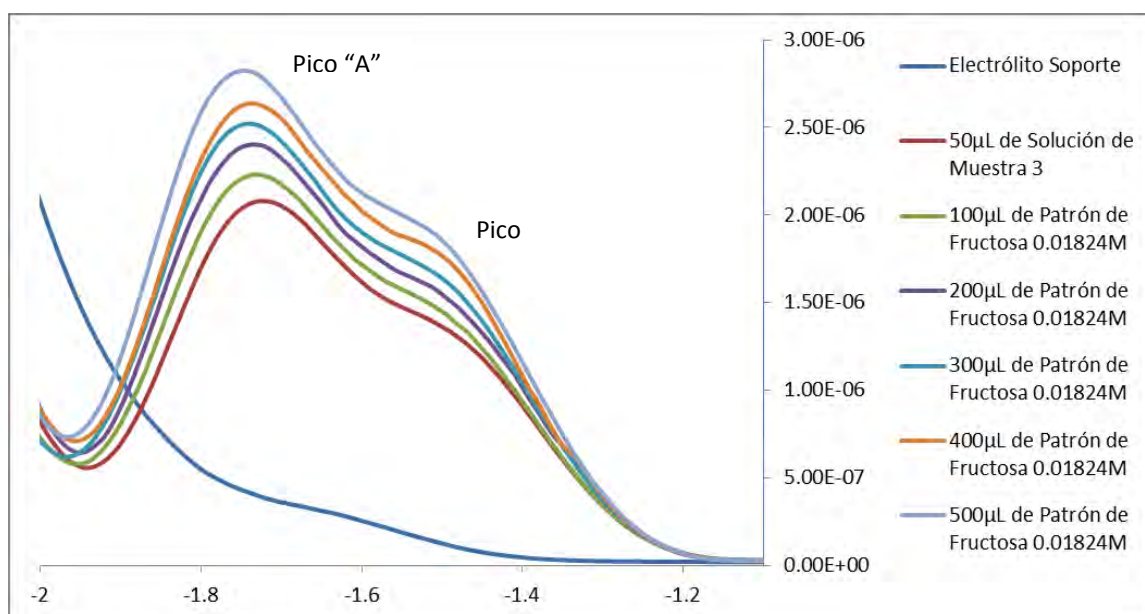
Con los resultados presentados en esta tabla se puede ver claramente que la acidez libre de las mieles de *Meliponini* es considerablemente mayor a las mieles de *Apis* melífera. Las mieles que presentan acidez láctica todas son del tipo *Meliponini* y son mieles que fueron de mayor antigüedad, es decir las colectadas en el 2012 en Oaxaca (muestras de la 12 a la 19; excepto 17 y 18). Esto puede ser un indicio de que la acidez láctica podría depender de la antigüedad de la miel; posiblemente también dependa de la especie de abeja y con ello muchos factores como: la flora de origen, zona de pecoreo de las abejas, zona geográfica, época del año, etc. Pero esto es solamente una hipótesis; se tiene que hacer más investigación en este campo para confirmar o desechar la hipótesis planteada.



Para las mieles de *Meliponini* de Michoacán, tenemos que hay una disminución de la acidez libre en la segunda colecta (otoño), con respecto a la primera (primavera), a excepción de la especie *Nannotrigona perilampoides* Cresson, la cual en lugar de presentar una disminución de una colecta a otra, presentó un aumento.

### 6.1.7. Fructosa.

Para la determinación polarográfica de fructosa se utilizó como electrolito soporte 10 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$   $1 \text{ molL}^{-1}$ . Se traza la curva residual, una vez finalizada, se adicionan directamente 50  $\mu\text{L}$  de la solución madre de miel. Para aplicar el método de adiciones patrón se empleó una disolución patrón de fructosa de concentración  $0.01824 \text{ molL}^{-1}$  en agua desionizada; esta solución fue valorada previamente (por medio del método de Fehling de azúcares reductores). Se hicieron adiciones del patrón de fructosa de 100  $\mu\text{L}$  en 100  $\mu\text{L}$  por cada adición, tanto para la muestra, como para las adiciones patrón se trazó el respectivo polarograma (Figura16).

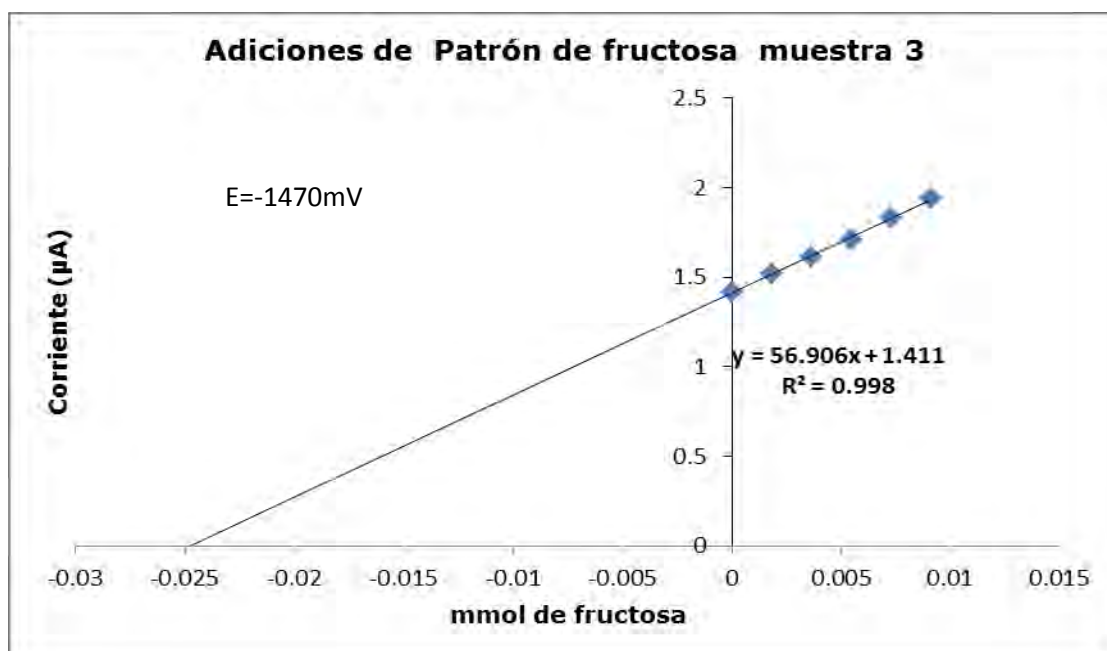


**Figura 16: Polarograma de adiciones de solución patrón de fructosa a la muestra 3 de miel. Electrólito soporte:  $\text{CaCl}_2$   $1.0 \text{ molL}^{-1}$ , solvente: agua desionizada, velocidad del barrido:  $5.0 \text{ mV/s}$ .**

Como se observa en la figura 16. La fructosa presenta dos señales de reducción en el dominio de electroactividad en que se trabajó (picos "A" y "B").

En las condiciones en que se llevó a cabo el experimento, el pico "B" y "A" presentan una buena definición, pero el pico "A" presenta ciertos efectos cinéticos (Norma Gascón, 2009) que pueden intervenir en la cuantificación de este pico; por lo cual, como en otras tesis (Diana Romero 2013; Joaquín Preza 2007) se procedió a utilizar el pico "B" para efectos de cuantificación; al realizar el análisis de regresión lineal en dicha señal (Figura 16) se observa una buena correlación.

Para la elaboración de la curva de adiciones patrón, se representó la corriente medida en el pico "B" contra la cantidad de fructosa en la alícuota de la solución de la muestra de miel y con cada adición patrón (expresado en mmol). La cantidad de fructosa en cada adición se representa contra la corriente medida que le corresponde y se obtiene la gráfica presentada en la figura 17.



**Figura 17: Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón para determinar la concentración de fructosa en la muestra MPIMichP3 de miel.**

La cantidad de fructosa presente en la alícuota de la muestra MPIMichP3 de miel se calcula cuando la línea de regresión lineal interseca el eje de las abscisas. Este dato se puede obtener directamente del gráfico o por medio de la ecuación de regresión lineal obtenida, es decir:

$$y = 56.906x + 1.411$$

Como se observa en la gráfica, el punto que está en el eje de las abscisas corresponde a la adición de la solución de miel, por lo cual para calcular la cantidad de fructosa  $y=0$  (intersección con las ordenadas).

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

$$56.906x = -1.411$$

$$x = -\frac{1.411}{56.906} = -0.0248$$

$$\text{mmol de Fructosa} = 0.0248\text{mmol}$$

*(en la alícuota de 50 $\mu$ L de solución de miel)*

Para expresar el resultado en porcentaje de fructosa en la miel se llevó a cabo el siguiente procedimiento matemático. Primero se convierten los milimoles de fructosa obtenida, a masa de fructosa en la alícuota con la siguiente ecuación:

$$\text{Fruc en la alícuota(mg)} = \text{mmol de Fruc} \times \left( \frac{180.16\text{mg de Fruc}}{1\text{mmol de Fruc}} \right)$$

$$\text{Fruc en la alícuota(mg)} = 0.0248\text{mmol} \times \left( \frac{180.16\text{mg}}{1\text{mmol}} \right) = 4.47\text{mg Fruc en la alícuota}$$

$$\text{Masa de miel en la Sol. Madre} = 4.0489\text{g}$$

$$\text{Vol. de solución de miel} = 10\text{mL}$$

$$\text{Vol de alícuota de miel agregado} = 50\mu\text{L}$$

$$\text{Masa de fruc en Sol. Mad} = \left( \frac{\text{Vol de Sol. Mad total}}{\text{Vol de Sol. Mad alicuo}} \right) \times \text{Masa de fruc en la alicuo}$$

$$\text{Masa de fruc en Sol. Mad} = \left( \frac{10\text{mL}}{0.05\text{mL}} \right) \times 0.00447\text{g} = 0.894\text{g de Fruc en Sol. Madre.}$$

$$\% \text{ de Fruc en miel} = \left( \frac{\text{Masa de Frucosa en Sol. Madre}}{\text{Masa de miel en Sol. Madre}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ de Fruc en miel} = \left( \frac{0.894\text{g}}{4.0489\text{g}} \right) \times 100 = 22.08\%$$

Al repetir el procedimiento anterior para las demás muestras se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 13.

**Tabla 13: Resultados de la determinación polarográfica de Fructosa.**

<b>Muestra</b>	<b>Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)</b>	<b>Ec de Reg Lineal</b>	<b>Porcentaje de fructosa en la miel</b>
MMfMichP1	r <sup>2</sup> =0.9805	y=79.941x+1.0369	11.5
MMfMichO2	r <sup>2</sup> =0.9989	y=121.97x+2.9885	21.9
MPIMichP3	r <sup>2</sup> =0.998	y=56.906x+1.411	22.1
MPIMichO4	r <sup>2</sup> =0.9952	y=113.89x+3.5669	28.2
MShMichP5	r <sup>2</sup> =0.9851	y=47.072x+1.1356	21.4
MShMichO6	r <sup>2</sup> =0.9991	Y=132.96x+2.6447	17.9
MNpMichP7	r <sup>2</sup> =0.9814	Y=118.01x+1.996	15.2
MNpMichO8	r <sup>2</sup> =0.9972	Y=117.54x+2.108	16.0
MHidH9	r <sup>2</sup> =0.9925	Y=149.14x+2.8773	17.3
MMich10	r <sup>2</sup> =0.9937	Y=71.313x+1.8377	23.1
MMich11	r <sup>2</sup> =0.995	Y=48.168x+1.4898	27.6
MbnOax12	r <sup>2</sup> =0.9957	Y=52.474x+0.6335	10.9
MMbOax13	r <sup>2</sup> =0.9984	Y=55.071x+1.3111	21.3
MSpOax14	r <sup>2</sup> =0.9811	Y=63.214x+1.1771	16.7
MSmOax15	r <sup>2</sup> =0.9993	Y=144.11x+2.2598	14.0
MMbOax16	r <sup>2</sup> =0.9902	Y=115.45x+3.1763	23.6
MMbOax17	r <sup>2</sup> =0.9986	Y=138.9x+3.0423	19.7
MPfOax18	r <sup>2</sup> =0.9974	Y=139.04x+1.8763	12.2
MMbOax19	r <sup>2</sup> =0.9902	Y=169.5x+2.9803	15.7
AGuat20	r <sup>2</sup> =0.9968	Y=111.4x+3.6215	29.2
AGuat21	r <sup>2</sup> =0.9961	Y=133.03x+3.7974	25.2

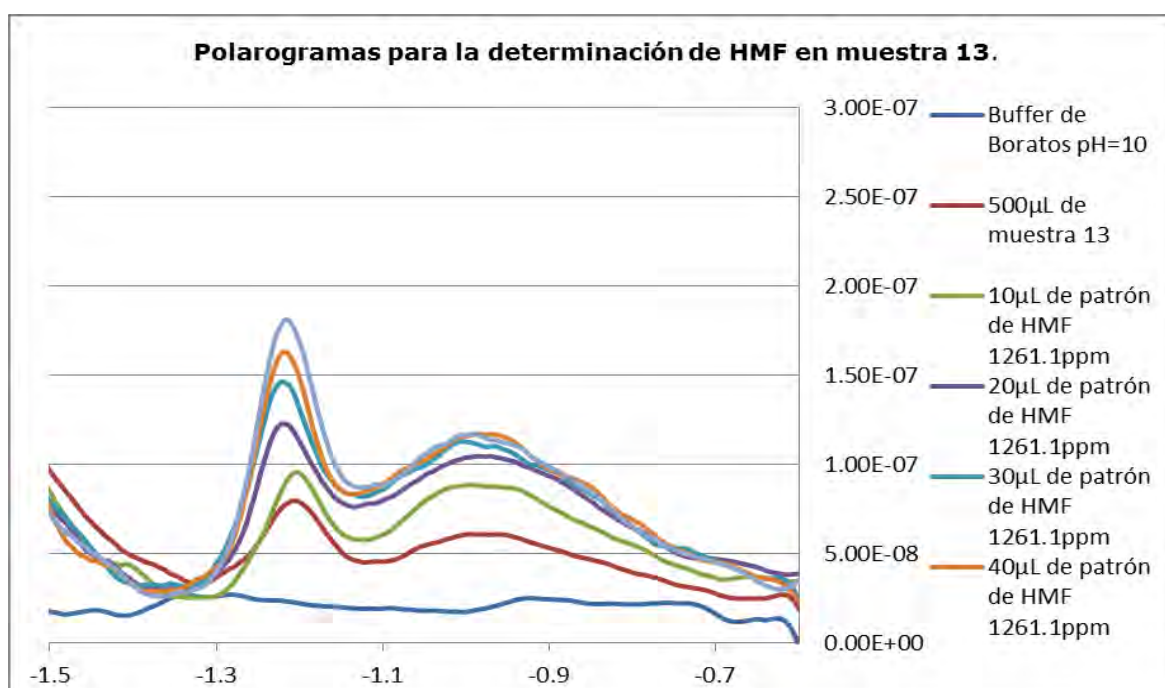
<b>Muestra</b>	<b>Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)</b>	<b>Ec de Reg Lineal</b>	<b>Porcentaje de fructosa en la miel</b>
AGuat22	r <sup>2</sup> =0.998	Y=111.95x+4.1195	32.9
AGuat23	r <sup>2</sup> =0.9977	Y=148.62x+3.4602	19.6
AGuat24	r <sup>2</sup> =0.9932	Y=171.52x+3.5015	18.2
AGuat25	r <sup>2</sup> =0.9983	Y=140.54x+4.2624	27.3
AChi26	r <sup>2</sup> =0.9998	Y=125x+3.0203	21.5
AMor27	r <sup>2</sup> =0.9901	Y=160.2x+2.3153	12.9

Con los resultados presentados en la tabla anterior podemos observar que el porcentaje de fructosa no depende del tipo de abeja ya que las dos especies que analizamos en este trabajo (*Meliponini* y *Apis melifera*), presentan porcentajes de fructosa muy variados. Para las mieles de Michoacán observamos que en dos de estas especies hay un aumento considerable de Fructosa de la primer colecta (primavera), respecto a la segunda (otoño), las especies son: *Melipona fasciata Latreille* y *Plebeia*, las otras dos especies, la especie *Scaptotrigona hellwegeri Friese*, tiene una disminución considerable y la especie *Nannotrigona perilampoides Cresson*, presenta un aumento mínimo al grado de considerar que entre las dos colectas no hay diferencia apreciable.

#### **6.1.8. Hidroximetilfurfural (HMF).**

Para la determinación de HMF se utilizó como electrolito soporte 10 mL de una solución amortiguadora de Boratos a pH=10, Se trazó la curva residual, una vez finalizado, se adicionaron directamente 500 µL de la solución madre de miel. Si no se llega a ver señal se adicionan nuevamente 500 µL; si no se observa señal no se adiciona más solución de miel.

La referencia empleada para las adiciones patrón fue una solución patrón de HMF con concentración 1261.1 ppm en agua desionizada de la cual se agregaron en cada adición patrón alícuotas de 10  $\mu$ L. Para cada adición tanto de la muestra como de las soluciones patrón se trazó el respectivo polarograma, si no se llega a ver señal en las adiciones de la muestra solamente se adiciona HMF patrón para corroborar que el contenido de HMF en esa muestra de miel está por debajo del límite de detección de la metodología.



**Figura 18: Ejemplo de un polarograma de adiciones de solución patrón de HMF a la muestra MOaxMb13 de miel. Electrolito soporte: Buffer de Boratos pH=10; solvente: agua desionizada, velocidad de barrido: 5.0 mV/s.**

Para la elaboración de la curva de adiciones patrón, se representó la corriente límite medida con respecto a la concentración de HMF (en ppm) en la celda.

Un detalle importante a considerar, es que el volumen de las adiciones de 10  $\mu\text{L}$  en 10  $\mu\text{L}$  en la celda no se consideran en el cálculo de las concentración de HMF (ppm) debido a que son volúmenes que pueden despreciarse, debido a la cantidad de electrolito soporte (10.0 mL).

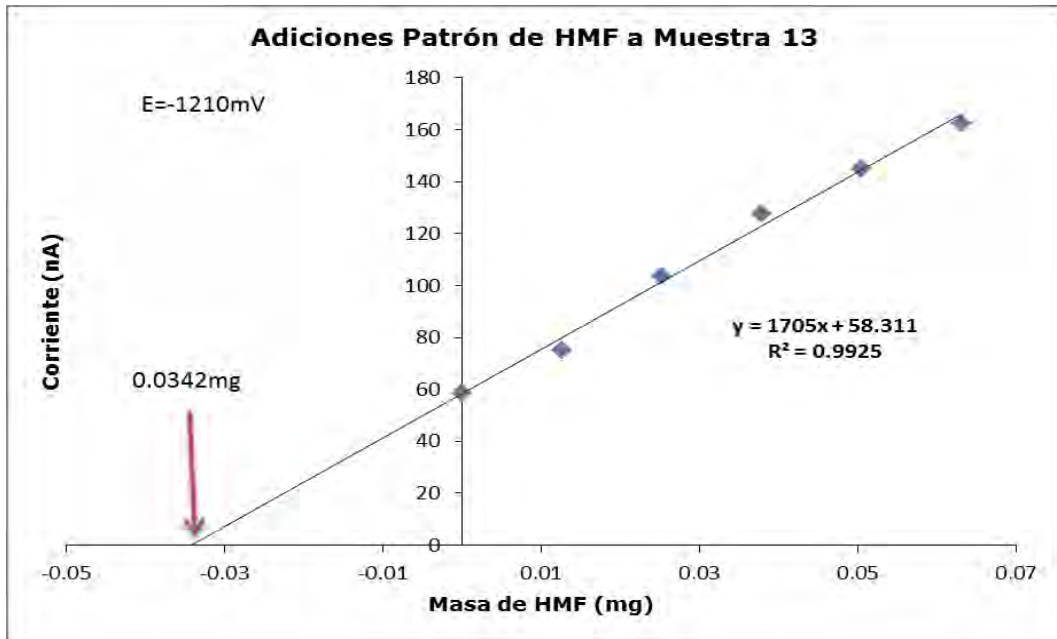
Para el cálculo de HMF (ppm) en la celda, se realizó el siguiente cálculo matemático para cada adición. Se toma como ejemplo la concentración cuando se adicionaron los primeros 10  $\mu\text{L}$ . De la solución patrón de HMF (1261.1 ppm).

$$10\mu\text{L Estandar de HMF} \times \left( \frac{1\text{L Estandar de HMF}}{1000000\mu\text{L Estandar de HMF}} \right)$$

$$\times \left( \frac{1261.1\text{mg de HMF}}{1\text{L Estandar de HMF}} \right) = \text{mg de HMF en la celda}$$

$$10 \times \left( \frac{1}{1000000} \right) \times \left( \frac{1261.1}{1} \right) = 0.0126\text{mg de HMF en la celda}$$

Este procedimiento se repite para cada adición patrón de HMF, solamente se modifica el volumen total adicionado del estándar de HMF a la celda. Una vez obtenidas las masas (mg) de cada adición y la corriente de cada adición, se procedió a realizar la curva de adiciones patrón de HMF. Para ejemplificar de mejor manera los resultados se toma como ejemplo la muestra MMbOax13. (Figura 19).



**Figura 19: Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón para determinar la concentración de HMF en la muestra MMbOax13 de miel.**

Como se puede observar, en la figura 19 de las 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 de miel (ppm), tal como lo pide la Norma Mexicana de Miel se realiza el siguiente cálculo matemático:

$$\text{Masa de miel en Solución Madre} = 4.03g$$

$$\text{Volumen de Solución Madre} = 10mL$$

$$\text{Volumen de Alícuota de miel} = 0.5mL$$

$$\text{Masa de HMF en Alícuota} = 0.0348mg$$

$$\text{Masa de miel en Alícuota} = 4.03g \times \frac{0.5mL(\text{Alícuota})}{10mL \text{ Sol. Madre}} = 0.2015g$$

$$\text{Masa de miel en Alícuota} = 0.2015g \times \frac{1kg}{1000g} = 0.0002015kg$$



$$\text{Contenido de HMF (ppm)} = \frac{\text{mg de HMF}}{\text{kg de miel}} = \frac{0.0348\text{mg de HMF}}{0.0002015\text{kg de miel}} = 172.7\text{ppm}$$

Este procedimiento se repitió para las demás muestras de miel y se obtuvieron los resultados contenidos en la tabla 14.

**Tabla 14: Resultados de la determinación de HMF.**

<b>Muestra</b>	<b>Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)</b>	<b>Ecuación de Regresión Lineal</b>	<b>mg HMF/Kg de miel (ppm)</b>
MMfMichP1	MLD	MLD	MLD
MMfMichO2	MLD	MLD	MLD
MPIMichP3	MLD	MLD	MLD
MPIMichO4	MLD	MLD	MLD
MShMichP5	MLD	MLD	MLD
MShMichO6	MLD	MLD	MLD
MNpMichP7	MLD	MLD	MLD
MNpMichO8	MLD	MLD	MLD
MHidH9	r <sup>2</sup> =0.9982	Y=2.6236x+0.066	125.4
MMich10	r <sup>2</sup> =0.9807	Y=4768x+40.34	41.6
MMich11	r <sup>2</sup> =0.9953	Y=1308.8x+69.547	262.7
MbnOax12	r <sup>2</sup> =0.9897	Y=1401x+37.925	135.1
MMbOax13	r <sup>2</sup> =0.9925	Y=1705x+58.311	172.7
MSpOax14	r <sup>2</sup> =0.9833	Y=1940.9x+67.54	173.4
MSmOax15	r <sup>2</sup> =0.9986	Y=2.3993x+0.0572	117.9
MMbOax16	r <sup>2</sup> =0.9952	Y=0.4577x+0.0232	253.1
MMbOax17	r <sup>2</sup> =0.9985	Y=2.6122x+0.0815	156.0
MPfOax18	r <sup>2</sup> =0.9992	Y=2.7391x+0.1035	188.8
MMbOax19	r <sup>2</sup> =0.9997	Y=2.4718x+0.0892	179.4
AGuat20	r <sup>2</sup> =0.9984	Y2.2169x+0.0176	39.3
AGuat21	MDL	MDL	MDL
AGuat22	r <sup>2</sup> =0.992	Y=2.3188x+0.0092	19.7
AGuat23	r <sup>2</sup> =0.994	Y=2.0017x+0.0127	29.7
AGuat24	r <sup>2</sup> =0.9947	Y=2.2645x+0.015	32.7
AGuat25	MDL	MDL	MDL
AChi26	r <sup>2</sup> =0.9993	Y=0.19099x+0.0006	14.5
AMor27	MDL	MDL	MDL

\*MLD=Menor al Límite de Detección.

Basados en los resultados obtenidos podemos observar que muchas de las mieles tienen un alto contenido de HMF. La excepción son las mieles de meliponinas traídas de meliponarios de Michoacán (abejas cultivadas); las 2 colectas presentan un contenido de HMF por debajo del límite de detección; las otras 3 mieles que presentan un contenido por debajo del límite de detección que refleja su alta calidad, su buena conservación y almacenamiento, son de la especie *Apis* melífera, 2 de ellas provenientes de Guatemala. Los altos contenidos de HMF en las mieles pudieron ser causadas por calentamiento y el tiempo que llevan almacenadas.

## **6.2. PROPÓLEOS.**

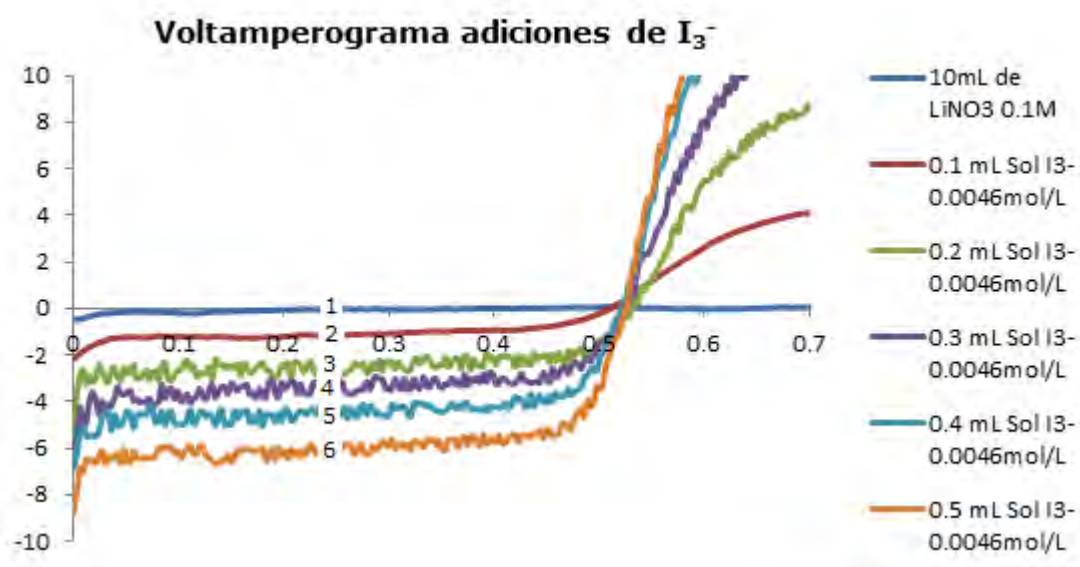
Estas determinaciones se basan en el procedimiento descrito en la metodología. La determinación de la actividad antioxidante en los extractos de propóleo se plantea en 3 etapas: el estudio electroquímico de la reacción del triyoduro con reductores de interés, la extracción de los propóleos y la medición de su actividad antioxidante.

### **6.2.1. Estudio electroquímico del triyoduro con reductores.**

Se procedió primero a realizar un estudio voltamperométrico de la reducción del triyoduro en el cual se evaluó la corriente de reducción del complejo triyoduro a yoduro. Como se mencionó anteriormente, se escogió como electrolito soporte el  $\text{LiNO}_3$  por 2 motivos: por su alta solubilidad en etanol y porque la sal no posee aniones con potenciales de reducción cerca del potencial del sistema  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ . Tomando en cuenta lo anterior el medio que se preparó fue  $\text{LiNO}_3$   $0.1 \text{ molL}^{-1}$  con una mezcla etanol-agua 1:1 como disolvente, similar al que se emplea para la extracción de los propóleos.

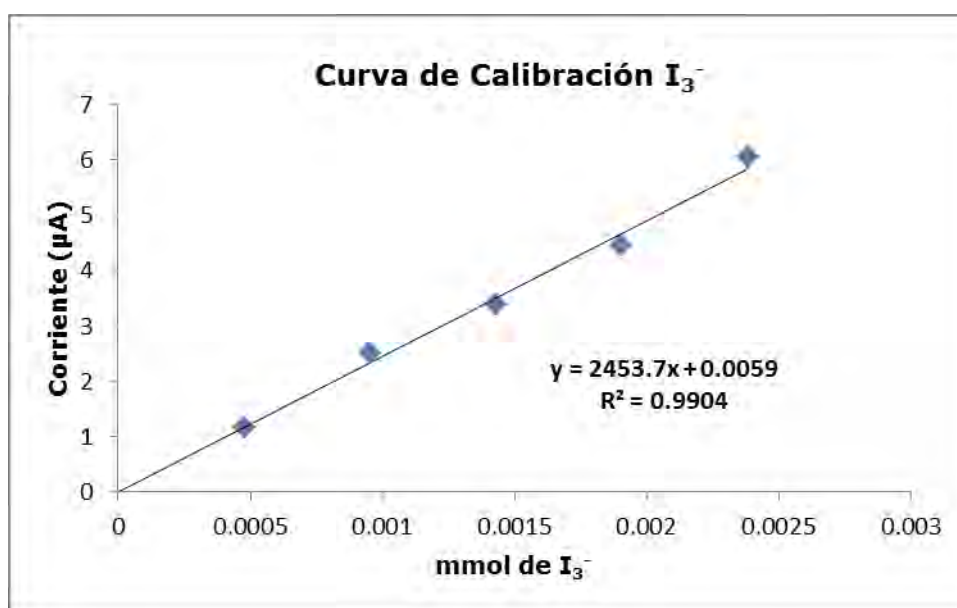
El dominio de electroactividad fue desde -900 mV (Barrera catódica) hasta los 1200 mV (Barrera anódica), y como velocidad de barrido 3 mV/s. Estas condiciones son similares a las mencionadas en la literatura (D. Chicas y O. Reyes; 2014).

Una vez establecidas las condiciones experimentales, se trazaron los voltamperogramas de una serie de adiciones de **100  $\mu\text{L}$  de solución de yodo en exceso de yoduros ( $\text{I}_3^-$ )**, con una concentración de  $0.0046 \text{ molL}^{-1}$ , previamente estandarizada, con el objetivo de identificar la onda voltamperométrica que corresponde al sistema  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ , determinar su potencial de media onda y definir si la corriente aumentaba de manera proporcional con la adición de  $\text{I}_3^-$  (es decir, que la electrólisis estuviese controlada por la difusión convectiva). En la figura 20 se puede observar el voltamperograma correspondiente a las condiciones anteriormente descritas.



**Figura 20: Voltamperograma de adiciones de solución patrón de  $\text{I}_3^-$   $0.0046 \text{ molL}^{-1}$ . Electrolito soporte:  $\text{LiNO}_3$   $0.1 \text{ molL}^{-1}$ , solvente mezcla hidroetanólica 50-50, velocidad de barrido 3 mV/s.**

En las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, se encontró que el potencial de media onda de la señal de reducción del sistema  $I_3^-/I^-$  es de 575.7 mV (Anexo 1). 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 corroborar la linealidad entre la corriente y la concentración. (Figura 21).



**Figura 21: Curva de calibración de triyoduro. Corriente limite medida en 200 mV.**

Se observa que el coeficiente de determinación ( $r^2=0.9904$ ) de la curva de calibración del triyoduro indica que la señal del triyoduro presenta un carácter lineal en este experimento. Por lo cual, podemos concluir que en estas 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 1 y la ecuación 2 respectivamente (Miller y Miller, 2005).

$$\text{Límite de Detección} = Y_b + 3S_b \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:  $Y_b$  es la señal analítica del blanco y

$S_b$  es la desviación estándar de la señal analítica del blanco

En este experimento se considera que la señal analítica del blanco corresponde a la corriente ocasionada por el medio (por el electrolito soporte  $\text{LiNO}_3$   $0.1 \text{ molL}^{-1}$  en mezcla hidroetánica 50-50), que se conoce como corriente residual.

El promedio y la desviación estándar de 5 veces el valor de la corrientes residuales obtenidas de 5 voltamperogramas diferentes se presentan en la Tabla 15.

**Tabla 15: Corriente residual a 200mV de distintos experimentos de  $\text{LiNO}_3$   $0.1\text{molL}^{-1}$  en mezcla hidroetanoica 50-50.**

<b>Experimento</b>	<b>Corriente Residual (<math>\mu\text{A}</math>)</b>
<b>1</b>	0.0567
<b>2</b>	0.0568
<b>3</b>	0.0637
<b>4</b>	0.0495
<b>5</b>	0.0555
<b>Promedio</b>	0.0564
<b>Desviación Estándar</b>	0.0050

Al aplicar la ecuacion 1 a los datos presentados en la tabla 15, se tiene o siguiente:

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

$$\text{Límite de Detección} = 0.0564 + 3(0.0050)$$

$$\text{Límite de Detección} = 0.0714 \mu\text{A}$$

Se considera entonces como el límite de detección de triyoduro en términos de corriente el valor de 0.0714  $\mu\text{A}$ . Para expresar el límite de detección en función de la concentración de triyoduro de la solución, se empleará la ecuación lineal de la recta, resultante de la curva de **calibración de triyoduro (Figura 21)**, donde la variable "x" corresponde a la **concentración de triyoduro** y la variable "y" corresponde a la **corriente** dada por la concentración de triyoduro. Por lo tanto se procede a despejar la variable x:

$$y = 2453.7x + 0.0059$$

$$x = \frac{y - 0.0059}{2454}$$

$$x = \frac{0.0714 - 0.0059}{2454} = \frac{0.0655}{2454}$$

$$x = 2.67 \times 10^{-5} \text{mmol}$$

Este valor es dividido entre el volumen de la celda lo que da la concentración del límite de detección en Molaridad ( $\text{molL}^{-1}$ ).

$$x = \frac{2.67 \times 10^{-5} \text{mmol}}{10 \text{mL}}$$

$$x = 2.67 \times 10^{-6} \text{mol/L}$$

Por lo cual se obtiene el límite de detección de triyoduro en solución que es de  $2.67 \times 10^{-6} \text{molL}^{-1}$ . De igual forma se procedió a calcular el límite de cuantificación empleando la ecuación 2 a la corriente residual de los experimentos presentados en la tabla 15.

$$\text{Límite de Cuantificación} = Y_b + 10S_b \quad (\text{Ecuación 2})$$

El límite de detección y cuantificación de triyoduro del experimento realizado se presenta en la Tabla16.

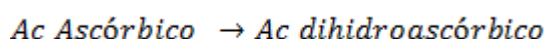
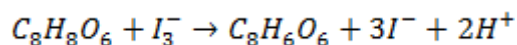
**Tabla 16: Límite de detección y cuantificación del triyoduro.**

<b>Límite</b>	<b>Corriente (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b>Concentración (<math>\text{molL}^{-1}</math>)</b>
<b>Detección</b>	0.0714	$2.67 \times 10^{-6} \text{molL}^{-1}$
<b>Cuantificación</b>	0.1064	$4.09 \times 10^{-6} \text{molL}^{-1}$

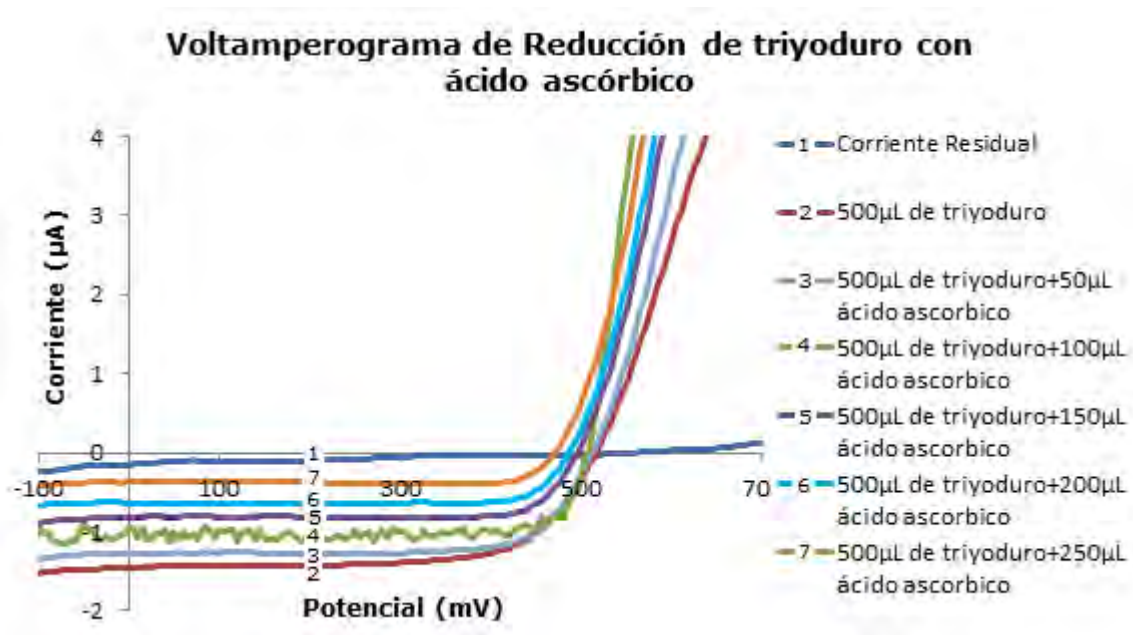
### **6.2.2. Estudio voltamperométrico de la reducción del triyoduro con ácido ascórbico.**

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

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



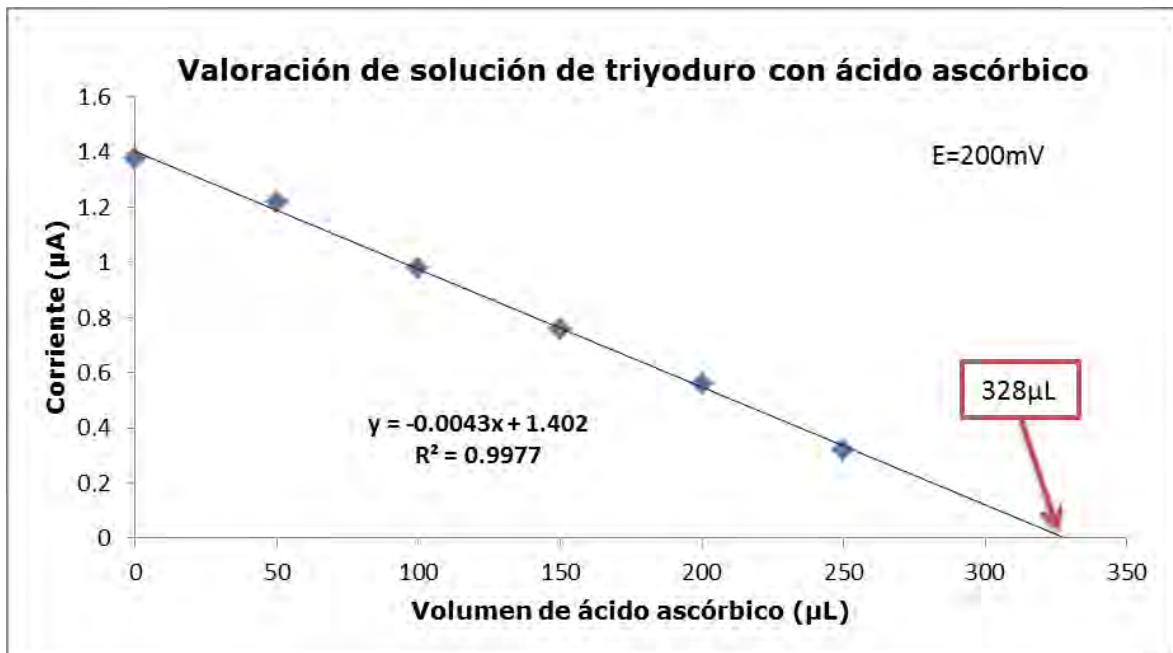
Se preparó una solución de ácido ascórbico de concentración aproximada de  $0.007 \text{ molL}^{-1}$ . Se realizó la titulación voltamperométrica de  $500 \mu\text{L}$  de solución de triyoduro  $0.0046 \text{ molL}^{-1}$ , se hicieron adiciones de  $50 \mu\text{L}$  de la solución de ácido ascórbico. El voltamperograma resultante se presenta en la siguiente figura 22.



**Figura 22: Voltamperograma de la titulación de ácido ascórbico con triyoduro  $0.0046 \text{ molL}^{-1}$ . Electrolito soporte:  $\text{LiNO}_3 \text{ } 0.1 \text{ molL}^{-1}$ , Electrodo de platino, solvente: mezcla 50:50 etanol-agua y velocidad de barrido:  $3 \text{ mV/s}$ .**

Como se puede ver en la figura anterior la señal de reducción del triyoduro disminuye al reaccionar con el ácido ascórbico. Esta disminución se puede representar de la siguiente manera; se miden la corriente límite de la señal del triyoduro con las adiciones de ácido ascórbico, a un potencial de  $200 \text{ mV}$ ; se elabora la curva de titulación voltamperométrica, que se encuentra representada en la figura 23.





**Figura 23: Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón de la titulación de ácido ascórbico con triyoduro  $0.0046\text{molL}^{-1}$ .**

Una vez obtenido el volumen de solución de ácido ascórbico, necesario para llegar al punto de equivalencia se puede calcular la concentración real de ácido ascórbico.

*En el punto de equivalencia:*

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

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

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (500 \mu\text{L de } I_3^-) \times (0.00458 \mu\text{mol}/\mu\text{L})$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = 2.2895$$

$$\mu\text{mol de Ac Ascórbico} = 2.2895$$

*Concentración de solución de ácido ascórbico:*

$$\text{Conc de Ac. Ascórbico} = \frac{\mu\text{mol de Ac. Ascórbico}}{\mu\text{L Ac. Ascórbico}}$$

$$\text{Conc de Ac. Ascórbico} = \frac{2.2895 \mu\text{mol de Ac. Ascórbico}}{328 \mu\text{L Ac. Ascórbico}}$$

$$\text{Conc de Ac. Ascórbico} = 0.00698M$$

Con estos cálculos se comprueba que la estequiometría del ácido ascórbico y el sistema  $I_3^-/I^-$  es 1 a 1 y con la concentración determinada experimentalmente y la teórica podemos obtener el porcentaje de pureza del ácido ascórbico con el siguiente cálculo.

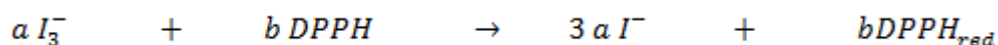
$$\text{Pureza de Ac. Ascórbico} = \frac{0.00698M}{0.007M} \times 100 = 99.7\%$$

El ácido ascórbico se cuantificó con la técnica de yodimetría voltamperométrica, ya que la señal analítica de cuantificación es la que pertenece a la reducción del triyoduro a yoduros. Esta titulación tiene 2 aspectos muy importantes con respecto a la aplicación para la determinación de la actividad antioxidante: la primera, es que el ácido ascórbico es un antioxidante bastante común tanto en la investigación, como en la industrial el segundo, que la estequiometría de la reacción es 1:1 lo cual facilita la manera de expresar el contenido de antioxidantes, ya que es muy común en los métodos de determinación de actividad antioxidante que dicha actividad se exprese en términos de un antioxidante conocido; en esta tesis se utilizará: **Equivalentes de Ácido Ascórbico (EAAsc)**, el cual se refiere a todas las sustancias antioxidantes que se reducen en presencia de triyoduro, tal como lo hace el ácido ascórbico.

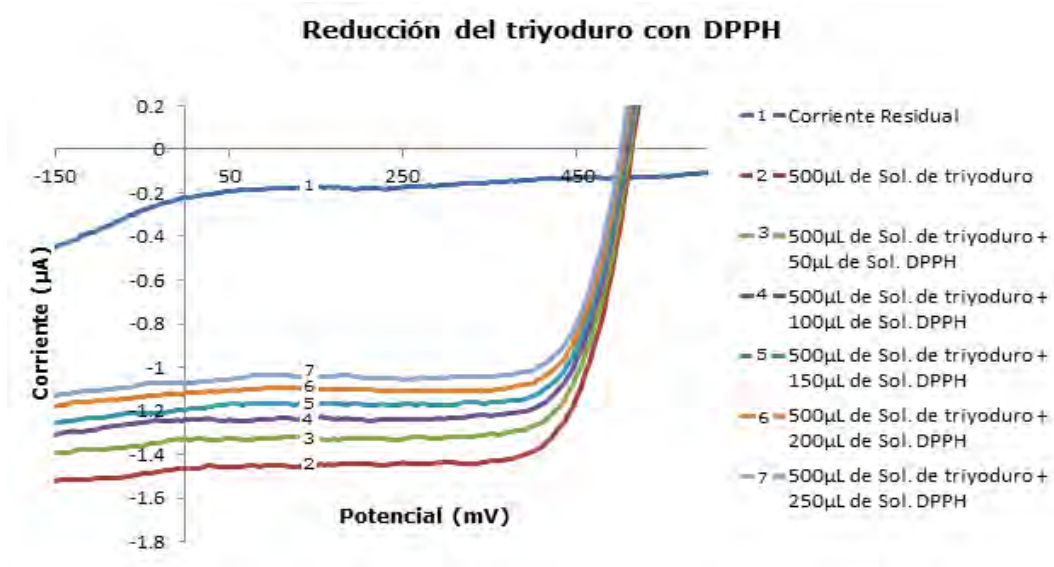
### 6.2.3. Estudio voltamperométrico de la reducción del triyoduro con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Se preparó una solución de DPPH  $0.005 \text{ molL}^{-1}$ ; para esto se pesó  $0.0498 \text{ g}$  de DPPH, se disolvió en metanol y después se llevó al aforo con agua desionizada en un matraz volumétrico de  $25.0 \text{ mL}$ . Esta solución fue titulada voltamperométrica con triyoduro.

En esta titulación con DPPH no se conocía la estequiometria de la posible reacción entre triyoduro y DPPH, por lo que se procedió a calcular los coeficientes estequiométricos (a y b) de la reacción planteada a continuación.

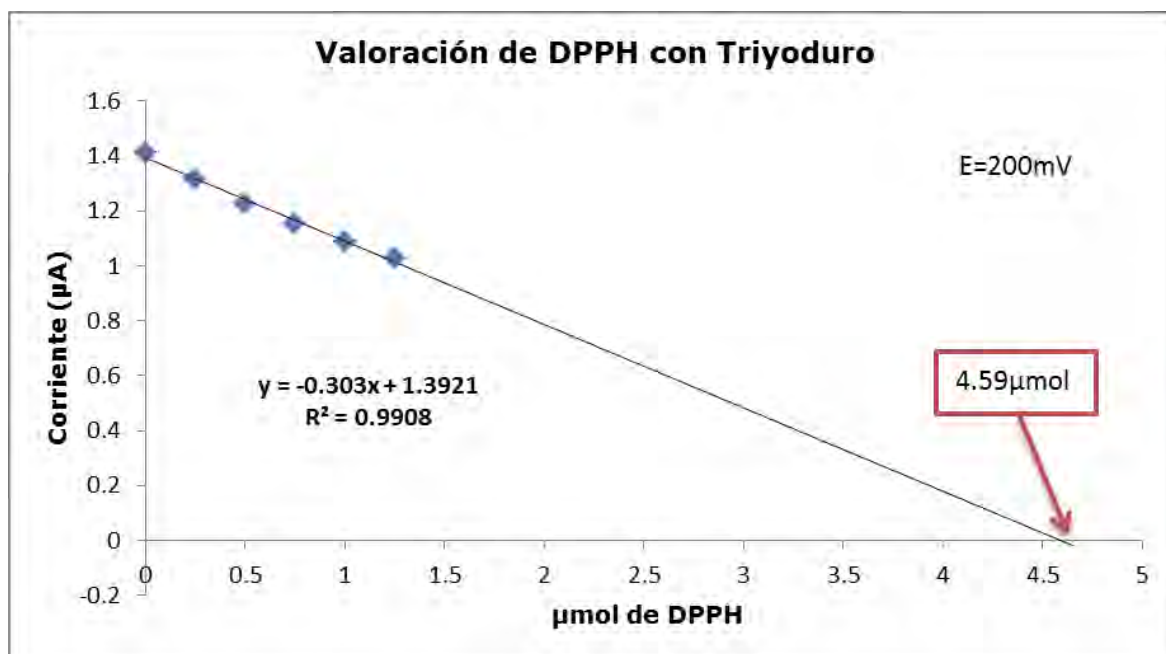


De la misma manera que se realizó la titulación de ácido ascórbico, se procedió con el DPPH: se agregaron  $500 \mu\text{L}$  de solución de triyoduro  $0.0046 \text{ molL}^{-1}$  y se hicieron adiciones de  $50 \mu\text{L}$  en  $50 \mu\text{L}$  de solución de DPPH. El voltamperograma, obtenidos en titulación se pueden observar en la figura 24.



**Figura 24: Voltamperograma de la titulación de DPPH con triyoduro  $0.0046 \text{ molL}^{-1}$ . Electrolito soporte:  $\text{LiNO}_3$   $0.1 \text{ molL}^{-1}$ , solvente: mezcla 50:50 etanol-agua velocidad de barrido:  $3 \text{ mV/s}$ .**

Se puede observar claramente que la corriente límite correspondiente a la reducción del triyoduro disminuye a medida que se adiciona solución de DPPH. La titulación voltamperométrica, con la corriente medida a 200 mV, se puede representar de la siguiente manera (Figura 25):



**Figura 25 Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón de la titulación de DPPH con triyoduro.**

El coeficiente de determinación es de ( $r^2=0.9908$ ) de la titulación, lo que demuestra el carácter lineal. Para determinar la estequiometría de la reacción entre DPPH y triyoduro se procedió a realizar los siguientes cálculos:

*Cantidad de  $I_3^-$  en la celda:*

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

$$\mu\text{mol de } I_3^- = (500\mu\text{L de } I_3^-) \times (0.00458 \mu\text{mol}/\mu\text{L})$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = 2.29\mu\text{mol}$$

La cantidad de DPPH se observa de manera directa en la representación de la figura 25, la cual es 4.59  $\mu\text{mol}$ .

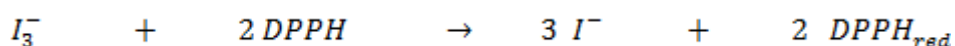
Para conocer los coeficientes estequiométricos (a y b) de la reacción entre el DPPH y el triyoduro se plantea la relación molar de la siguiente manera:

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

$$\frac{b}{a} = \frac{4.59 \mu\text{mol de DPPH}}{2.29 \mu\text{mol de } I_3^-}$$

$$\frac{b}{a} = 2.00$$

De la relación de los coeficientes estequiométricos obtenidos, se deduce que  $a = 1$  y  $b = 2$



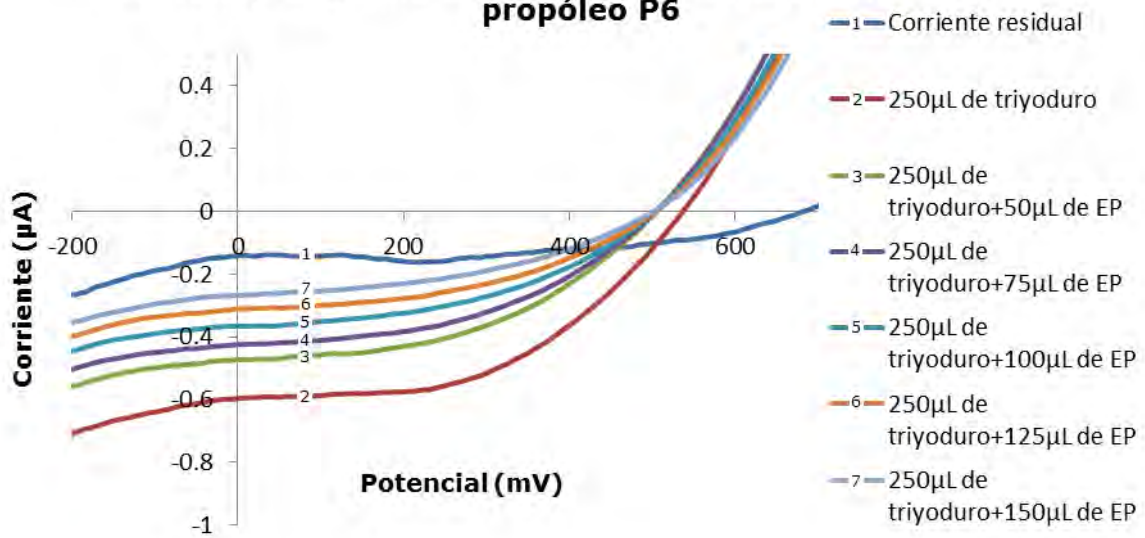
Y como el sistema de yodo intercambia 2 electrones, se deduce que la oxidación del DPPH consume 1 electrón. Lo que es congruente con la literatura sobre radicales libres.

#### **6.2.4. Estudios de extracción de propóleos.**

En las condiciones experimentales previamente descritas en la metodología, se realizaron titulaciones voltamperométricas con triyoduro para cada uno de los extractos de propóleo (EP).

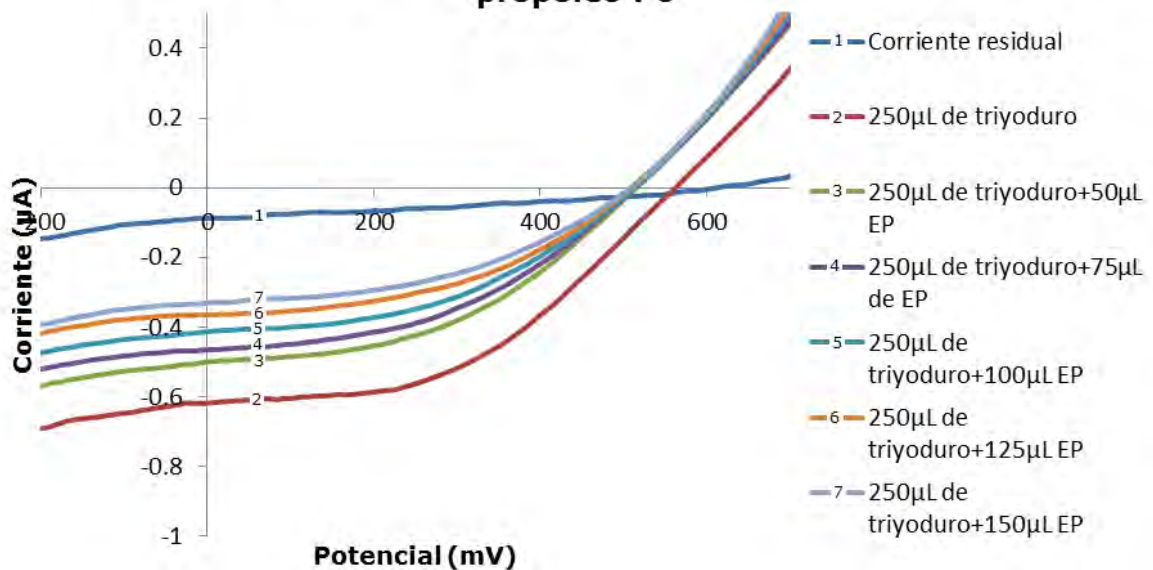
Se hicieron varias adiciones de cada extracto (25 $\mu$ L o 50 $\mu$ L) a la celda con triyoduro (250  $\mu$ L 0.0046 molL<sup>-1</sup>) y se hizo el barrido de potencial para cada disolución. Por ejemplo, para cada uno de los extractos del propóleo P6, se realizó una titulación voltamperométrica con el triyoduro 0.0046 molL<sup>-1</sup>. Las figuras 26 y 27 son las titulaciones voltamperométricas de las 2 primeras extracciones de este propóleo.

**Voltamperogramas de la titulación del extracto #1 del propóleo P6**



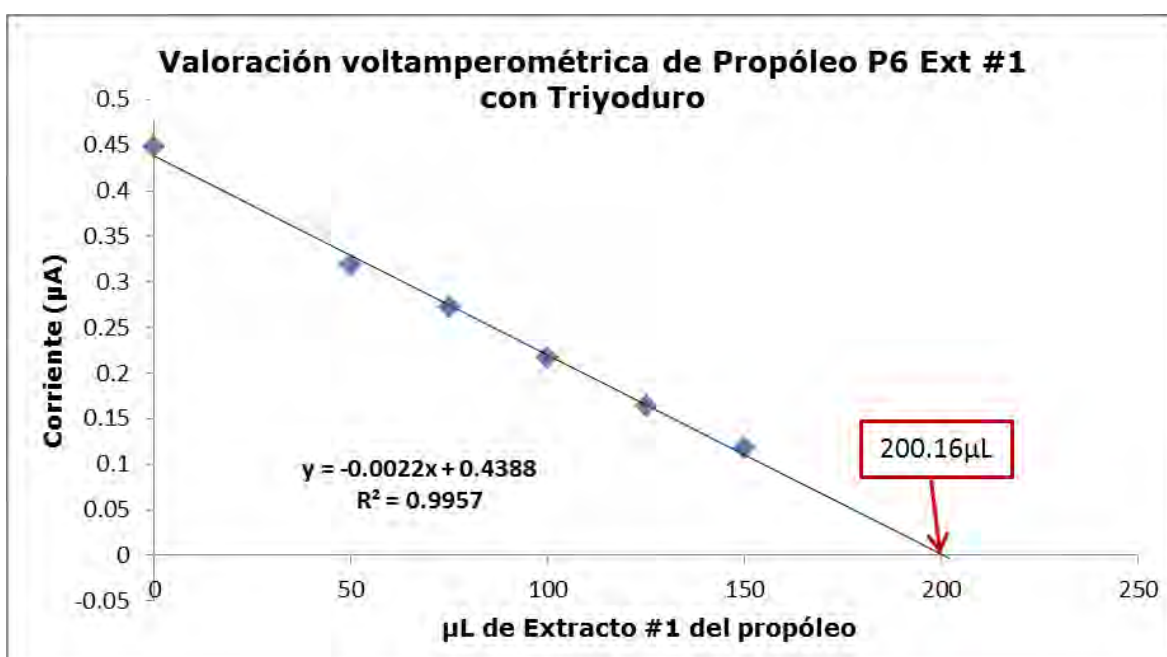
**Figura 26: Voltamperograma de la titulación del extracto #1 del propóleo P6 con triyoduro  $0.0046\text{molL}^{-1}$ . Electrolito soporte  $\text{LiNO}_3$   $0.1\text{molL}^{-1}$ , solvente mezcla hidroetanoica 50:50, velocidad de barrido  $3.0\text{ mV/s}$ .**

**Voltamperograma de la titulación del extracto #2 del propóleo P6**

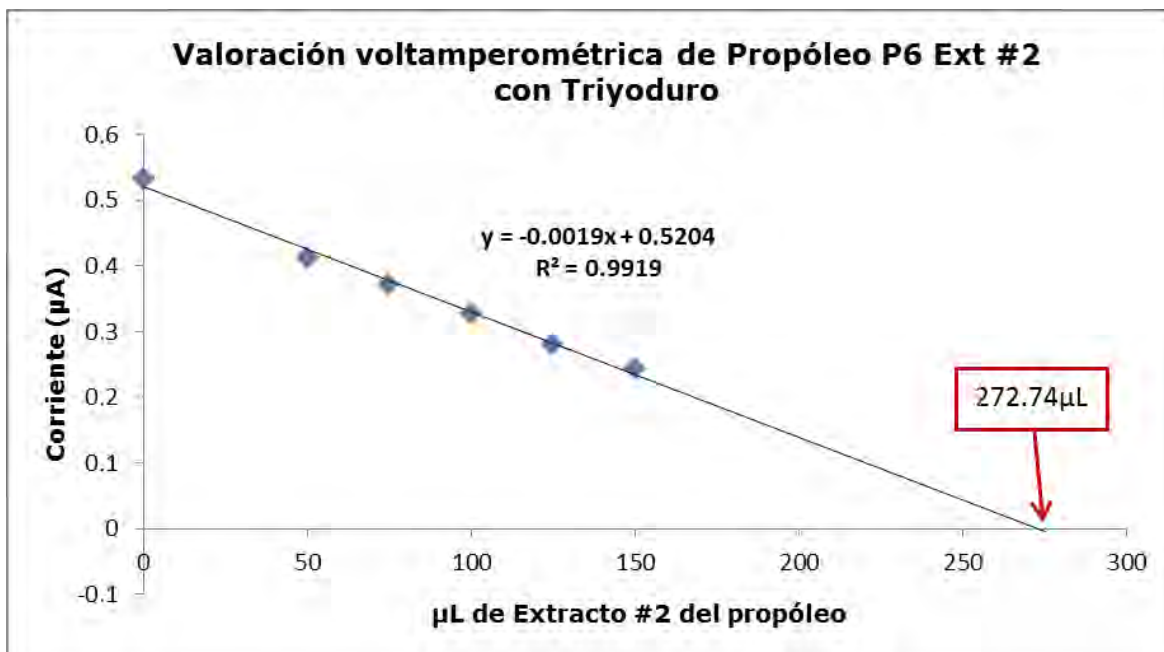


**Figura 27: Voltamperograma de la titulación del propóleo P6 extracto #2 con triyoduro  $0.0046\text{ molL}^{-1}$ . Electrolito soporte  $\text{LiNO}_3$   $0.1\text{ molL}^{-1}$ , solvente mezcla hidroetanoica 50:50, velocidad de barrido  $3.0\text{ mV/s}$ .**

Como se pueden observar en los voltamperogramas anteriores los extractos del propóleo P6, la corriente límite producida por la reducción de triyoduro (a un potencial de 200 mV), disminuye conforme se agrega el extracto de propóleo. El comportamiento es a simple vista similar al del ácido ascórbico y el DPPH. Se realizó la curva de titulación correspondiente a las 2 primeras valoraciones voltamperométricas del propóleo P6, midiendo la corriente límite a un potencial de 200 mV, con el objeto de identificar el punto final o estequiométrico de cada titulación (figura 28 y figura 29).



**Figura 28: Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón de la titulación del propóleo P6 extracción #1 con triyoduro.**

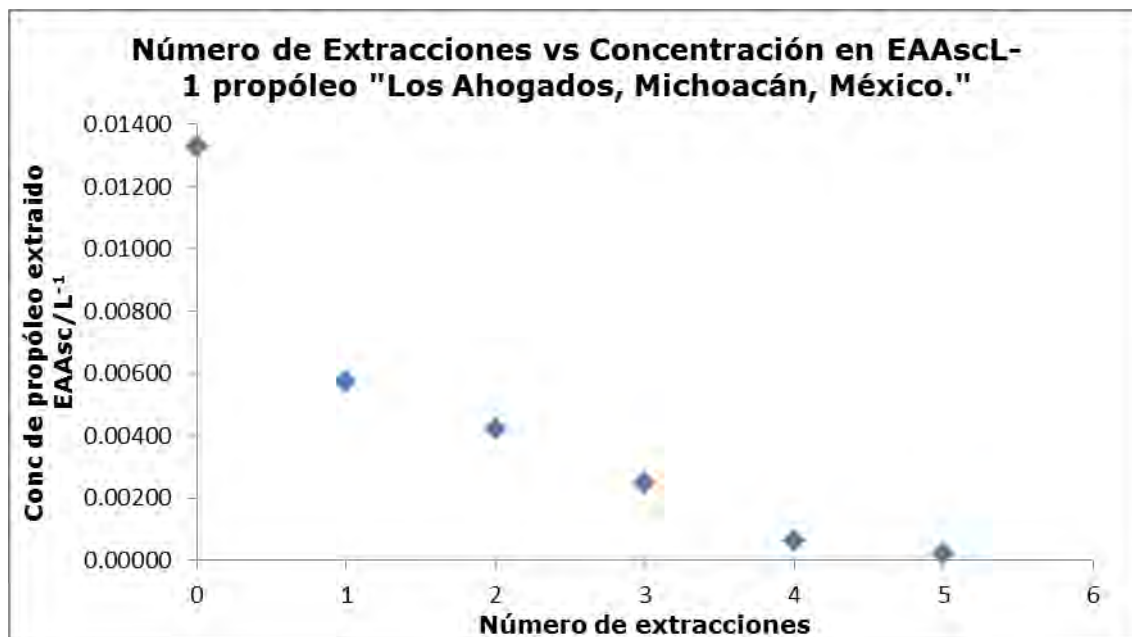


**Figura 29: Gráfico obtenido a partir del método de adiciones patrón de la titulación del propóleo P6 con triyoduro.**

Basados en los resultados experimentales del estudio de la extracción de propóleos se puede apreciar que el número de extracciones para cuantificar la totalidad de compuestos con propiedades antioxidantes en los propóleos depende de la concentración de los mismos.

Una manera de saber la cantidad de extracciones necesarias es si se conoce el coeficiente de reparto. El coeficiente de reparto en el caso de los propóleos será un coeficiente estimado, debido a que se tratan de una mezcla de compuestos naturales que cambian de muestra a muestra. Este coeficiente de reparto puede estimarse si se determina la cantidad de antioxidantes extraídos en cada una de las etapas de **extracción. Para calcular este coeficiente se utilizó el propóleo de "Los ahogados"** de Erongarícuaro Michoacán (P6); en este propóleo aunque se hicieron ocho extracciones como se indicó en la metodología al realizar la valoración polarográfica se observó que sólo las primeras 5 extracciones de este propóleo podían ser detectadas y cuantificadas por la metodología, las otras 3 extracciones quedaron por debajo del límite de detección. Con los resultados de las 5 extracciones se realizó el siguiente gráfico (Figura 30).





**Figura 30: Gráfico del número de extracciones respecto la concentración (EAAsc) del propóleo P6.**

Con el gráfico anterior y con los respectivos cálculos se determinó que el coeficiente de reparto de la extracción es de 0.616 (Anexo 2) el valor es estimado (por las razones mencionadas en la página anterior), solo es una ayuda para determinar el número de extracciones necesarias para extraer la mayor cantidad de antioxidantes. En la siguiente tabla se puede ver el porcentaje extraído en cada extracción (Tabla 17).

**Tabla 17: Determinación del porcentaje extraído respecto al número de extracción realizada.**

<b>Numero de extracción</b>	<b>Concentración en EAAsc.</b>	<b>% Extraído</b>
1	0.00575	43.27
2	0.00422	31.75
3	0.00247	18.57
4	0.00062	4.67
5	0.00023	1.74
<b>Total</b>	0.01328	<b>100.00</b>

Se realizó el cálculo del porcentaje de extracción de la siguiente manera:

$$\% \text{ Extracción} = \frac{\text{Conc. de cada extracción}}{\text{Conc. total en las extracciones}} \times 100\%$$

Con estos resultados experimentales se observa que para extraer más del 98% se necesitan realizar 4 extracciones. Con los otros propóleos se realizaron cuatro menos extracciones; la guía para determinar el número de extracciones ha sido la concentración de antioxidantes extraídos en las primeras extracciones y quedan ser medidos.

Como ya se mencionó anteriormente, los principales métodos para determinar la actividad antioxidante de alguna sustancia o mezcla expresan los resultados en relación con la capacidad de substituir un antioxidante conocido; algunos métodos incluso han reportado esta capacidad en equivalentes de ácido ascórbico (Palomino García, 2009). En este trabajo se presentan los resultados de la investigación como milimoles equivalentes de ácido ascórbico (EAAsc), 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 y de bajo costo.

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; Por ejemplo la primera extracción del propóleo P6 Ext #1.

*Se calculó la cantidad de triyoduro agregado:*

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

$$\mu\text{mol de } I_3^- = \left(0.0046 \frac{\mu\text{mol}}{\mu\text{L}}\right) \times (250 \mu\text{L})$$

$$\mu\text{mol de } I_3^- = 1.15 \mu\text{mol}$$

Si expresamos la cantidad de antioxidantes valorados en el extracto de propóleo (EP) en función de equivalentes de ácido ascórbico (EAAsc), en el punto de equivalencia se tiene:

$$\mu\text{mol de } I_3^- = \mu\text{mol de EAAsc (Antioxidantes)}$$

$$\mu\text{mol de EAAsc (Antioxidantes)} = 1.15$$

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

$$\text{Conc. EAAsc} = \frac{1.15 \mu\text{mol}}{200.16 \mu\text{L}}$$

$$\text{Conc. EAAsc} = 0.00575 \text{ M}$$

Se calcularon los milimoles equivalentes de ácido ascórbico en el primer extracto del propóleo P6 Ext #1; tomando en cuenta que el volumen del aforo de la solución fue de 25.0 mL, se puede calcular cuántos mmol de EAAsc/mL se encuentran:

$$\text{mmol de EAAsc en P6 Ext \#1} = \text{Conc. de EAAsc} \times \text{Vol (mL)}$$

$$\text{mmol de EAAsc en P6 Ext \#1} = 0.00575 \text{ M} \times 25.0 \text{ mL}$$

$$\text{mmol de EAAsc en P6 Ext \#1} = 0.144 \text{ mmol}$$

Se procedió de la misma manera para calcular los milimoles de EAAsc en P6 Ext #2, solamente se modificó el volumen inicial de triyoduro a 250 $\mu$ L, dando el siguiente resultado:

$$\text{mmol de EAAsc en P6 Ext \#2} = 0.105 \text{ mmol}$$

Para obtener la actividad antioxidante (mmol de EAAsc/g de propóleo) de cada propóleo se hace la suma de todas sus extracciones (totales) y se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad Antioxidante} = \frac{\text{mmol de EAAsc en P6 totales}}{\text{gramos de propóleo}}$$

Para el propóleo P6 se tiene el siguiente resultado:

$$\text{Actividad Antioxidante} = \frac{0.0133 \text{ mmol EAAsc}}{3.0004 \text{ g}} = 0.1106 \frac{\text{mmol EAAsc}}{\text{gramo de propóleo}}$$

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 18: Resultados de actividad antioxidante en propóleos.**

<b>Propóleos</b>	<b>Número de extracciones</b>	<b>Masa extraída (g)</b>	<b>mmol de EAAsc* totales</b>	<b>Actividad antioxidante (mmol EAAsc*/g de propóleo)</b>
P1	4	3.0075	0.2722	0.0905
P2	3	3.0075	0.2737	0.0910
P3	3	3.0190	0.1552	0.0514
P4	3	3.0030	0.0658	0.0219
P5	3	3.0188	0.1105	0.0366
P6	5	3.0004	0.3439	0.1106
P7	3	3.0057	0.1259	0.0419
P8	2	3.0021	0.0352	0.0117

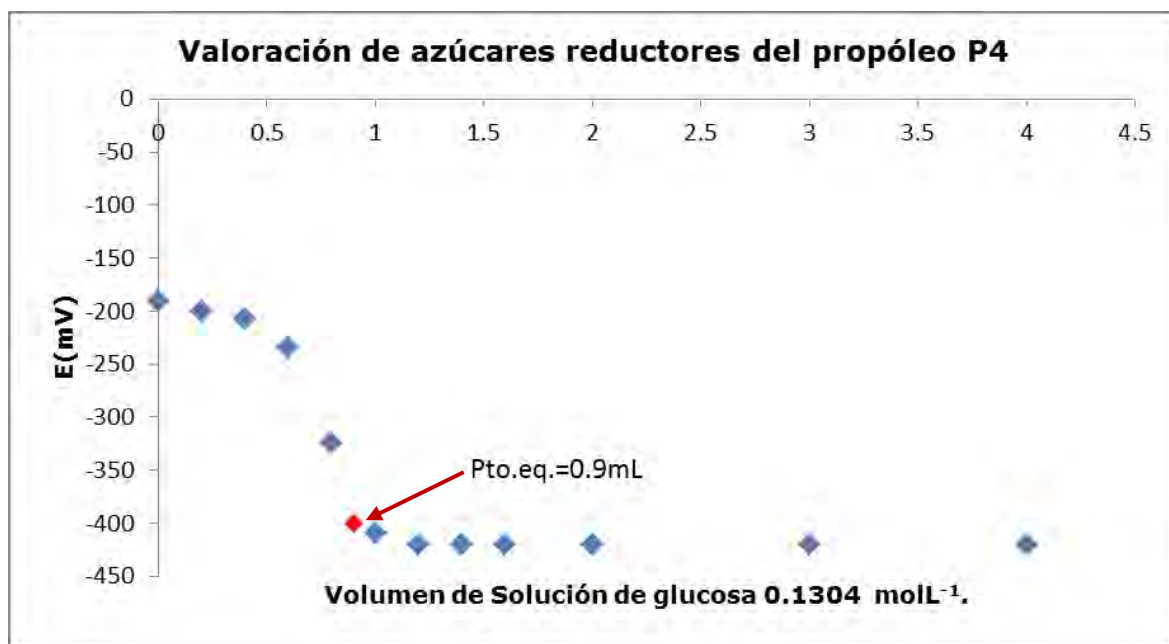
\*EAAsc: Equivalentes de ácido ascórbico.

Los resultados obtenidos de los propóleos estudiados en esta investigación se encuentran en un intervalo entre 0.011 a 0.110 mmolEAAsc/g de propóleo, lo cual indica que hay una diferencia aproximada de 10 veces más grande, lo cual indica que la actividad antioxidante del propóleo depende mucho de cada especie de abeja, por lo cual, no podemos definir un intervalo general pues la cantidad de muestras aun es baja; sin embargo, algo que plantea este trabajo son perspectivas interesantes para futuras aplicaciones. Hay diversos factores que podrían interferir en la correcta medida 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, para comparar parámetros fisicoquímicos específicos.

### 6.2.5. Determinación de azúcares reductores en propóleos.

Para esta determinación, se empleó el método de Fehling, de manera distinta a la determinación de azúcares reductores en la miel, ya que la concentración de azúcares reductores en los propóleos es mucho menor que en la miel, por lo cual, en este caso se adicionó un exceso de cobre (II) a los extractos de propóleo y se tituló este exceso de cobre (II) con una solución de glucosa estandarizada  $0.01304\text{molL}^{-1}$ . Para hacer una ilustración de los resultados obtenidos, se tomará como ejemplo el propóleo P3. En donde para identificar el punto de equivalencia se hará de la misma forma que en la determinación de azúcares reductores en la miel debido a que la titulación es similar (figura 31).



**Figura 31: Curva de valoración potenciométrica de solución de glucosa con el extracto del propóleo P3 con exceso de reactivo de Fehling.**

Para ejemplificar los cálculos necesarios se toma el mismo propóleo P3. Su punto de equivalencia se encuentra en 0.9 mL de solución de glucosa  $0.01304 \text{ molL}^{-1}$  para encontrar el porcentaje de azúcares reductores se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{mmol Cu}_{\text{tot}}^{2+} = \text{Conc de Cu}_{\text{tot}}^{2+} \times \text{Vol agregado de Cu}_{\text{tot}}^{2+}$$

$$\text{mmol Cu}_{\text{tot}}^{2+} = 0.261 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL}$$

$$\text{mmol Cu}_{\text{tot}}^{2+} = 0.2610 \text{ mmol}$$

Se calculan los mmol de Cu (II) que están en exceso con el estándar de glucosa de la siguiente manera:

$$\text{mmol de glucosa} = \text{Vol de glucosa al Pto. eq.} \times \text{Conc. de Glucosa}$$

$$\text{mmol de glucosa} = 0.9 \text{ mL} \times 0.01304 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}$$

$$\text{mmol de glucosa} = 0.01174 \text{ mmol}$$

Por la estequiometría de la reacción:

$$\text{mmol de Cu}_{\text{exceso}}^{2+} = \text{mmol de glucosa} \times 5$$

$$\text{mmol de Cu}_{\text{exceso}}^{2+} = 0.1174 \text{ mmol de glucosa} \times 5$$

$$\text{mmol de Cu}_{\text{exceso}}^{2+} = 0.0587 \text{ mmol de glucosa}$$

Se calcula el Cu (II) que reacciona con los azúcares reductores para obtener los mg de azúcares reductores en el propóleo utilizando la masa molar de la glucosa y fructosa  $180 \text{ mg mmol}^{-1}$ .

$$\text{mmol de Cu}_{\text{propoleo}}^{2+} = \text{mmol de Cu}_{\text{total}}^{2+} - \text{mmol de Cu}_{\text{exceso}}^{2+}$$

$$\text{mmol de Cu}_{\text{propoleo}}^{2+} = 0.2610 \text{ mmol} - 0.02587 \text{ mmol}$$

$$\text{mmol de Cu}_{\text{propóleo}}^{2+} = 0.2023 \text{ mmol}$$

Por estequiometría:

$$\text{mmol de Az.Red.} = \text{mmol de Cu}_{\text{propóleo}}^{2+} \times 5$$

$$\text{mmol de Az.Red.} = 0.2023 \text{ mmol} \times 5$$

$$\text{mmol de Az.Red.} = 1.1012 \text{ mmol}$$

$$\text{mg de Az.Red.} = \text{mmol de Az.Red.} \times \text{Masa Molar Az.Red.}$$

$$\text{mg de Az.Red.} = 1.1012 \text{ mmol} \times 180.16 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$$

$$\text{mg de Az.Red.} = 182.24 \text{ mg} = 0.1822 \text{ g}$$

Para determinar el porcentaje de azúcares reductores se calcula con la masa de propóleo pesado y los gramos de azúcares reductores en ese mismo propóleo y multiplicando por 100. Siguiendo el ejemplo del propóleo P3 cuya masa fue de 5.0257 g.

$$\% \text{ de Az.Red.} = \frac{0.1822 \text{ g}}{5.0257 \text{ g}} \times 100 = 3.626 \% \text{ de Azucares Reductores en P3.}$$

De igual manera se hicieron los cálculos para la valoración de Fehling de las muestras de propóleos restantes. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19: Resultado de azúcares reductores en extractos de propóleos.**

<b>Propóleos</b>	<b>Masa de propóleo pesada. (g)</b>	<b>Vol. de glucosa al Pto. eq. (mL)</b>	<b>% de Azúcares Reductores</b>
<b>P1</b>	5.0015	0.2	4.466
<b>P2</b>	5.0775	1.4	3.011
<b>P3</b>	5.0257	0.9	3.626
<b>P4</b>	5.0328	0.6	3.971
<b>P5</b>	5.0047	1.7	2.702
<b>P6*</b>	-----	-----	-----
<b>P7</b>	5.2704	2.5	1.674
<b>P8*</b>	-----	-----	-----

**\*Para estos propóleos no se pudo realizar la extracción debido a falta de muestra para la determinación.**

A pesar de que la composición de los propóleos depende de muchas variables y de una amplia diversidad de factores; los porcentajes de azúcares reductores de cada propóleo son muy similares, lo cual, indica que esta metodología es bastante fiable para realizar este tipo de determinaciones, ya que los propóleos presentan concentraciones bajas de azúcares reductores y el método responde de manera satisfactoria.



### 6.3. TABLAS DE RESULTADOS GLOBALES

**Tabla 20: Resultados globales de las mieles de meliponinas colectadas en la cuenca del río Balsas en Michoacán.**

<i>Muestras</i>	<i>% Humedad</i>	<i>% Cenizas</i>	<i>pH</i>	<i>% de Az. Reductores de la miel</i>	<i>Acidez Libre (meq*kg)</i>	<i>Acidez Lactónica (meq*kg)</i>	<i>Acidez total (meq*kg)</i>	<i>% de fructosa en la miel</i>	<i>HMF</i>
<b>MMfMichP1</b>	27	0.018	3.34	62.04	17.91	0	17.91	11.5	MLD
<b>MMfMichO2</b>	25.8	0.007	3.86	65.73	5.44	0	5.44	21.9	MLD
<b>MPIMichP3</b>	36.4	0.348	3.8	47.89	179.97	0	179.97	22.1	MLD
<b>MPIMichO4</b>	31.4	0.13	3.4	49.99	49.29	0	49.29	28.2	MLD
<b>MShMichP5</b>	43	0.095	3.31	48.84	87.31	0	87.31	21.4	MLD
<b>MShMichO6</b>	27.8	0.067	3.18	59.47	82.13	0	82.13	17.9	MLD
<b>MNpMichP7</b>	26	0.251	4.25	42.93	51.79	0	51.79	15.2	MLD
<b>MNpMichO8</b>	28	0.199	3.88	47	70.5	0	70.5	16	MLD
<b>Promedio</b>	<b>30.67</b>	<b>0.14</b>	<b>3.63</b>	<b>52.99</b>	<b>68.04</b>	<b>0</b>	<b>68.04</b>	<b>19.28</b>	<b>0</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>5.7</b>	<b>0.11</b>	<b>0.35</b>	<b>7.71</b>	<b>50.19</b>	<b>0</b>	<b>50.19</b>	<b>4.86</b>	<b>0</b>

Se puede observar que la humedad, la acidez libre y total presentan una variación de sus valores relativamente alta. Además, se puede observar claramente en la tabla 20, que las mieles de la cuenca del río Balsas, Michoacán no presentan contenido de HMF y de acidez lactónica, lo cual es un indicio de que la miel es de alta calidad.

**Tabla 21: Resultados globales de las mieles de meliponinas colectadas en Oaxaca**

<i>Muestras</i>	<i>% Humedad</i>	<i>% Cenizas</i>	<i>pH</i>	<i>% de Az. Reductores de la miel</i>	<i>Acidez Libre (meq*kg)</i>	<i>Acidez Lactónica (meq*kg)</i>	<i>Acidez total (meq*kg)</i>	<i>% de fructosa en la miel</i>	<i>HMF</i>
<b>MbnOax12</b>	30.6	0.1	2.93	51	114.84	76.56	191.4	10.9	135.1
<b>MMbOax13</b>	19	0.03	3.12	67.64	59.83	65.27	125.1	21.3	172.7
<b>MSpOax14</b>	23.2	0.08	3.06	58.57	163.82	81.91	245.73	16.7	173.4
<b>MSmOax15</b>	22.8	0.08	3.14	59.65	124.71	86.76	211.47	14	117.9
<b>MMbOax16</b>	20.6	0.18	3.5	57.96	196.98	54.72	251.7	23.6	253.1
<b>MMbOax17</b>	23.2	0.03	3.14	63.44	82.07	0	82.07	19.7	156
<b>MPfOax18</b>	27	0.28	3.01	47.48	284.85	0	284.85	12.2	188.8
<b>MMbOax19</b>	23.6	0.05	3.11	61.5	87.64	43.82	131.47	15.7	179.4
<b>Promedio</b>	<b>23.75</b>	<b>0.1</b>	<b>3.13</b>	<b>58.41</b>	<b>139.34</b>	<b>51.13</b>	<b>190.47</b>	<b>16.76</b>	<b>172.1</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>3.61</b>	<b>0.08</b>	<b>0.17</b>	<b>6.5</b>	<b>73.86</b>	<b>34.55</b>	<b>71.37</b>	<b>4.47</b>	<b>40.46</b>

Se puede observar que la variación en la acidez de los 3 tipos y el contenido de HMF es relativamente alta, debido en parte a la complejidad de la composición de la miel y al manejo de las muestras. También se observa que son las únicas mieles que presentan acidez láctica lo cual puede ser un indicio de que la antigüedad de la miel y la formación de lactonas tengan relación; pero es solo una hipótesis ya que para confirmarla se necesita hacer más estudios respecto a este tema.

**Tabla 22: Resultados globales de las mieles de *Apis* melífera recientemente colectadas en Guatemala, Chiapas y Morelos.**

<i>Muestras</i>	<i>% Humedad</i>	<i>% Cenizas</i>	<i>pH</i>	<i>% de Az. Reductores de la miel</i>	<i>Acidez Libre (meq*kg)</i>	<i>Acidez Lactónica (meq*kg)</i>	<i>Acidez total (meq*kg)</i>	<i>% de fructosa en la miel</i>	<i>HMF</i>
<b>AGuat20</b>	19	0.044	3.74	70.8	20.77	0	20.77	29.2	39.3
<b>AGuat21</b>	19	0.075	4.4	70.87	15.3	0	15.3	25.2	MDL
<b>AGuat22</b>	18.4	0.061	4.08	70.74	20.67	0	20.67	32.9	19.7
<b>AGuat23</b>	19.2	0.044	3.71	65.83	24.41	0	24.41	19.6	29.7
<b>AGuat24</b>	17.8	0.09	4.19	71.41	20.55	0	20.55	18.2	32.7
<b>AGuat25</b>	17.8	0.078	4.02	70.15	15.61	0	15.61	27.3	MDL
<b>AChi26</b>	19.8	0.032	3.83	70.27	10.81	0	10.81	21.5	14.5
<b>AMor27</b>	18.6	0.038	3.94	73.84	10.84	0	10.84	12.9	MDL
<b>Promedio</b>	<b>18.7</b>	<b>0.06</b>	<b>3.99</b>	<b>70.49</b>	<b>17.37</b>	<b>0</b>	<b>17.37</b>	<b>23.35</b>	<b>27.18</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0.69</b>	<b>0.02</b>	<b>0.23</b>	<b>2.21</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>6.52</b>	<b>10.01</b>

Se puede observar que la variación en todos los parámetros, a diferencia de las 2 tablas anteriores (20 y 21), es mucho menor; esto nos indica que las variaciones de los parámetros principales de la calidad de la miel dependen mucho del tipo de abeja (tribu *Apis* o *Meliponini*). Por otro lado comprobamos que entre las abejas *Apis* estas pequeñas variaciones permiten tener una normatividad; para las *Meliponini* es muy difícil establecer una normatividad similar debido a la variabilidad de su composición química, asociada a las diferentes especies. También se observa que las mieles presentan un bajo contenido de HMF y nada de acidez láctica lo cual indica su alta calidad.

## **7. CONCLUSIONES**

- Las mieles de *Meliponini* colectadas en el río Balsas, Michoacán presentan un contenido de HMF por debajo de límite de detección lo cual nos indica que la miel es de excelente calidad y tuvo un buen manejo tanto al almacenar como al transportar.
- Las mieles de *Meliponini* colectadas en Oaxaca en el 2012 presentan un alto contenido de HMF; esto se puede explicar debido al calentamiento y al tiempo que tienen de antigüedad.
- Las mieles de *Apis* melífera analizadas en este trabajo cumplen de manera satisfactoria con la norma mexicana respecto al contenido de HMF pues contienen menos de 40 ppm, e incluso algunas tienen menos del límite de detección que es, para el medio empleado, cercano a 400 ppb.
- Respecto al pH, las mieles que presentan un pH más ácido son las mieles de Oaxaca, las cuales presentan el promedio más bajo de las mieles analizadas (tablas 20, 21 y 22).
- Respecto al contenido de humedad, las mieles con el contenido más alto fueron las de *Meliponini* colectadas en la cuenca del río Balsas en Michoacán. Posiblemente sea debido a que eran mieles recién colectadas.
- El contenido de azúcares reductores totales y fructosa es mayor en las mieles de *Apis* melífera, lo que explica su mayor comercialización. En el caso de las *Meliponini* depende del género y la especie.
- Respecto a la acidez libre y total observamos en las tablas (20, 21 y 22) que este parámetro presenta valores más altos en las mieles de *Meliponinas* colectadas en Oaxaca y los valores mas bajos en *Apis* melífera; esto posiblemente se deba a la antigüedad de las mieles de Oaxaca y también al tipo de abeja ya que la acidez de las mieles de Michoacán es alto respecto a las mieles de *Apis* melífera pero bajo respecto a las mieles de Oaxaca.

- Otro punto que es importante recalcar es que la acidez láctica sólo se presentó en abejas de Oaxaca (salvo 2 casos: las muestras MMbOax17 y MPfOax18). Esto puede ser un indicio de la validez de nuestra hipótesis de que la acidez láctica se relacione con el tiempo de almacenamiento, pero también puede indicar que dependa de la especie de abeja o al origen floral.
- En los tres grupos de mieles estudiadas, el porcentaje de cenizas cumple con la norma mexicana para miel de *Apis*. Las mieles de *Apis* son las que tienen el menor porcentaje de cenizas. Las mieles que presentan el mayor contenido de cenizas son las de las *Meliponinas* colectadas en Michoacán, este resultado podría ser causado por la zona geográfica y el tipo de abeja que la habita.
- Respecto al contenido de sacarosa las mieles que más contienen, son las mieles de *Apis mellifera*, esto podría ser deberse a una cosecha prematura o al origen floral. Todas las mieles cumplen con la norma mexicana.
- Como se puede observar en la tabla 22 todas las mieles de *Apis mellifera* cumplen la norma mexicana de miel en todos sus parámetros lo cual nos indica que son mieles de buena calidad.
- Para las mieles de *Meliponini*, los parámetros varían mucho, por lo cual, es muy difícil establecer una normatividad similar a la de *Apis mellifera*. Deben tenerse más datos para tener un estudio estadístico más completo de las *Meliponini* y conocerlas primero antes de elaborar una norma.
- Respecto a la actividad antioxidante de propóleos, la yodimetría voltamperométrica ha sido utilizada de manera satisfactoria para determinar este parámetro. Es correcto expresar la actividad antioxidante a partir de las titulaciones yodimétricas en moles de equivalentes de ácido ascórbico (EAAsc).
- Respecto a la determinación de azúcares reductores en propóleos, se utilizó una modificación del método de Fehling que resulto adecuado para esta determinación, debido a la baja cantidad de azúcares reductores presentes en los propóleos, los cuales están por debajo del 5%.

- Para el caso de mieles de *Meliponini*, todas las determinaciones que se realizaron, se tuvieron que adecuar debido a la poca cantidad de muestra, pues estas abejas producen relativamente muy poca cantidad de miel, con cualidades diferentes a la miel de *Apis*.

## **8. BIBLIOGRAFIA.**

- Acquarone C., Buera P. y Elisalde B. (2007). Pattern of pH and electric conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating origin of honeys. *Food Chemistry*. 695-703
- Alarcon R.C. y Ibañez L.C. (2008). Determinación de las Características Fisicoquímicas 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.
- Antonio J. Manrique y Weyder C. Santana. (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. *Zootecnia Tropical*, Vol. 26, No. 2.
- AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington: AOAC.
- Asís M. (1979). El propóleo, un valioso producto apícola, Ed. Centro de Información y documentación Agropecuario, La Habana, Cuba.
- Asís M. (1996). Apiterapia para todos. Instituto cubano del libro. Editorial Científico técnico del medio. Ciudad de la Habana Cuba.
- Asís, M. (1989). Composición y usos de la miel, cera, polen, jalea real, propóleos y venenos de las abejas. *Los Productos de la colmena. Madrid, España. Edit. Acribia*, 25-31.

- Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Folia Entomológica Mexicana* 106:1-123.
- Bankova V., (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 29-32.
- Bankova V., De Castro S.L. y Marcucci M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 3-15.
- Baquero L. y Stamatti G. (2006). *Cria y manejo de abejas sin aguijón*. Ediciones del Subtropico. Tucumán, Argentina.
- Beatriz C.B.S. Mello y Miriam D. Hubinger (2012). Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *International Journal of Food Science and Technology* 2012, 47, 2510–2518.
- Bedascarrasbure, E. (2011). Propóleos: Un Valioso Producto de la Colmena. *Horizonte Agroalimentario*, 4-7. Buenos Aires, Argentina.
- Bennett C. (1964) Stingless beekeeping in western México. *The Geographical Review*, 54: 85-92.
- Benzi G. y Moretti A. (1995). Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione System. *Free Rad Biol Med*:19(1): 77-101.



- Blanca R. y Alejandra M. (2014). Development and Validation of a RP-HPLC Method for the Simultaneous Quantification of Flavonoids Markers in Mexican Propolis. *Food Anal. Methods*. 413-419
- Bogdanov S. (2011). Honey Composition. *The honey Book*, Chapter 5. Available in: <http://www.bee-hexagon.net>.
- Bolaños K., Maldonado M. y 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.
- Borque, C. (1982). Tipificación de las principales mieles monoflorales españolas. INIA. Serie Agrícola. Valladolid. pag 20.
- Castaldo S. y Capasso F. (2002). Propolis, and old remedy in modern medicine. *Fitoterapia*, S1-S6.
- Codex Alimentarius. (2001). Norma de miel.
- Cortopassi-Laurino M., Imperatriz-Fonseca V., Roubik D., Dollin A., Heard T., Aguilar I., Venturieri G., Eardley C. y Nogueira-Neto P. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37, 275-292.
- Crane, E. (1992). The past and the Present Status of Beekeeping with Stingless Bees. *Bee World* 73 (1): 29-42.
- Dardon 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.

- Dardon M.J. y 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.
- Demianowicz Z. (1971). Caracteristiques des miels de conniferes selon leur spectre microscopique et quelques propriétés physicochimiques. XXIII Congr. Int. Apic. Moscú. Rusia.
- Diana Romero y O. Reyes. (2013). Estudio de la calidad de la miel basado en procedimientos electroquímicos. Posgrado Facultad de química. UNAM. Tesis.
- Diego Francisco Chicas Baños y O. Reyes (2014). Determinación de Parámetros fisicoquímicos en mieles y propóleos de distintos géneros de abejas por medio de Técnicas Electroanalíticas. Universidad de El Salvador, San Salvador. Tesis.
- Ehara M.A., Amarante ,.K., Conti B.J. y Sforcin J.M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 63, 1378-1386.
- FAO. (2015). FAOSTAT, Estadísticas de la FAO. Obtenido de <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway7go/to/home/S>.
- Floyd R.A. (1984). Free radicals in molecular biology, aging and disease. New York: Raven.
- Foster G.M. (1942). Indigenous apiculture among the Popoluca of Veracruz. *Am Anthropol*, 44:538-542.

- García J.C., Clapés S., Céspedes E.M., Simplicio O. y Morín M.A. (1994). Radicales libres sueños moleculares o realidades clínicas. *Rev Cubana Invest Biomed*; 13(1-2):12-8.
- Gazcón Orta N. (2012). Aplicación electroquímica analítica a el control de calidad de productos apícolas. Tesis de Doctorado: Universidad Nacional a Distancia. Madrid, España.
- Gonzalez Guerra, A. y Bernal Mendez, R. (1997): "Propóleos. Un camino hacia la salud". Ed. Pablo de la Torriente. Cuba.
- González-Acereto, J. A. y De Araujo-Freitas, J. Ch. (2005). Manual de Meliponicultura Mexicana. Universidad Autónoma de Yucatán y Fundación Produce Guerrero. México, 46 pp.
- Gorgarovíc S., Alvarez-Suarez J.M., Novakovic M.M., Pastor F., Pezo L., Battino M. y 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 and Analysis*, 30, 13-18.
- Grange J. y Davey R. (1990). Antibacterial Properties of propolis (Bee Glue). *Journal of Royal Society of Medicine*, 83, 159-160.
- Greenwald, R. 1990. "Current approaches to the development of oxygen radical scavengers", in *Drugs of Today*. 26, pp. 299-307.
- Gutiérrez M.G., Enríquez E., Lusco L., Rodríguez-Malaver A., Persano L. y Vit P. (2008). Caracterización de mieles de Melipona Beecheii y Melipona Solari de Guatemala. *Rev Fac Farm*, 50(1), 2-6.

- Guzmán-Díaz M. A., Rincón-Rabanales, M. y Vandame, R. (2004). *Manejo y conservación de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini)*. ECOSUR. Tapachula, México.
- Hendrichs PR. (1941). El cultivo de abejas indígenas en el Estado de Guerrero. *México Antiguo* 5: 365-73.
- Hernández J., Goycolea F., Acosta A., Castañeda M., Domínguez Z., Robles R., Vasquez-Moreno L., Velazquez E., Astiazaran H., Lugo E., Velazquez C. (2007). Sonoran Propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cáncer cell lines. *Planta Med*, 73, 1469-1474.
- Heyrovsky, J. y Zuman, P., (1968). Practical polarography : an introduction for chemistry students ions. London. 237 p.
- Jaime Lorén J.M. (2003). Sobre la primica hispana en cuanto a los envíos de abejas europeas a América. *ILUIL*, 26, 595-612.
- Kent R. (1984). Mesoamerican stingless beekeeping. *Journal of Cultural Geography* 4(2): 14-28.
- Kumazawa S., Hamasaka T. y Nakayama T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* , 84, 329–339.
- Lady Rossana P. (2010). Caracterización Fisicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 63(1).

- Ligia B., Klaus M. y Andreia H. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science and Technology* 2013, 48, 1698–1706.
- Lilibeth Cabera y Graciela Ojeda (2003). Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellifera scutellata*) de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Venezuela. *Revista científica, FCV-LUZ/Vol XIII*.
- Manrique A. y 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.
- Marcia A. y Mario S. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* N° 494– II Sem.: 161-172.
- Marta Kuskoski (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol N°4. 726-732.
- Mato I, Huidobro F, Sánchez P, Muniategui S, Fernández M, Sánchez T.(1997). Enzymatic determination of total D-gluconic acid in honey. *J Agric Food Chem*; 45: 3550-3553.
- Michener C. (2007). *The Bees of the World*. 2nd edition. The Johns Hopkins University Press. USA.

- Murtala B. Abubakar y Wan Z. Abdullah (2014). Polyphenols as Key Players for the Antileukaemic Effects of Propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 11 pages.
- Nakanishi, I., Y. Uto, K. Ohkubo, K. Miyazaki, H. Yakumaru, S. Urano, H. Okuda, J.-I. Ueda, T. Ozawa, K. Fukuhara, S. Fukuzumi, H. Nagasawa, H. Hori, y N. Ikota. (2003). Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Org. Biomol. Chem.* 1:1452-1454.
- Nates-Parra, G. J., M. Rosso, M. Cepeda y J. Lugo. (2009). Características de la Meliponicultura en Colombia. Laboratorio de investigación en abejas (LABUN). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Nogueira-Neto P. (1962). Novos estudos sobre Meliponíneos. *Chácaras e Quintais*, 106(2): 324.
- Nogueira-Neto P. (1997). *Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão*. Ed. Nogueirapis, São Paulo, Brasil.
- Norma mexicana, NMX-F-036-MORMEX-2006, Alimentos-miel-especificaciones y métodos de prueba, Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C., México, D.F., 2006.
- Palamada, J. & Kehrer, J. (1992). "Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes", in *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293, pp. 103-109.

- Palomino García. (2009). Caracterización Físicoquímica y Evaluación Antioxidante de Propóleos en Antioquía. Sede de Antioquía: Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Maestría.
- *Park Y.K. Ikegaki M., (1998). Preparation of water and ethanoic extracts of propolis and evaluation of the preparation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(11).*
- Pereira, A.S., S.F Seixas, F Mathias Silva y F Aquino Neto. (2002). Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Química Nova 25: 321-326.
- Piazza M., Accorti M., Oddo L. (1991). Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. Apicoltura 7. 1-63.
- Pilar Fernández Uriel. (2011). Dones del cielo, abeja y miel en el Mediterráneo antiguo. Editorial: UNED. España.
- 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. Apidologie, 306-311.
- 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
- Preza de la Vega J. y Reyes O. (2007). Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles. Distrito Federal: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis.

- Propravko, S. A. (1975). Composición química del propóleo, su origen y problemas de uniformación. Apimondia: Bucarest. Rumania
- Quezada Euan, José Javier Flores Guido. (2011). La miel y las abejas el dulce convenio de Mayab. Secretaria de Educación del Gobierno del Estado de Yucatán. México.
- Raúl C. Peña, (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cien. Inv. Agr. 35(1)*.
- Reyes González Alejandro. (2014). Manejo y conservación de abejas sin aguijón (*Apidae: meliponini*) en una región del balsas michoacano, México. UNAM. Tesis.
- Reyes Alejandro, Camou Andrés, Reyes Octavio. Diversity, local knowledge and use of stingless bees (*Apidae: meliponini*) in the municipality of Nocupétaro, Michoacan, Mexico. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 2014. 10-47.
- Reyes Salas E. O. y Gazcón Orta N.E. (2014). Determinación polarográfica de contaminantes metálicos para el control de calidad de ácido fosfórico grado técnico empleado en la producción de fosfato grado alimentario. Rev. Int. Contam. Ambient vol 30 N° 1. México.
- Reyes Salas E.O., Manzanilla J., Juárez D. y Reyes Salas M. (2006). Direct Electrochemical Determination of Hidoxymethylfurfural (HMF) and its Application to Honey Samples. Analytical Letters, 39, 161–171.



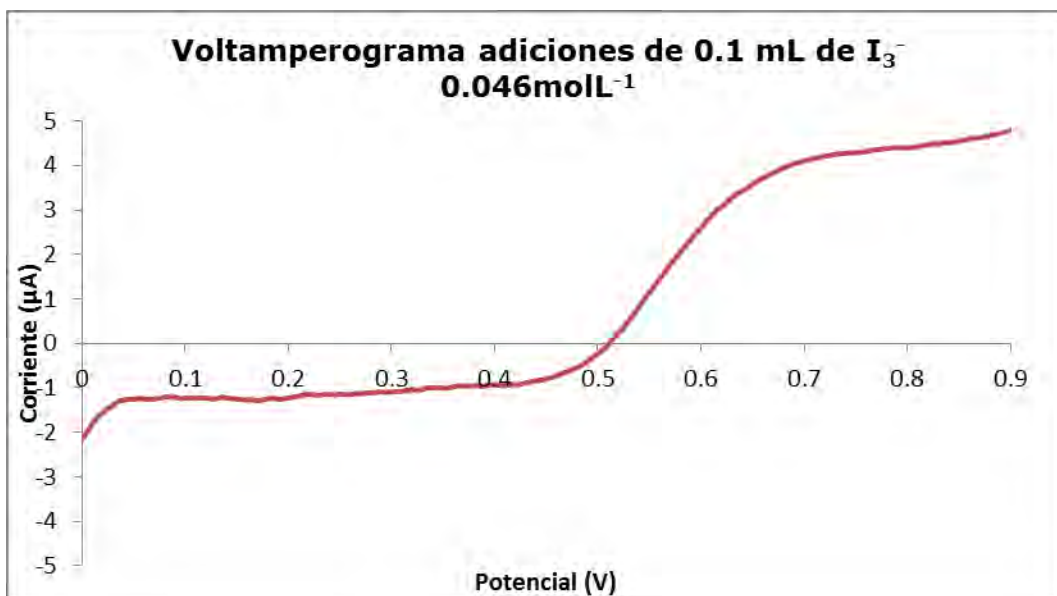
- Riobos, S., (1990). Estudio de la composición fisicoquímica de las mieles extremeñas y extranjeras. Comunicaciones del 5<sup>to</sup>. Congreso Nacional Apícola. Don Benito, Badajoz. España.
- SAGARPA (2009). Comercialización de productos apícolas en Estados Unidos de Norteamérica en base a estudios de mercado y estrategia de negocios. México D.F.
- Salatino A., Weinstein E., Negri G. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. eCAM 2005, 2(1), 330-338.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural Pesca y Alimentación. SAGARPA. 2014.
- Susana, Sanz y Maria Mercedes Sanz, (1994). Flores de Acidez (Libre, láctónica y total) y pH de las mieles de la Rioja. Zúbia #12. Logroño. España.
- Thornalley, P.J., Vasak, M. (1985). "Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals", en *Biochimica et Biophysica Acta* 827. 36-44.
- Vásquez-Dávila M. y Solís-Trejo M.B. (1991) Conocimiento, uso y manejo de la abeja nativa por los chontales de Tabasco. Tierra y Agua, 2:29–38.
- Vit P. (2008). La Miel Precolombina de Abejas sin Aguijón (Meliponini), aún no tiene Normas de Calidad. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, Venezuela. 42(3), 415-423.

- Vit P. (2009). Caracterización Fisicoquímica de Mieles de Abejas Sin Aguijón (Meliponini) de Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Venezuela. 40(2), 7-12.
- Vit P., Barth O., Enríquez E., Matsuda A., Almeida-Muradian L. (2006). Necesidad del Control de la Miel de Abejas sin Aguijón. Médula, 15.
- 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.
- Vorwohl G. (1964). Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachmässigen Herkunft. Ann. Abeille, 7, 51-63.
- Walker, P.; Crane, E. (1987). Constituents of propolis Apidologie 18 (4): 327-334.
- White J., Doner W. (1980). Honey Composition and Properties. Agriculture Handbook, 82-91.
- White, J.W., Jr., Riethof, M.L., Subers, M.H. y Kushnir, I. (1962). Composition of American Honeys. Tech. Bull. U.S. Dep. Agric. 1261. USA.

## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO 1

Para la determinación del potencial de media onda se utilizó el voltamperograma de la adición de 500  $\mu\text{L}$  de disolución de yodo yodurado  $0.046 \text{ molL}^{-1}$ .



Al utilizar la ecuación de Nernst en nuestro sistema se obtiene:

$$E' = E^0 + \frac{0.06}{n} \log \frac{[\text{Ox}]_{\text{electrodo}}}{[\text{Red}]_{\text{electrodo}}}$$

Al considerar que es un sistema reversible, las concentraciones de oxidante y reductor al electrodo son proporcionales a una corriente dada y un término contante:

$$[\text{Ox}]_{\text{electrodo}} = \frac{i - i_{\text{ox}}}{k_{\text{ox}}}$$

$$[\text{Red}]_{\text{electrodo}} = \frac{i_{\text{red}} - i}{k_{\text{red}}}$$

Se sustituye en la ecuación de Nernst:

$$E' = E^0 + \frac{0.06}{n} \log \frac{i - i_{\text{ox}}/k_{\text{ox}}}{i_{\text{red}} - i/k_{\text{red}}} = E^0 + \frac{0.06}{n} \log \frac{(i - i_{\text{ox}}) k_{\text{red}}}{(i_{\text{red}} - i) k_{\text{ox}}}$$

$$E' = E^0 + \frac{0.06}{n} \log \left( \frac{k_{\text{red}}}{k_{\text{ox}}} \right) + \frac{0.06}{n} \log \left( \frac{i - i_{\text{ox}}}{i_{\text{red}} - i} \right)$$

Cuando la corriente es igual a la mitad del corriente límite total ( $i=1/2[i_{tot}]$ ) se obtiene:

$$E_{1/2} = E^0 + \frac{0.06}{n} \log\left(\frac{k_{red}}{k_{ox}}\right)$$

En este punto las constantes  $k_{ox}$  y  $k_{red}$  son de valores similares ( $k_{ox} \approx k_{red}$ ) por lo cual el término mencionado tiende a 1. Por lo cual, la ecuación de Nernst para este sistema es:

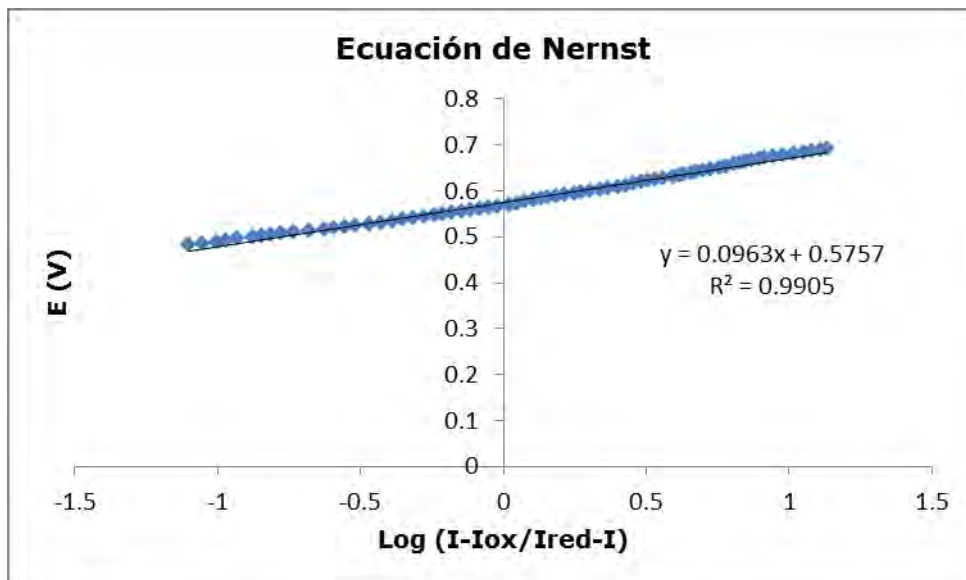
$$E' = E_{1/2} + \frac{0.06}{n} \log\left(\frac{i-i_{ox}}{i_{red}-i}\right) \quad \text{con } E_{1/2} \approx E^0$$

Si se hace un cambio de variable y se convierte  $\log\left(\frac{i-i_{ox}}{i_{red}-i}\right)$  en "x", se obtiene la ecuación de una recta:

$$E' = E_{\frac{1}{2}} + \frac{0.06}{n} \log\left(\frac{i-i_{ox}}{i_{red}-i}\right)$$

$$y = b + m \quad x$$

Al realizar la gráfica de potencial respecto a  $\log\left(\frac{i-i_{ox}}{i_{red}-i}\right)$  del voltamperograma se obtiene:

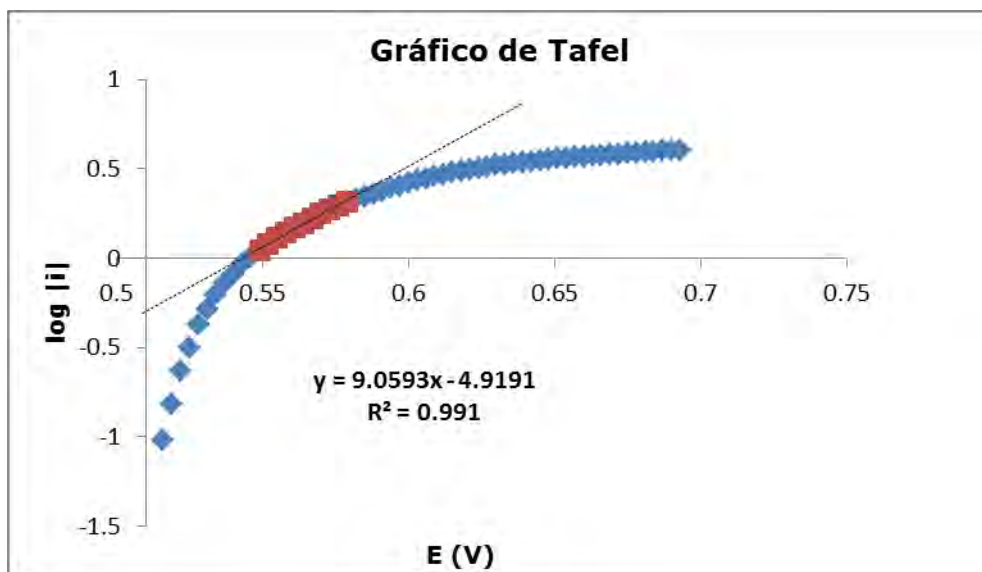


En este gráfico se puede observar que el potencial de media onda es 0.576V. Pero la pendiente de 0.0963 indicaría que hay menos de un electrón que interactúa en el sistema, lo cual es imposible en un sistema redox y es un indicio de que el comportamiento del sistema no es Nernstiano; así que se procederá a usar la ecuación de Tafel para evaluar su reversibilidad.

$$\log i = \log i_o + \frac{\alpha n F}{2.3RT} \times \eta$$

Donde  $\eta$  es el sobrepotencial ( $\eta = E - E_{eq}$ ),  $i$  es la corriente e  $i_o$  es la corriente de intercambio, que representa la corriente que se transfiere al potencial de equilibrio ( $E_{eq}$ ). El gráfico de Tafel es una representación de la ecuación de Tafel, es decir que es un gráfico de  $\log |i|$  en función de  $\eta$ . Sin embargo, es muy común que se desconozca el potencial normal condicional ( $E^{o'}$ ) del sistema en estudio y los datos de sobrepotencial se sustituyen por los valores de potencial ( $E$ ); se considera que  $i$  tiende a cero y  $\log |i|$  a menos infinito cuando  $E$  se acerca a  $E^{o'}$ .

Para el gráfico de Tafel se utilizará el mismo voltamperograma. Con el potencial de media onda obtenido con la ecuación de Nernst (0.576V), se utilizaron valores cercanos a este punto para realizar la regresión lineal en el gráfico.



En la gráfica anterior el valor de la pendiente de la recta (m) corresponde a  $(1 - \alpha)F/2.3RT$ , de tal forma que al despejar se obtiene un valor de  $(1 - \alpha)n$ :

$$\alpha n = \frac{2.3RT \times m}{F} = 2.3 \times (0.02569V) \times (9.0593 V^{-1})$$

$$\alpha n = 0.52$$

Si se considera que  $n=1$  se tiene que el valor de alfa sería de 0.48; este valor indicaría que el sistema tiene un comportamiento Nernstiano, pero en el gráfico de Nernst se observa que no es así, por lo cual, lo más factible es que el valor sea  $n=2$ , con lo cual el valor de alfa es de 0.26 lo que indica que el sistema no es Nernstiano y presenta un sobrepotencial; esto se confirma ya que el sistema tiende a menos infinito en 0.510V (potencial normal condicional) y el potencial de media onda es de 0.576V.

## 9.2. ANEXO 2.

Para la determinación del coeficiente de reparto ( $K_D$ ) se tiene:

$$K_D = \frac{\text{Actividad antioxidante extraído (mmol EAAsc / g propóleo)}}{\text{Actividad antioxidante total en el propóleo (mmol EAAsc / g prop)}}$$

Para la primera extracción el coeficiente de reparto es:

$$K_D^I = \frac{[\text{Actividad Antioxidante extraída}]}{[\text{Actividad Antioxidante total en el propóleo}]} = \frac{E^I}{E_T^I}$$

En donde:

$$E^I = \text{Actividad antioxidante de la primer extracción}$$

$$E_T^I = \text{Actividad antioxidante total en el propóleo}$$

Al utilizar los datos de la tabla 17:

$$E^I = \frac{(\text{Conc. en la 1}^{er} \text{ extracción mmol EAAsc mL}^{-1}) \times (\text{Volumen de la extracción en mL})}{\text{gramos de propóleo pesado}}$$

$$E^I = \frac{(0.00575 \text{ mmol EAAsc mL}^{-1}) \times (25 \text{ mL})}{3.0004 \text{ g}} = 0.0479 \text{ mmol EAAsc / g propóleo}$$

Para la primera extracción; se considera la actividad antioxidante total presente en el propóleo (Tabla 18) como la suma de las 5 extracciones.

$$E_T^I = 0.1106 \text{ mmol EAAsc / g prop}$$

Por lo cual el  $K_D$  en la primera extracción es:

$$K_D^I = \frac{E^I}{E_T^I} = \frac{0.0479 \text{ mmol EAAsc / g prop}}{0.1106 \text{ mmol EAAsc / g prop}} = \mathbf{0.433}$$

Para la segunda extracción se tiene:

$$K_D^{II} = \frac{[\text{Actividad Antioxidante extraída}]}{[\text{Actividad Antioxidante total en el propoleo usado}]} = \frac{E^{II}}{E_T^{II}}$$

En donde:

$$E^{II} = \text{Actividad antioxidante en la segunda extracción}$$

$$E_T^{II} = \text{Actividad antioxidante inicial en el propoleo empleado en la segunda extracción}$$

Al utilizar los datos de la tabla 17:

$$E^{II} = \frac{(\text{Conc. en la 2}^{\text{da}} \text{ extracción mmolEAAsc mL}^{-1}) \times (\text{Volumen de la extracción en mL})}{\text{gramos de propoleo pesado}}$$

$$E^{II} = \frac{(0.00422 \text{ mmolEAAsc mL}^{-1}) \times (25 \text{ mL})}{3.0004 \text{ g}} = 0.0351 \text{ mmol EAAsc/g prop}$$

Para la segunda extracción; el total de actividad antioxidante total presente en el propóleo es:

$$E_T^{II} = E_T^I - E^I = 0.1106 - 0.0479 = 0.0627 \text{ mmol EAAsc/g prop}$$

Por lo cual el  $K_D$  en la segunda extracción es:

$$K_D^{II} = \frac{E^{II}}{E_T^{II}} = \frac{0.0351 \text{ mmol EAAsc/g prop}}{0.0627 \text{ mmol EAAsc/g prop}} = \mathbf{0.560}$$

Para la tercera extracción se tiene:

$$K_D^{III} = \frac{[\text{Actividad Antioxidante extraída}]}{[\text{Actividad Antioxidante total en el propoleo}]} = \frac{E^{III}}{E_T^{III}}$$

En donde:

$$E^{III} = \text{Actividad antioxidante en la tercera extracción}$$

$$E_T^{III} = \text{Actividad antioxidante inicial en el propóleo empleado en la tercera extracción}$$

Al utilizar los datos de la tabla 17:

$$E^{III} = \frac{(\text{Conc. en la 3}^{\text{ra}} \text{ extracción mmolEAAsc mL}^{-1}) \times (\text{Volumen de la extracción en mL})}{\text{gramos de propóleo pesado}}$$

$$E^{III} = \frac{(0.00247 \text{ mmol EAAsc mL}^{-1}) \times (25 \text{ mL})}{3.0004 \text{ g}} = 0.0206 \text{ mmol EAAsc/g prop}$$

Para la tercera extracción; el total de actividad antioxidante total presente en el propóleo es:

$$E_T^{III} = E_T^{II} - E^{II} = 0.0627 - 0.0351 = 0.0276 \text{ mmol EAAsc/g prop}$$

Por lo cual el  $K_D$  en la tercera extracción es:

$$K_D^{III} = \frac{E^{III}}{E_T^{III}} = \frac{0.0206 \text{ mmol EAAsc/g prop}}{0.0276 \text{ mmol EAAsc/g prop}} = \mathbf{0.743}$$

Para la cuarta extracción se tiene:

$$K_D^{IV} = \frac{[\text{Actividad Antioxidante extraída}]}{[\text{Actividad Antioxidante total en el propoleo usado}]} = \frac{E^{IV}}{E_T^{IV}}$$

En donde:

$$E^{IV} = \text{Actividad antioxidante en la cuarta extracción}$$

$$E_T^{IV} = \text{Actividad antioxidante inicial en el propóleo empleado en la cuarta extracción}$$

Al utilizar los datos de la tabla 17:

$$E^{IV} = \frac{(\text{Conc. en la 4}^{\text{ta}} \text{ extracción mmol EAAsc mL}^{-1}) \times (\text{Volumen de la extracción en mL})}{\text{gramos de propoleo pesado}}$$

$$E^{IV} = \frac{(0.00062 \text{ mmol EAAsc mL}^{-1}) \times (25 \text{ mL})}{3.0004 \text{ g}} = 0.0051 \text{ mmol EAAsc/g prop}$$

Para la cuarta extracción; el total de actividad antioxidante total presente en el propóleo es:

$$E_T^{IV} = E_T^{III} - E^{III} = 0.0276 - 0.0206 = 0.0070 \text{ mmol EAAsc/g prop}$$

Por lo cual el  $K_D$  en la cuarta extracción es:

$$K_D^{IV} = \frac{E^{IV}}{E_T^{IV}} = \frac{0.0051 \text{ mmol EAAsc/g prop}}{0.0070 \text{ mmol EAAsc/g prop}} = \mathbf{0.728}$$



Con los valores obtenidos realizamos la siguiente tabla:

<b>Numero de extracción</b>	<b>Coefficiente de reparto (<math>K_D</math>)</b>
1	0.433
2	0.560
3	0.743
4	0.728
<b>Promedio</b>	<b>0.616</b>

Por lo que puede considerarse un valor de  **$K_D = 0.62$**