



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR
(ANBIOMOL)

“PROF. GUILLERMO LÓPEZ CORCUERA”

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
MIELES DE POTE DE MELIPONINI PROVENIENTES DE LAS REGIONES
1, 2 Y 4 DE ECUADOR

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciados en
Bioanálisis

Autor

Gomez, C. Elsy, R

C.I. V- 19.056.163

Tutor (a)

Dra. Elizabeth Pérez

Mérida, Julio 2019

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, por bendecirme toda mi vida, por darme fuerzas para superar las dificultades y permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre Candelaria Carrillo, por ser el pilar más importante en mi vida y por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional. **Te Amo Madre Mía.**

A mi padre José Rafael Gomez, a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. **Te Amare siempre.**

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre escuchar mis oraciones en aquellos momentos donde sentía que no podía continuar, por sus bendiciones y su infinito Amor.

A la Ilustre Universidad de los Andes, prestigiosa casa de estudios y fuente de conocimientos, por abrirme sus puertas y permitirme crecer profesional y personalmente en sus aulas.

A la Dra. Elizabeth Pérez, asesora de tesis, por darme la guía necesaria para llevar a cabo esta investigación, por su paciencia y comprensión.

A mi madre Candelaria Carrillo, por darme la vida y siempre creer en mí, por brindarme su apoyo incondicional en los momentos más duros y por enseñarme con su ejemplo que todo con perseverancia se puede alcanzar. **Te Amo**

A mi padre José Rafael Gómez, por darme la vida y apoyarme incondicionalmente, por ser una de las estrellas que ilumina y cuida mi vida desde el cielo. **Te amare siempre**

A mi abuelita Rosalía Zerpa, por su gran cariño y sus innumerables oraciones cada vez que salía de casa. **Te quiero mucho**

A mis otras dos estrellas, mi abuelo **Emilio** y mi Angelito **Rossimar**, Gracias por enseñarme a transformar el dolor en motivación, por enseñarme a vivir sin ustedes y por cuidarme desde el cielo.

A todos mis Tíos, Darío, Antonio, Omar, Jesús, Cesar, Domingo, Adela y demás familiares, gracias por toda la ayuda brindada a lo largo de mi carrera.

A Mis amigas y compañeras de clases **Rosa, Marielis, Leimar, Marisol, Lisbeth, Desiree, Rossarys...** Gracias por su apoyo, por sus palabras de aliento, por las risas y los llantos compartidos, con ustedes el camino fue más llevadero.

A mis comadres, Elizabeth y Lilian, Gracias por toda la ayuda brindada, por quererme como un miembro más de su familia, y por permitirme ser madrina de esos niños hermosos **Carlitos, Alessandro y Marcelo**.

A cada una de las personas que conocí en esta hermosa ciudad en este largo trajinar, que de una u otra forma, siempre me tendían la mano, me apoyaban y me incentivaban a seguir adelante.

Sin ustedes este logro no habría sido posible... *Muchas Gracias!*

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	5
EL PROBLEMA	5
Planteamiento del problema	5
Justificación de la investigación	9
Objetivos de la investigación	10
Objetivo General	10
Objetivos específicos	10
Alcances de la investigación	10
Limitaciones de la investigación	12
CAPÍTULO II:	13
MARCO TEORICO	13
Trabajos previos	13
Antecedentes históricos	15
Bases teóricas	19
Las abejas	19
Abejas sin aguijón	20
Miel	22
Variabilidad de la miel	23
Propiedades fisicoquímicas de la miel	24
Proteínas, aminoácidos y enzimas	25
Polifenoles	26
Flavonoides	27
Radicales libres	29
Actividad Antioxidante	29
Alimentos funcionales	30
Operacionalización de las variables	31
CAPÍTULO III:	33

MARCO METODOLOGICO	33
Tipo de investigación	33
Diseño de investigación	33
Población y muestra	33
Unidad de investigación	35
Selección del tamaño muestral	35
Metodología de la investigación	35
Preparación de las muestras de miel	35
Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos	36
Determinación del contenido de flavonoides: Método colorimétrico del cloruro de aluminio	36
Determinación de la concentración de proteínas	37
Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo	38
Método de la actividad antioxidante (AOA)	39
Método del catión radical ABTS ^{•+} : Ensayo de Decoloración en solución etanólica	41
Diseño de análisis	42
Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)	43
Pruebas Post Hoc	43
CAPÍTULO IV:	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Resultados	44
Caracterización química de las mieles en estudio	44
Actividad antioxidante de las mieles en estudio	47
Discusión	50
Caracterización química.	50
Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos	52
CAPÍTULO V:	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
Conclusiones	57

Recomendaciones	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.	27
Tabla 2. Operacionalización del evento de estudio	31
Tabla 3. Muestras de miel analizadas en el presente estudio	34
Tabla 4. Volúmenes de reactivos que se usaron para la curva de calibración en la determinación de proteínas	37
Tabla 5. Volúmenes que se utilizaron para el método del AOA	40
Tabla 6. Concentración media de flavonoides, polifenoles y proteínas de las muestras analizadas	45
Tabla 7. Concentración de la actividad antioxidante de las mieles analizadas. Métodos AOA, radical hidroxilo y ABTs	48
Tabla 8. Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.	49

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución geográfica de las muestras de miel de Meliponini analizadas	10
Figura 2. <i>Melipona yucatanica</i>	20
Figura 3. Miel de botijas en colmena de <i>Melipona favosa</i>	21
Figura 4. Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo	28
Figura 5. Neutralización del radical libre por un antioxidante	29

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR
(ANBIOMOL)
“PROF. GUILLERMO LÓPEZ CORCUERA”



PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES DE POTE DE MELIPONINI PROVENIENTES DE LAS REGIONES 1, 2 Y 4 DE ECUADOR

Autor:

Elsy R. Gomez C

CI: 19.056.163

Tutora:

Dra. Elizabeth M. Pérez

RESUMEN

La miel de las abejas Meliponini presenta diversas características las cuales han sido estudiadas para reconocer diferentes tipos de miel. Se han encontrado y documentado gran cantidad de sustancias bioactivas en la miel de *Melipona*, las cuales guardan relación con la actividad antioxidante. El objetivo de esta investigación fue analizar las propiedades químicas y actividad antioxidante de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 1, 2 y 4 de Ecuador, para lo que se analizaron 17 muestras de miel recolectadas en diferentes provincias de Ecuador. La metodología empleada en esta investigación se basó en realizar una extracción etanólica a cada una de las mieles analizadas, y a ese extracto se le determinó la concentración de grupos fenólicos, flavonoides y proteínas. Además, se estudió la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo, Actividad Antioxidante (AOA) y Método del ABTS. Se obtuvieron concentraciones de flavonoides entre 56,6 y 96,2 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, polifenoles entre 117,9 y 659,6 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, proteínas entre 16,3 y 493,4 mg de proteína/100 g de miel. Los valores de AOA variaron entre 1,07 y 1,11 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, la inhibición del radical hidroxilo entre 93,5 y 99,5 % de inhibición/100 g de miel, y la CAT entre 88,0 - 192,0 μ moles equivalente de Trolox/100 g de miel. Sólo se observó la correlación positiva entre la concentración de proteínas y los valores de CAT, siendo para todos los métodos superiores a la quercitina, melatonina y ácido Lipoico.

Palabras claves: *propiedades fisicoquímicas, actividad antioxidante, mieles de pote, Meliponini, Ecuador*

INTRODUCCION

Las abejas son uno de los grupos más comunes de insectos, de gran importancia ecológica y económica gracias a sus hábitos alimenticios. La visita a las flores en busca de néctar y polen tiene como consecuencia la polinización de un gran número de plantas de interés para otros organismos (Michener, 1974). Hasta hace algún tiempo, la abeja más conocida en el Neotrópico era *Apis mellifera*, introducida con la llegada de los conquistadores a estos territorios, desplazando a la abeja nativa sin aguijón. Desde esa época la especie se adaptó a las nuevas condiciones y hoy en día se considera naturalizada, con poblaciones silvestres establecidas en todo el territorio, y otras poblaciones criadas bajo condiciones de explotación comercial.

Un recurso de gran importancia en los trópicos del mundo, son las abejas sin aguijón, o *Meliponini* las cuales pertenece al grupo de abejas corbiculadas de la subfamilia *Apinae* (Roubik, 1989). Estas abejas se caracterizan principalmente por tener aguijón reducido, alas con venación débil o reducida y ojos desnudos (Camargo, 1992); además construyen nidos muy característicos para albergar su cría con entradas generalmente insignes, las cuales, en algunos casos, sirven para identificar especies.

Biológicamente entendemos por miel a “La sustancia producida por las abejas y otros insectos sociales, a partir del néctar o melazas que ellas recolectan sobre plantas vivas y que transforman o elaboran mediante evaporación de agua y acción de enzimas, segregadas por ellas, quedando almacenada en los alveolos o celdillas de los panales” (Ulloa y cols., 2010). Este producto viscoso o cristalizado, con distintos colores, olores, aromas y sabores, y que es llamado por todos “miel de abejas”, necesita ser caracterizado, porque no todas las mieles son iguales. La composición de la miel está muy relacionada con el tipo de plantas, es decir, con el origen

botánico, sobre todo en cuanto a la calidad de la miel se refiere, el modo de obtención, la temporada de recolección, y el origen geográfico. Todo esto influye de manera sustancial en el producto final (León, 2013)

Comparar las mieles de *Meliponinis* con mieles de abejas introducidas, como la *Apis mellifera*, y de productos azucarados comercializados como “mieles”, permite conocer sus diferencias para promover el valor de las mieles autóctonas y justificar la elaboración de las normas para su control de calidad. Hasta ahora, los reportes químicos de la miel se concentran a la de *Apis mellifera*, y solo unos pocos reportan poca información acerca de la composición química de las abejas sin aguijón, a pesar, del número estimado de 500 especies Neotropicales (Ramos, 2005). En general, los azúcares y el agua representan los componentes químicos principales de la miel (> 95%); entre los primeros, fructosa (38%) y glucosa (31%) son los constituyentes principales. En cuanto a la actividad biológica de la miel de abejas, los ácidos fenólicos, flavonoides y enzimas, son quienes muestran gran actividad antioxidante, suscitando un gran interés en muchos investigadores, debido a su importante rol en el tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Aljadi y cols., 2004).

En los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio de la composición de las mieles de abejas sin aguijón. Lo que ha llevado a la integración de organizaciones e instituciones que buscan impulsar a través de diversos proyectos la conservación de la especie y la producción de la miel, así como también la realización de diferentes estudios, con la finalidad de identificar las propiedades presentes en la miel de *Meliponinis*, y las concentraciones en la que estas se encuentran presentes, logrando determinar su relación con la actividad antioxidante, logrando proporcionar un adecuado valor a las mieles autóctonas y justificar la elaboración de las normas para su control de calidad, lo que permitirá su introducción al mercado como un importante alimento funcional.

En la Región Sur del Ecuador es una práctica común la recolección de miel de nidos naturales de abejas sin aguijón, aunque también se conserva la tradición de explotar abejas sin aguijón de forma empírica para la producción de miel y polen. Sin embargo, estas prácticas extractivas y el incremento de la frontera agrícola están amenazando la supervivencia de estas especies. Por tal motivo en el presente trabajo de investigación se analizaron 17 muestras de mieles de Abejas *Meliponini*, las cuales fueron recolectadas en diferentes provincias de la zona noroeste de Ecuador, y enviadas hasta nuestra casa de estudio para determinar por medio de diferentes métodos analíticos sus propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante. Esto en un convenio con el proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”, el cual está vinculado con la Universidad Técnica de Machala, provincia de El Oro.

Una de las estrategias más aplicadas en las mediciones de la capacidad antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento es la espectrofotometría, que consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias coloreadas de naturaleza radical, en la cual se observa la pérdida de color del sistema y ocurre de forma proporcional con la concentración del antioxidante. Por ende la metodología empleada en esta investigación se basó en realizar una extracción etanólica a cada una de las mieles analizadas, posteriormente se determinó la concentración de grupos fenólicos, flavonoides y proteínas; además se estudió la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo por del método de Halliwell, Método de la Actividad Antioxidante (AOA) y Método del ABTS (ensayo de decoloración en solución etanólica), con la finalidad de establecer correlación entre estos compuestos y la actividad antioxidante presente en las mieles de abejas *Meliponini*.

Toda la metodología aplicada en la realización de este trabajo siempre estuvo enfocada en cumplir con el objetivo principal de esta investigación, la cual fue analizar las propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante, de las mieles

de pote de *Meliponini* de las regiones 1, 2 y 4 de Ecuador, en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes durante el período del 12 de febrero al 21 de junio del 2018.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Actualmente se reconocen siete familias de abejas en el mundo: cinco de lengua corta (*Stenotritidae*, *Colletidae*, *Andrenidae*, *Halictidae*, *Melittidae*) y dos de lengua larga (*Megachilidae* y *Apidae*), (Michener, 2000). El comportamiento social, primitivo o avanzado, se presenta en menos del 10% de las especies, originado independientemente en dos familias: *Halictidae* y *Apidae* (Snelling, 1981). También se consideran abejas silvestres aquellas diferentes de *A. mellifera* (abejas no-Apis) que no han sido sometidas a domesticación, en su mayoría de hábitos solitarios (una hembra cava, aprovisiona y pone huevos en un nido y generalmente no está presente cuando nace su descendencia) que construyen nidos en suelo, paredes y troncos; no producen miel ni forman grandes colonias. Los únicos grupos muy sociales pertenecen a las tribus *Apini* y *Meliponini*, donde una hembra (reina) vive en un nido muy complejo, con panales de cría y celdas o potes para almacenamiento de reservas alimenticias; existe una casta de obreras que generalmente no pone huevos y se dedica a las labores de mantenimiento del nido total.

Este grupo de organismos han sido relevantes en la cultura humana, debido a que proveen recursos y han sido parte de la vida social y religiosa de diversas personas, quienes han desarrollado técnicas de manejo de estos insectos, técnicamente llamado "Meliponicultura" (Quezada y cols., 2001). Asimismo, la miel, el polen y la cera de estas abejas, se han empleado como coadyuvantes en el tratamiento, reducción y curación diferentes enfermedades infecciosas,

en el tratamiento de úlceras, llagas en la piel y heridas de difícil cicatrización, bronquitis entre otras (Vit y cols., 2004). Sin embargo, de acuerdo a estudios realizados existe gran preocupación en la disminución de esta actividad tradicional en la región, debido a los cambios ambientales y por la gestión inadecuada (exceso de captura sin éxito de las colonias silvestres) (Villanueva, 2005).

En Ecuador y Venezuela existen normas de calidad sólo para la miel de abejas producida por la abeja *Apis mellifera* (INEN, 1988; COVENIN, 1984 a,b). En Venezuela las normas no han sido revisadas desde el año 1984 y en Ecuador hay una revisión en curso; sin embargo, también se produce y se comercializa la miel de abejas sin aguijón. En Colombia, la norma de miel fue revisada en el año 2006, cuando se incluyó un anexo para las mieles producidas por abejas nativas (ICONTEC, 2007), y Brasil es el único país que cuenta con una norma estatal para miel producida por abejas del género *Melipona*, en el estado de Bahía (ADAB, 2014).

Es importante señalar que en el Ecuador y particularmente en la Región Sur, existen pocos estudios referentes a las abejas sin aguijón, las cuales se encuentran amenazadas por las prácticas extractivas (extracción de miel de nidos silvestres) que por lo general son destructivas, donde se desconocen aspectos como la diversidad, la biología de este grupo de insectos y tecnologías de manejo. Ante esta problemática se han desarrollado investigaciones orientadas al conocimiento de la diversidad de las abejas sin aguijón en mencionado país, para proponer alternativas de manejo y conservación, para lo cual se realizaron viajes de recolección de especímenes a varios sectores de las provincias de Loja, Zamora y El Oro, identificándose 89 especies de abejas sin aguijón agrupadas en 17 géneros y se determinó que el mayor número de especies correspondió al género *Trigona* (Vit y cols., 2016).

La miel de las *Meliponini* presenta diversas características las cuales han sido estudiadas para reconocer diversos tipos de miel, principalmente llegan a

variar por factores como el recurso floral disponible para la obtención de polen y néctar (Molan, 1992).

Hasta ahora, los reportes químicos de la miel se concentran a la de *Apis mellifera*, y solo unos pocos reportan poca información acerca de la composición química de miel producida por las abejas sin aguijón, a pesar del número estimado de 500 especies Neotropicales (Ramos, 2005). En general, los azúcares y el agua representan los componentes químicos principales de la miel (> 95%); entre los primeros, fructosa (38%) y glucosa (31%) son los constituyentes principales. Los azúcares representan la porción más grande de la composición de la miel (95-99% de sólidos de la miel) mientras que las proteínas, aldehídos aromáticos, ácidos carboxílicos aromáticos y sus ésteres, carotenoides degradados, terpenoides, flavonoides y otros contribuyen al sabor de las mieles (Mendes y cols., 1998).

Vit en el 2004, publicó la composición bioquímica de la miel de algunas especies de abejas sin aguijón, provenientes de Guatemala, México y Venezuela, en la que señala la alta cantidad de monosacáridos, constituyendo el 60 - 80 % de la miel; agua, alrededor de un 15 a 20 %; minerales; sustancias nitrogenadas; ácidos orgánicos los cuales confieren a la miel un pH de 3.6 a 4.2; enzimas; vitaminas y hormonas.

Se han encontrado y documentado cientos de sustancias bioactivas en la miel de *Melipona* en diferentes países. Entre estos compuestos con actividad biológica, quienes muestran gran actividad antioxidante son los ácidos fenólicos, flavonoides y las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, los cuales han recibido una atención especial de grupos de investigación, debido a su rol en la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Aljadi y cols., 2004).

Estudios realizados en Guatemala por Gutiérrez en el 2009, han puesto de manifiesto la actividad antioxidante, la cual es atribuible al contenido de flavonoides y polifenoles en las mieles, encontrándose concentraciones menores en las mieles de *M. solani*, respecto a mieles de *M. beecheii*,

proporcionándole a esta última una mayor actividad antioxidante. Los resultados sugieren que la miel de *M. beecheii* de Yucatán es una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos con potencial antioxidante, ya que las especies de plantas visitadas como las familias *Asteraceae* y *Melastomataceae* para la extracción de néctar están presentes en la Península.

En los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio de la composición de las mieles de abejas sin aguijón. Lo que ha llevado a la integración de organizaciones e instituciones que buscan impulsar a través de diversos proyectos la conservación de la especie y la producción de la miel, y a su vez la realización de diferentes estudios, con la finalidad de identificar las sustancias presentes en este tipo de miel, así como las concentraciones que presentan dichas sustancias, y establecer concordancia de éstas con la actividad antioxidante de la miel, estableciendo un adecuado valor a las mieles autóctonas y justificar la elaboración de las normas para su control de calidad. Debido a lo antes descrito, el autor ve la necesidad de colaborar con el proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”, permitiéndose realizar el presente trabajo de investigación, con la finalidad de proporcionar información sobre las propiedades fisicoquímicas presentes en 17 muestras de mieles de abejas *Meliponini* enviadas desde Ecuador, y determinar la relación entre la concentración de sus componentes con la actividad antioxidante. Debido a esto, en la presente investigación, fue formulado el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la correspondencia entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antioxidante de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 1, 2 y 4 de Ecuador, analizadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular “Prof. Guillermo López Corcuera” en Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, durante el periodo del 12 de febrero al 21 de junio del 2018?

Justificación de la investigación

Desde tiempos prehispánicos, los grupos Mayas, Totonacos y Nahuas de América Central practicaron la Meliponicultura, la cual se refiere a la cría y manejo de abejas sin aguijón, y recibe este nombre debido a que a este tipo de abejas se clasifica taxonómicamente dentro de la tribu *Meliponini* (*Hymenóptera*). Son el único grupo de abejas nativo de América que posee comportamiento altamente social, colonias numerosas y perennes que se reproducen por medio de enjambres, y que cuentan con diferenciación de castas (reina, obreras y zánganos), y una comunicación altamente desarrollada entre los miembros de la colonia (Rosso y cols., 2005).

En la actualidad, la Meliponicultura casi ha desaparecido y pocos conocen de la existencia de su miel y derivados. Este fenómeno está relacionado con la introducción en la época colonial en el continente americano de la abeja europea (*Apis mellifera*), la cual se le ha dado gran utilidad estos últimos años, por su mayor cantidad de producción en comparación con las Abejas sin aguijón.

Recientemente ha surgido un mayor interés en estudiar las mieles de abejas autóctonas sin aguijón (*Meliponini*) con la finalidad de promover su utilización y comercialización en diferentes países, como México, Guatemala, Venezuela, Argentina, Ecuador, entre otros. Lo que ha permitido integrar equipos de trabajo nacionales e internacionales con el fin de estudiar las mieles de abejas autóctonas, y lograr determinar su caracterización fisicoquímica y su bioactividad. Por tal razón, fueron analizados mediante diferentes métodos analíticos 17 muestras de mieles de abejas de pote de *Meliponini* provenientes de las regiones 1, 2 y 4 de Ecuador (Figura 1), con la finalidad de conocer sus propiedades químicas y antioxidantes, con el objetivo a largo plazo de impulsar el uso terapéutico de estas mieles como alimento funcional, proporcionando grandes beneficios para la salud.



Figura 1. Distribución geográfica de las muestras de miel de *Meliponini* analizadas.
(Elaborada por el autor)

En la Figura 1 se puede observar que a la región costa-litoral pertenecen cinco muestras de miel distribuidas en las provincias Esmeralda (2), Manabí (2) y Santa Elena (1); y la región sierra interandina corresponden 12 muestras distribuidas en Pichincha (7), Imbabura (4) y Carchi (1).

Objetivos de la investigación

Objetivo General

- Analizar las propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante, de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 1, 2 y 4 de Ecuador.

Objetivos específicos

- Determinar la cantidad de polifenoles, flavonoides y proteínas en las muestras de miel estudiadas.
- Analizar la actividad antioxidante usando como patrón de comparación ácido úrico (AOA), el efecto de las muestras de miel sobre la formación del radical hidroxilo y la actividad antioxidante total (AAT).
- Correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de fenoles, flavonoides y proteínas.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la investigación

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcances exploratorio, descriptivo, correlacional, o explicativo (Hernández, Fernández y Baptista 2010).

Por lo tanto, el alcance de la investigación, es decir, la profundidad del logro de esta investigación, fue analizar las propiedades fisicoquímicas de las mieles de pote de *Meliponini* de muestras de miel provenientes de las zonas 1, 2 y 4 de Ecuador, en las que se determinó la presencia de fenoles, flavonoides y proteínas, así como la actividad antioxidante. La actividad antioxidante se evaluó por medio de tres técnicas diferentes: actividad antioxidante (AOA), ABTS y radical hidroxilo. Todo esto permitió correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de fenoles, flavonoides y proteínas presente en las mieles.

Esta investigación además de aportar información en el proyecto de Valorización de mieles de pote de *Meliponini* en Ecuador, provee información para que otros investigadores tomen la iniciativa de estudiar las propiedades fisicoquímicas, y actividad antioxidante de este tipo de mieles. Esto permitirá asignar el adecuado valor a las mieles autóctonas, no sólo en Ecuador sino en otros países donde ha surgido la inquietud de estudiar este tipo de mieles autóctonas. Además, justifica la elaboración de las normas para su control de calidad conduciendo a su comercialización, e inclusión en la dieta humana de manera terapéutica, de la misma manera que las mieles de *A. mellifera*.

Limitaciones de la investigación

La mayor limitación con la que se encontró el autor mediante la realización de este trabajo de investigación fue en el ámbito económico, lo que conllevó a no poder adquirir todos los reactivos y equipos necesarios para la aplicación de otros métodos diferentes, evitando así, realizar un estudio más riguroso. De igual forma, otra limitación importante fue la insuficiente información bibliográfica encontrada sobre el estudio de la actividad antioxidante de la miel de abejas sin aguijón (*Meliponini*), mediante las técnicas usadas en este estudio, ya que se encontraban escasos reportes con varios años de publicación

. CAPITULO II

MARCO TEORICO

Trabajos previos

Almeida y cols. (2013) determinaron el perfil fenólico, análisis palinológico y actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles producidas por *Melipona (Michmelia) seminigra merrillae* de siete condados distribuidos en la región centro y sur del estado de Amazonas en Brasil condados Amazonas, norte de Brasil. Se identificaron veintidós tipos de polen. El contenido fenólico total osciló entre los 17 y 66 mg equivalentes de ácido gálico g de extracto, y los contenidos más altos se encontraron en las mieles producidas a partir de tipos de polen como *Clidemia* y *Myrcia*. La actividad antioxidante fue mayor en las muestras que contenían mayores cantidades de compuestos fenólicos. En relación con la actividad antibacteriana, fueron tres las muestras que revelaron mayor actividad antibacteriana, las mismas que tuvieron los contenidos fenólicos totales más altos. Dos tenían perfiles fenólicos similares (CAD3, CAD4) que eran distintos de la tercera muestra (SAD).

Vit y cols. (2015) llevaron a cabo las caracterizaciones fisicoquímicas de la miel de angelita *Tetragonisca angustula* producida en Esmeraldas, Ecuador., con el objetivo principal de singularizar las mieles de *T. angustula*, debido a que no están incluidas en las normas técnicas de calidad del Instituto Ecuatoriano de Normalización NETINEN1572, al igual que la mayoría de abejas silvestres. Se realizó su caracterización fisicoquímica según los métodos clásicos de indicadores de calidad en las normas para miel de abejas. El contenido de nitrógeno se determinó por microKjeldahl. Los autores reportaron que las mieles de *T. angustula* son mieles claras de color ámbar entre 75 y 102 unidades Pfund; mientras que la composición fisicoquímica varió así: acidez libre 22,50 – 25,20 meq/kg, azúcares reductores 56,43 – 63,83 g/100g, cenizas 0,50 – 0,16 g/100 g, hidroximetilfurfural 0,44 – 1,41 mg/kg, humedad 23,1 – 25,2 g/100 g, nitrógeno 33,66 – 85,78 mg/100 g, pH 3,66 – 4,22, sacarosa aparente 1,46 – 2,36 g/100 g y sólidos insolubles en agua 0,03 – 0,07 g/100g.

www.bdigital.ula.ve

García-Tenesaca y cols. (2017) analizaron tres tipos de miel monofloral (aguacate, eucalipto y miel de colza) de las regiones andinas de Ecuador para determinar su origen floral, parámetros fisicoquímicos, composición química capacidad antioxidante y su capacidad para reducir las biopelículas *in vitro*. Los autores encontraron que la composición química varió considerablemente de acuerdo al origen floral, teniendo la miel de aguacate los valores más altos en compuestos bioactivos, clasificada como la de color ámbar oscuro, mientras que los valores más bajos se encontraron en la miel de eucalipto, seguida de la miel de colza, ambas clasificadas como ámbar extra claro. Cuando se comparó con la miel de eucalipto y colza, la miel de aguacate mostró una actividad de eliminación de superóxido más eficaz, de quelación de iones metálicos, y una mayor capacidad para proteger las membranas de eritrocitos humanos contra la peroxidación lipídica. En lo que se refiere a la actividad

antimicrobiana, se determinó el contenido de peróxido de hidrógeno y la capacidad para inhibir la formación de biopelículas y de eliminar la biopelícula preformada de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. La miel de aguacate mostró los valores más altos de contenido de peróxido de hidrógeno, así como la mayor capacidad para reducir las biopelículas bacterianas *in vitro*. Se encontró una correlación entre el color y el contenido de compuestos fenólicos frente a la actividad de eliminación de superóxido, a la capacidad de quelación de iones metálicos y la capacidad de proteger las membranas de eritrocitos humanos contra la peroxidación de lípidos.

Antecedentes históricos

La miel es un producto que ha utilizado el ser humano desde sus orígenes, forma parte de la dieta mediterránea desde la época de los egipcios. Cuando los antiguos egipcios hacían sus expediciones, conservaban la carne en barriles llenos de miel. Su uso está muy bien relatado en los papiros encontrados; entre otras cosas, empleaban la miel para tratar las cataratas, llagas, cortes, quemaduras; en cosmética y como alimento fortificante.

El manejo de las abejas nativas sin aguijón, en forma sistematizada, parece haber sido una práctica de las culturas prehispánicas avanzadas de Mesoamérica. Las tribus indígenas de América del Sur, por sus características primitivas de recolectores y cazadores nómadas, hasta donde se tiene información, fueron exclusivamente recolectores de los nidos establecidos en el bosque para la obtención de los productos de las abejas como la miel, el polen y el cerumen (cera) (González, 2012). Estas abejas fueron probablemente las primeras abejas sociales que se separaron de un antecesor menos social, ocurriendo antes de que América y Australia se separaran de África, Asia y Europa. El espécimen más viejo conocido es la llamada *Trigana prisca*, la cual que vivió en el período cretáceo, hace 80 millones de años.

El manejo de la abeja sin aguijón *Melipona beecheii* en la Península de Yucatán en México, se remonta hasta antes de la llegada de los colonizadores europeos (Crane, 1992). Los mayas vinculaban la cría de abejas sin aguijón y la producción de miel a la tradición religiosa del dios “Ah Mucen Kab”, el consumo familiar para endulzar alimentos y bebidas, y para uso medicinal (Terán y cols., 1994). En las islas del Caribe, África, Asia y Australia viven pocas especies. Aun cuando las diferentes especies están adaptadas a los distintos hábitats tropicales, la mayoría vive en zonas de baja altitud (Manrique, 1995).

El primer registro de abejas sin aguijón fue publicado en el año 1557 por el mercenario alemán Hans Staden en Brasil (Engels, 2009). Las abejas del género *Tetragonisca* son las más extendidas en la geografía neotropical, desde México hasta el norte de Argentina (Camargo y cols., 2007). Por otra parte, Schwarz (1948) consideraba solamente tres géneros de abejas sin aguijón: *Melipona*, *Lestrimelita* y *Trigona*, este último con varios subgéneros. Mientras que Moure en 1951 propuso 12 géneros y 19 subgéneros para la región Neotropical. En años posteriores reconsideró su propuesta hasta que en 1971 propuso 27 taxa supraespecíficos (géneros y subgéneros) para los Meliponinos del Nuevo Mundo, posición reafirmada por el mismo autor y por Camargo en 1989. Sin embargo, Wille (1979) formuló un nuevo arreglo con ocho géneros y 14 subgéneros. (Michener, 2000) revisó la clasificación de los Meliponini y basado en el análisis de gonostilos, aguijones y palpos labiales de las obreras, y la genitalia de los machos, reconsideró los géneros propuestos por Moure en 1971, argumentando que su establecimiento se basa en caracteres externos de las obreras tan similares entre sí que no justifica su elevación a nivel de género; para todo el mundo reconoce 21 géneros, 17 subgéneros y sinonimiza 19 de los admitidos por Moure a saber: *Cleptotrigona*, *Hypotrigona*, *Austroplebeia*, *Pariotrigona*, *Lisotrigona*, *Trigonisca*, *Liotrigona*, *Plebeia*, *Trichotrigona*, *Dactylurina*, *Oxytrigona*, *Cephalotrigona*, *Trigona*,

Lestrimelitta, *Melipona*, *Nannotrigona*, *Scaptotrigona*, *Paratrigona*, *Partamona*, *Meliponula* y *Plebeina*. Para la región Neotropical, Michener (1990) reconoce 12 géneros, mientras que Camargo y Pedro en 1992, siguen reconociendo como géneros todos los subgéneros propuestos por Moure, además de aquellos más recientes: *Camargoia* del Amazonas brasileiro, propuesto por Moure en 1989 y revisado por Camargo en 1996; y *Melliwillea*, endémico de los bosques de niebla de Costa Rica (Roubik y cols., 1997). *Sakagamilla*, que fue descrito por Moure en 1989, resultó ser un sinónimo de *Scaptotrigona* (Camargo y Pedro 1992). Michener (2000) sinonimiza *Aparatrigona* con *Paratrigona*, *Parapartamona* con *Partamona* y *Ptilotrigona* con *Tetragona*. En Ecuador y particularmente en la Región Sur, existen pocos estudios referentes a las abejas sin aguijón como los de Coloma (1986) que reporta para el Ecuador 73 especies, especificando que en esta región se encontraron *Melipona ebúrnea* en Palanda, *Melipona mimetica* (gr. *fasciata*) en Sabanilla, *Melipona indecisa* en Olmedo y San Roque, *Trigonafulviventris* en Machala y Chaguarpamba. Callebaut (2001) realizó un estudio de las abejas sin aguijón y sus prácticas de manejo por la población local en el sur occidente de Loja; mientras que Rasmussen (2004) reportó 16 especies de abejas sin aguijón para la Región Sur.

Aprender sobre las abejas sin aguijón es una pasión con diferentes facetas. El Profesor Joao Camargo, entomólogo brasileiro, especializado en *Meliponini*, empezó integrando el rompecabezas de su biogeografía y las adaptaciones evolutivas. Sin su colaboración sólo se habría llegado a conocer los nombres comunes de las abejas autóctonas que almacenan miel en botijas; y también habría sido imposible el estudio de su composición por especies. En el mes de marzo de 2008, el Prof. Camargo de la Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras, Universidad de São Paulo (USP) Brasil, visitó la Universidad de Los Andes, invitado por Intercambio Científico para dictar una conferencia sobre Biogeografía histórica de *Meliponini* (*Hymenoptera*, *Apidae*, *Apinae*) en la

región Neotropical. Las abejas sin aguijón (*Meliponini*) producen miel en botijas y han sido estudiadas en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Desde hace unos veinte años el Prof. Camargo realizó la identificación entomológica de *Angelitas*, *Ericas*, *Guanotas*, *pegones* y otras abejas sin nombre, que producen miel en Venezuela. Durante su visita a la Universidad de Los Andes, el Prof. Camargo observó nidos de abejas sin aguijón en paredes y en sustratos naturales, en los estados Barinas y Mérida. También visitó el Grupo de Ecología de Insectos en la Facultad de Ciencias y el Grupo Apícola de la Universidad Experimental del Sur del Lago en Santa Bárbara, Estado Zulia.

La colaboración del Prof. Camargo para identificar las especies de abejas sin aguijón en Venezuela fue muy valiosa para conocer su biodiversidad. Asimismo, la recolección sistemática de ejemplares de *Meliponini* en diversas localidades, permitió aumentar la información para el progreso de su conocimiento. Recientemente, luego de la visita de este apasionado investigador, quien además ilustra personalmente su objeto de estudio en el Liceo Bolivariano Francisco Uzcátegui Dávila de Aricagua, se generó una motivación para conocer la fauna apícola. Un grupo de aplicadas estudiantes inició la observación de abejas sin aguijón en este pueblo del Sur del Estado Mérida. Otro grupo de estudiantes universitarios en su primer año de la carrera de Farmacia, aprendieron a recolectar sistemáticamente abejas sin aguijón en la asignatura Metodología de la Investigación, semestre U-2008. De esta manera, la visita de un científico notable, fue un estímulo para diversos niveles de interés en las comunidades humanas.

Un estudio de composición de mieles de pote fue realizado en Ecuador, en una tesis de la Pontificia Universidad Católica del mencionado país, en el año 1989 (Chieruzzi, 1989), donde se incluye la miel producida por la abeja *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811). Su composición ha sido estudiada también en Venezuela por la profesora Patricia Vit de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis en la universidad de los Andes. En el año 2009, Vit realizó un

trabajo sobre la caracterización fisicoquímica de mieles de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Venezuela, donde analizó mieles producidas en Venezuela por seis especies de abejas sin aguijón: *Frieseomelitta paupera*, (Provancher 1888), *Scaura aff. Latitarsis*, (Friese 1900), *Tetragonisca angustula*, (Latreille 1811), *Plebeia sp.*, *Scaptotrigona sp.*, y una especie no identificada, obteniendo variaciones en los valores de la composición fisicoquímica de las mieles de abejas sin aguijón. Otro estudio se ha realizado en diferentes países como Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008), Colombia (Fuenmayor y cols., 2012), Bolivia (Ferrufino y Vit, 2013) y Brasil (Muradian, 2013). Estos estudios son indispensables para recomendar los estándares de calidad, tan necesarios para promover su comercialización e impulsar la meliponicultura de Ecuador, y de otras partes del mundo, ya que la miel de angelita tiene numerosos usos medicinales, siendo el más notable su aplicación oftálmica tópica para tratar cataratas oculares (Vit y cols., 2004).

www.bdigital.ula.ve

Bases teóricas

Las abejas

Las abejas son uno de los grupos más comunes de insectos, de gran importancia ecológica y económica gracias a sus hábitos alimenticios. La visita a las flores en busca de néctar y polen tiene como consecuencia la polinización de un gran número de plantas de interés para otros organismos. “Las abejas son un grupo de avispa visitantes de flores que abandonaron sus hábitos de avispa de aprovisionar sus nidos con insectos o arañas y en cambio alimentan a sus larvas con polen y néctar recolectado de flores o con secreciones glandulares, finalmente derivadas de la mismas fuente” (Michener, 1974).

Actualmente se reconocen siete familias de abejas en el mundo: cinco de lengua corta (*Stenotritidae*, *Colletidae*, *Andrenidae*, *Halictidae*, *Melittidae*) y dos de lengua larga (*Megachilidae* y *Apidae*) (Michener, 2000). El

comportamiento social, primitivo o avanzado, se presenta en menos del 10% de las especies, originado independientemente en dos familias: *Halictidae* y *Apidae*, (Snelling 1981). Hasta hace algún tiempo, la abeja más conocida en el Neotrópico era *Apis mellifera*, introducida con la llegada de los conquistadores a estos territorios. Desde esa época la especie se adaptó a las nuevas condiciones y hoy en día se considera naturalizada, con poblaciones silvestres establecidas en todo el territorio, y otras poblaciones criadas bajo condiciones de explotación comercial.

Los grupos muy sociales pertenecen a las tribus *Apini* y *Meliponini*, donde una hembra (reina) vive en un nido muy complejo, con panales de cría y celdas o potes para almacenamiento de reservas alimenticias; existe una casta de obreras que generalmente no pone huevos y se dedican a las labores de mantenimiento del nido total.

Abejas sin aguijón

Las principales características de estas abejas son su tamaño relativamente grande (8-15 mm de longitud), morfología similar a abejorros o abejas melíferas, alas anteriores relativamente cortas y pelos largos en parte superior del tórax y cabeza, producen reinas frecuentemente, reinas ligeramente más pequeñas que las obreras, celdas reales mezcladas con celdas de obreras y machos y la piquera es de barro. Un ejemplo de estas abejas es la *Melipona yucatanica* (Figura 2), la cual es altamente sociable, polinizadoras, muy eficientes y buenas productoras de miel y cera.



Figura 2. *Melipona yucatanica* (Kumul 2015).

Estas abejas, a diferencia de *Apis mellifera* y otras especies de *Apis*, almacenan su miel en potes de cerumen (Figura 3). Por este motivo se creó el término “miel de pote” para diferenciarla de la miel más comercial extraída de panales de cera (Vit y cols., 2013).

El área geográfica que puede ser explotada por una especie de *Melipona* es directamente proporcional a la extensión del vuelo que sea capaz. Las especies de tamaño mediano (5 mm) pueden recorrer y recolectar a unos 600 m alrededor de su nido; mientras que las especies más grandes (10 mm) pueden recorrer de 800 a 980 m. Entre los aspectos más interesantes sobre la biología de las abejas *Meliponas* se encuentran el tipo de comunicación en relación a la búsqueda del alimento y de sitios para fundar nuevas colonias (Wille, 1976).

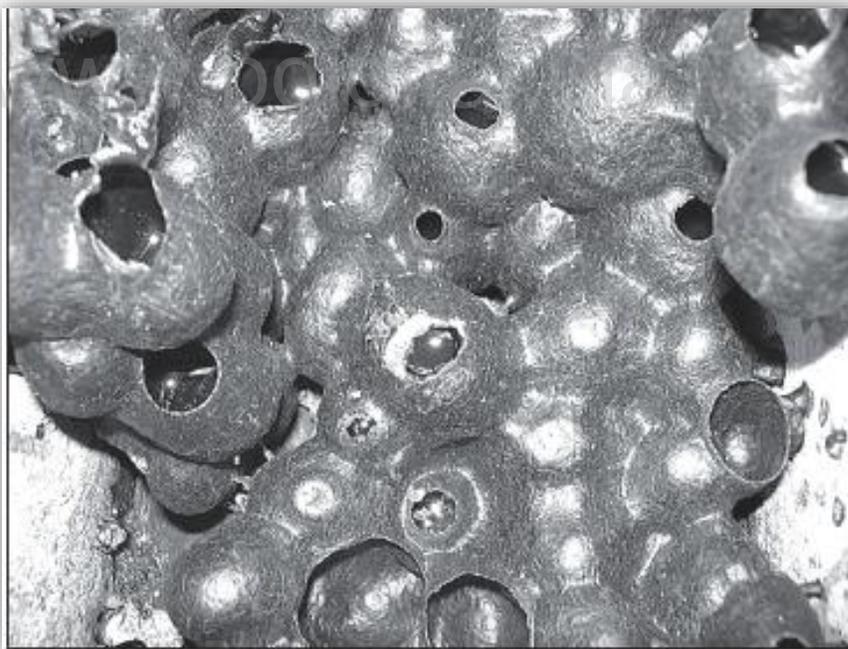


Figura 3. Miel de botijas en colmena de *Melipona favosa* (Vit y cols., 2012).

Miel

En la norma venezolana (COVENIN 1984), la miel de abejas se define como "la sustancia dulce, sin fermentar, producida por abejas obreras (principalmente *Apis mellifera*), a partir del néctar de las flores o de exudación de otras partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas, almacenan y maduran en panales". Básicamente es la definición del Codex Alimentarius, con la especie de abeja utilizada; sin embargo, a continuación, se expande al indicar que "La miel no deberá, durante su procesamiento, transporte y expendio, absorber ningún sabor, aroma o color objetables de materias extrañas, ni contener toxinas naturales de plantas en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud". Obviamente, hace más de veinte años, se consideró la orientación sobre higiene de la miel de abejas insoluble de su definición, aunque se repitiera parcialmente en la sección de requisitos.

En 1981 se inicia una etapa de revisión de la norma de miel de abejas del Codex Alimentarius, el cual se conoce como Codex Stan 1981, y produjo dos documentos para la 1ª Revisión del año 1987 Codex Alimentarius Commission y para la 2ª Revisión del año 2001, referidos a los estándares del Codex para miel de abejas. En estos documentos, la definición de la miel de abejas se modifica así "la sustancia dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de las plantas, o de excreciones de insectos succionadores de plantas sobre partes vivas de las plantas, las cuales son recolectadas, transformadas y combinadas con sustancias específicas de las abejas, almacenadas, y dejadas en el panal hasta su maduración" (Codex Stan 1987); y "la sustancia dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de las plantas, o de excreciones de insectos succionadores de plantas sobre partes vivas de las plantas, las cuales son recolectadas, transformadas mediante la combinación con sustancias específicas de las

abejas, depositadas, deshidratadas, almacenadas, y dejadas en el panal hasta su maduración" (Codex Stan 2001). Puede observarse la ligera variación al final de la definición, donde se incluye la deposición y la deshidratación. Este proceso en la búsqueda de expresiones completas y detalladas para simplemente definir un producto milenario, puede indicar la rigurosidad de las comisiones que participan en las discusiones de la norma de miel de abejas.

En referencia a la definición en la norma regional europea para miel Conjunto FAO/OMS (1969) puede observarse que se mantiene la importancia de los insectos succionadores, cuyas excreciones azucaradas son utilizadas por las abejas para producir miel de mielada en lugar de miel de néctar, pero se elimina la expresión de abeja obrera.

Variabilidad de la miel de abejas

Todas las mieles producidas por las abejas provienen de secreciones azucaradas (néctar, mielada, savia) recolectadas en la naturaleza, transformadas y almacenadas en panales o botijas de cera. Tanto el origen botánico como el origen entomológico de la miel ocasionan variaciones en los principios activos de un producto aparentemente homogéneo, fluido, espeso o cristalizado, coloreado en la escala del ámbar, desde casi incoloro y blanquecino hasta marrón oscuro. La melisopalinología permite estudiar los orígenes geográfico y botánico de la miel de abejas, ya que el estudio microscópico del polen proporciona información para identificar las plantas visitadas por las abejas en busca del néctar utilizado en la elaboración de la miel (Vit, 2005). Adicional a ello, también es posible realizar la determinación del origen botánico y geográfico a través de análisis específicos multivarianza de componentes tales como patrones de flavonoides, determinación de

compuestos aromáticos, oligosacáridos, aminoácidos y trazas de elementos, entre otros (Anklam, 1998).

Propiedades fisicoquímicas de la miel

Se conocen diversos tipos de miel de abejas, cuyas características físicas, químicas y organolépticas vienen determinadas por la flor utilizada como fuente de néctar y el tipo de abeja que la produjo, pero como éstas la fabrican en cantidad cerca de tres veces superior de lo que necesitan para sobrevivir, siempre fue posible, primeramente recogerse el exceso de ésta para el ser humano y más tarde realizarse la domesticación de las abejas para el fin específico de obtener su miel, técnica conocida como apicultura. (Quezada y cols., 2001).

La miel varía en su composición dependiendo de la fuente del néctar, las prácticas de apicultura, el clima y las condiciones ambientales.

Los carbohidratos, constituyen el principal componente de la miel. Dentro de los carbohidratos los principales azúcares son los monosacáridos fructosa y glucosa. Estos azúcares simples representan el 85% de sus sólidos, ya que la miel es esencialmente una solución altamente concentrada de azúcares en agua. Los otros sólidos de la miel incluyen por lo menos otros 25 azúcares complejos, pero algunos de ellos están presentes en niveles muy bajos y todos están formados por la unión de la fructosa y glucosa en diferentes combinaciones (Ulloa y cols., 2010). La miel, además, contiene otros componentes minoritarios como ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido acético), flavonoides, polifenoles, enzimas, vitaminas, hormonas, minerales, cenizas, proteínas, aminoácidos y residuos de polen (Gutiérrez y cols., 2008).

Proteínas, aminoácidos y enzimas

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas), etc.

Son macromoléculas formadas por cadenas de unidades estructurales, los aminoácidos. Estos aminoácidos se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo α -amino (imino), con pérdida de agua. La secuencia de aminoácidos que componen una proteína constituye su estructura primaria, de vital importancia desde el punto de vista nutricional. A pesar de su diversidad funcional (enzimática, de transporte y almacén, mecánica, motilidad, protección, reguladora, etc.) un 25% es proteína estructural y hemoglobina (Gutiérrez y cols., 2008).

La miel contiene en torno al 0,5% de componentes proteicos, principalmente en forma de enzimas y aminoácidos libres. Su origen puede estar tanto en la abeja (enzimas) como en el vegetal (aminoácidos libres y otras proteínas). Algunos estudios basados en análisis de la composición u origen de las proteínas en la miel mencionan que, al menos diecinueve bandas de proteínas se han detectado por tinción de plata SDS-PAGE en mieles de plantas de origen diferente (Marshall y Williams, 1987). La miel contiene proteínas en mínimas cantidades y diversas enzimas que son componentes importantes tales como α -glucosidasa, β -glucosidasa, amilasa y glucosa oxidasa.

La calidad de la miel en cuanto a la presencia de aminoácidos y la cantidad total de aminoácidos libres está comprendida entre 10 y 200 mg/100 g. Solamente el aminoácido prolina representa un 50% de estos compuestos.

Este aminoácido se usa como índice de calidad referido a la maduración de la miel y de posibles adulteraciones, de esta forma si la miel ha sido recogida inmadura o si las abejas han sido alimentadas con azúcar comercial, el contenido en prolina será anormalmente bajo (White y cols., 1978).

Polifenoles

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Ellos son productos del metabolismo secundario de las plantas, que son determinantes en la calidad sensorial y nutrición de las frutas, verduras y otras plantas. Presentan un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilos y su estructura puede variar desde la de una molécula fenólica simple (ácidos fenólicos), a la de un complejo de alto peso molecular como un polímero de masa tales como taninos condensados. (Gil de Albuquerque 2011)

Se ha demostrado que los polifenoles dietéticos juegan un papel importante en la salud humana. Se ha reportado que la ingesta elevada de verduras, frutas, cereales integrales y algunas bebidas (té, jugos, vinos) que son ricos en polifenoles previenen o retrasan una serie de muchas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica y muchas enfermedades degenerativas. Muchas de las actividades biológicas de los compuestos fenólicos se atribuyen a su capacidad antioxidante. (Guisado y cols. 2007)

Los polifenoles se dividen en varias clases de acuerdo con el número de fenoles en el anillo y elementos estructurales que se unen al anillo entre sí (Tabla 1).

COMPUESTOS FENOLICOS			
FENÓLES			
SIMPLES	POLIFENOLES		
ÁCIDOS FENÓLICOS	FLAVONOIDES	TANINOS	ESTILBENOS Y LIGNANOS
- Ácido benzoico	- Antoxantinas Flavona Flavonol Flavanol Isoflavona	Hidrolizables No hidrolizables	
- Ácido cinámico	- Antocianinas		

Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos (Amaya y cols., 2013).

En mieles, también se han utilizado como marcadores del origen botánico, ya que se han encontrado considerables diferencias entre mieles monoflorales, tanto en los tipos de polifenoles que aparecen, como en la concentración de estos (Bogdanov y cols., 2004).

Flavonoides

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C3), lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 común en la mayoría de los flavonoides (Figura 4). La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Después, estas dos últimas dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados.

Al ser parte fundamental de la biología vegetal, los flavonoides responden a la luz controlando los niveles de las auxinas (hormonas vegetales) reguladoras del crecimiento, además intervienen en la diferenciación de las plantas y potencian la polinización al conferir coloración.

Por ende, se encuentran en numerosos frutos, plantas y semillas logrando más de 5.000 flavonoides distintos. La abeja obtiene estos compuestos del néctar y los propóleos.

Son principalmente flavonoides (quercetina, luteolina, kaempferol, apigenina, crisina y galangina), ácidos fenólicos y sus derivados. Solo flavonoides puros parecen estar presentes en mieles y propóleos, mientras que en el polen apícola aparecen flavonoides en forma de heterósido (unidos a un azúcar) (Anklam, 1998). Aunque sus niveles en miel son muy bajos, contribuyen en gran medida a las propiedades antioxidantes del producto (Bogdanov y cols., 2004). Estos compuestos también son responsables de la coloración de las mieles, apareciendo habitualmente en mayor cantidad en las mieles oscuras (Estevinho y cols., 2008).

Los flavonoides son responsables del aroma y del potencial antioxidante de la miel. Kumul (2015) mencionan que el contenido total de flavonoides en muestras de miel oscila entre 11,46-116,67 mg catequina /kg. El conocimiento de los flavonoides y el contenido de los compuestos fenólicos en mieles de diversos climas podrían, no solo ser un marcador de origen floral, sino también un indicador potencial de su capacidad biológica.

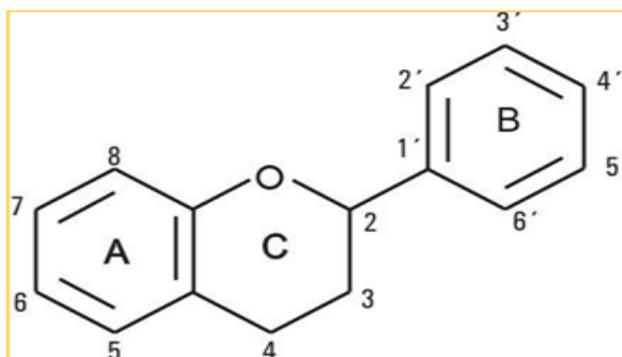


Figura 4. Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo (Pérez y cols., 2003)

Radicales libres

Un radical libre es una molécula orgánica o inorgánica extremadamente inestable y muy reactiva debido a que posee un electrón desapareado (\bullet), muy susceptible de establecer un enlace con otro átomo o molécula. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena; además, por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial. De hecho, un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena (Núñez, 2011). Estas moléculas se pueden sintetizar en un laboratorio, se pueden formar en la atmósfera como resultado de la radiación, y también se forman en los organismos vivos (incluyendo el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno (Wade, 1993).

Actividad antioxidante

El término antioxidante significa que impide la oxidación de otras sustancias químicas, ocasionada en las reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos. Los antioxidantes actúan suministrando el electrón necesario para completar la capa electrónica externa del radical libre (Figura 5). En la práctica, se conoce como actividad antioxidante total (AAT) o capacidad antioxidante total (CAT) a la medición analítica de concentraciones de radicales de diferente naturaleza en un sistema oxidativo controlado (AAPH, ABTS $\bullet+$, DMPD \bullet , DPPH \bullet).

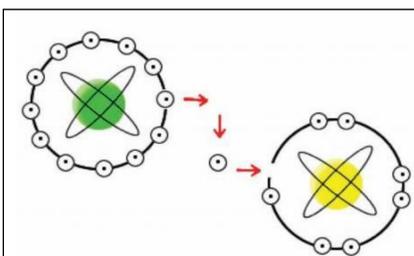


Figura 5. Neutralización del radical libre por un antioxidante (Amaya y cols., 2013).

La mayoría de las mieles poseen capacidad antioxidante, permitiendo reducir la cantidad de reacciones oxidativas en el cuerpo, las cuales pueden producir efectos perjudiciales en los alimentos y en el organismo, como enfermedades crónicas. Los polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos participan en la actividad antioxidante de la miel, junto con una variedad de compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos), carotenoides y vitamina C, que son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante (Gutiérrez y cols., 2008). Sin embargo, la capacidad antioxidante varía de gran forma según el origen botánico de la miel (Gheldof, 2002). El contenido de antioxidantes en la miel es comparable al de frutas y verduras, lo que lo convierte en una fuente de estos más aceptable para ciertos individuos (Kasprzyk, 2012).

Alimentos Funcionales

Aunque no se ha logrado una definición del término alimento funcional que sea aceptada globalmente, el concepto general es que son alimentos o componentes alimenticios cuyo consumo además de una nutrición básica, genera beneficios para la salud y/o reduce el riesgo de enfermedad. Un alimento o componente alimenticio funcional puede ser un macro nutriente con un efecto fisiológico específico o un micro nutriente esencial, pero también puede ser un componente alimenticio que, aunque no tenga un alto valor nutritivo o no sea esencial, su consumo logre la modulación de alguna función en el organismo que reduzca el riesgo de enfermedad, como es el caso de la fibra y algunos microorganismos viables (Roberfroid, 2002).

Se considera funcional, un alimento en su estado natural, o un alimento al cual se han adicionado, removido o modificado uno o más de sus componentes (Roberfroid, 2002). Muchos estudios se han realizado para determinar los efectos en la salud de los alimentos funcionales, y se ha comprobado o relacionado estrechamente su consumo habitual con la prevención de diferentes tipos de enfermedades.

Operacionalización del evento de estudio

Cuando se desea operacionalizar una variable o evento de estudio, según Sabino (2007), es necesario en primer lugar conocer su definición teórica y las diferentes dimensiones en las que puede ser subdividida, seguidamente se establecen los indicadores que permiten describir el comportamiento de la variable. Es así como la operacionalización de las variables permite asignarles un significado a las mismas, describiéndolas en términos observables y comprobables para poder identificarlas, a través de la caracterización proporcionada por sus indicadores.

De acuerdo a lo antes mencionado, a continuación, se presenta la tabla de la Operacionalización del evento de estudio, realizado en este trabajo de investigación (Tabla 2).

Evento de estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variable
Propiedades químicas de la miel de <i>Meliponini</i>	Las propiedades químicas son características que manifiesta la materia cuando cambia su composición, es decir, se manifiestan cuando una muestra de materia experimenta una reacción química (Reboiras, 2006)	La miel varía en su composición dependiendo de la fuente del néctar, las prácticas de apicultura, el clima y las condiciones ambientales. Los carbohidratos, constituyen el principal componente de la miel. Además, contiene otros componentes minoritarios como ácidos orgánicos flavonoides, polifenoles, proteínas entre otros (Gutiérrez y cols., 2008).	-Fenoles -Flavonoides -Proteínas	Dependiente

<p>Actividad antioxidante de la miel de <i>Meliponini</i></p>	<p>El término antioxidante significa que impide la oxidación de otras sustancias químicas, ocasionada en las reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos (Guisado y col., 2007)</p>	<p>Los polifenoles, flavonoides y proteínas participan en la actividad antioxidante de la miel, junto con una variedad de compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas), carotenoides y vitamina C, que son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante (Vit y col., 2008).</p>	<p>-Radical Hidroxilo - Radical ABTs - AOA</p>	<p>Dependiente</p>
--	---	---	--	--------------------

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

La profundidad del conocimiento que se quiere adquirir tiene relación directa con el tipo de investigación. En tal sentido, Hurtado (2010) refirió que el tipo de investigación guarda relación con los niveles de complejidad del proceso de investigación. Así mismo, Barrantes (2001) definió la investigación analítica como aquella que consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observarlos. Al respecto, esta investigación fue de tipo analítica ya que el grado de elaboración fue analizar las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de las mieles de pote de *Meliponini* a través de ciertos parámetros bioquímicos y su capacidad antioxidante.

Diseño de investigación

Las estrategias que se implementan para recolectar los datos de un proceso de investigación constituyen el diseño (Hurtado, 2010). En tal sentido, esta investigación fue de laboratorio, puesto que el análisis de las muestras recolectadas, se realizó en el laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. Respecto al tiempo de recolección de los datos, este estudio es de tipo retrospectivo, debido a que las muestras fueron recolectadas antes del periodo

de desarrollo de la investigación; y longitudinal, puesto que los datos se recolectaron a través del tiempo en puntos o períodos especificado.

Población y muestra

La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga. En tal sentido, Hernández, Fernández y Baptista (2010) refirieron que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población estudiada en el presente trabajo de investigación es finita, integrada por 17 muestras de miel (aprox. 4 g c/u), recolectadas en diferentes ciudades de la zona noroeste de Ecuador, desde el 08 de diciembre de 2014 hasta el 10 de marzo de 2015 (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras de miel analizadas en el presente estudio

Nº	Contacto	Fecha de recepción	Ciudad de producción	Provincia	Nombre común
77	Benito Santillán	29/12/14	Guayllabamba	Pichincha	Abeja
78	Puesto 157	11/01/15	Tulcan	Carchi	Abeja
79	Mónica Castro	11/01/15	Ibarra	Ibambura	Abeja
80	Gloria Sani	11/01/15	Ibarra	Ibambura	Abeja
81	Sara Imbacua	11/01/15	Ibarra	Ibambura	Abeja
82	Benito Santillán	12/01/15	Sampoloqui	Pichincha	Abeja
83	Benito Santillán	12/01/15		Pichincha	abeja aceite eucalipto
84	Marlenis Valencia	22/02/15	La chiquita san Lorenzo	Esmeralda	angelita
86	Themis Hernández	11/02/15	Iguíñaro	Pichincha	Abeja
87	Víctor Moreto	11/02/15	Iguíñaro	Pichincha	Abeja

88	Hugo Asunción	12/02/15	Agua Blanca	Manabí	Abeja
89	Sixto Ventura	12/02/15	Agua Blanca	Manabí	Abeja de tierra
92	Ángel Acero	29/02/15		Pichincha	Abeja
93	Bernardo Rampón	29/02/15		Ibambura	Abeja
94	Ernesto Chávez	29/02/15		Pichincha	Abeja
95	Hugo Rosero	29/02/15	La chiquita san Lorenzo	Esmeralda	Abeja
100	Fernando Malavé	29/02/15		Santa Elena	Abeja

Unidad de Investigación

La unidad de investigación está conformada por 17 muestras de mieles de abejas *Meliponini*, pertenecientes a la zona noroeste de Ecuador, enviadas al Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Universidad de los Andes.

Selección del Tamaño Muestral

De un total de 40 muestras recolectadas y enviadas por algunos integrantes del proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”, fueron seleccionadas 17 muestras las cuales pertenecen a la zona noroeste de Ecuador.

Metodología de la investigación

Preparación de las muestras de miel

Se pesaron exactamente $(0,10 \pm 0,01)$ g de miel, en cada tubo eppendorf, donde seguidamente se le agregó 1 mL de etanol 95% (v/v), luego fueron

situados en un homogeneizador de vidrio (Thomas No. A3528, USA), hasta encontrarse perfectamente homogeneizados, posteriormente fueron centrifugados en una centrífuga BHG Optima II a 3000 rpm por 10 min, y por último, se procedió a trasvasar los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios, los cuales fueron usados para los ensayos bioquímicos.

Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos

El contenido total de polifenoles fue determinado por espectrofotometría a 765 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y cols., 1999). Fueron mezclados 100 μ L de muestra con 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 con agua, y se le agregaron 400 μ L de carbonato de sodio 7,5% (p/v). Fue registrada la absorbancia después de 10 min de reacción a 37°C, usando como blanco una muestra preparada con agua destilada. La concentración total de polifenoles fue determinada usando una curva de calibración usando una solución de 0,1 g/L de ácido gálico como estándar (0, 0.25, 0.05 y 0.1 g/L).

Determinación del contenido de flavonoides: Método colorimétrico del cloruro de aluminio

El método colorimétrico del cloruro de aluminio fue modificado del procedimiento reportado por Woisky y Salatino (1998). La Quercetina se utilizó, como estándar para construir una curva de calibración. Diez miligramos de Quercetina fueron disueltos en etanol al 80% (v/v) posteriormente diluidos hasta concentraciones de 25, 50 y 100 μ g/mL. Las soluciones estándar diluidas (0,5 mL) fueron mezcladas por separado con 1,5 mL de etanol al 95% (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1 mL de acetato de potasio 1M y 2,8 mL de agua destilada. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, fue medida la absorbancia de la mezcla de reacción a

415 nm. La cantidad de cloruro de aluminio fue sustituida por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5 mL de extractos etanólicos de las muestras en estudio se dejaron reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación consistió en una técnica colorimétrica basada en el método de Lowry y col. (1951). Primero se realizó una curva de calibración usando Albumina Bovina (BSA) como estándar [8 mg de BSA en 10 ml de H₂O MQ].

A la solución de BSA se le midió la densidad óptica a 279 nm y se le determinó la concentración por medio de la fórmula:

$$[\text{BSA}] \text{ (mg/ml)} = \text{D.O.}_{279 \text{ nm}} \times 13/9$$

Una vez determinada la concentración de la solución estándar, se realizaron las diluciones seriadas necesarias para la construcción de la curva de calibración, de acuerdo a la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de reactivos que se usaron para la curva de calibración en la determinación de proteínas.

V _{BSA} (μL)	V _{Agua} (μL)	V _{Sol c} (μL)
0	500	1500
50	450	1500
100	400	1500
200	300	1500
300	200	1500

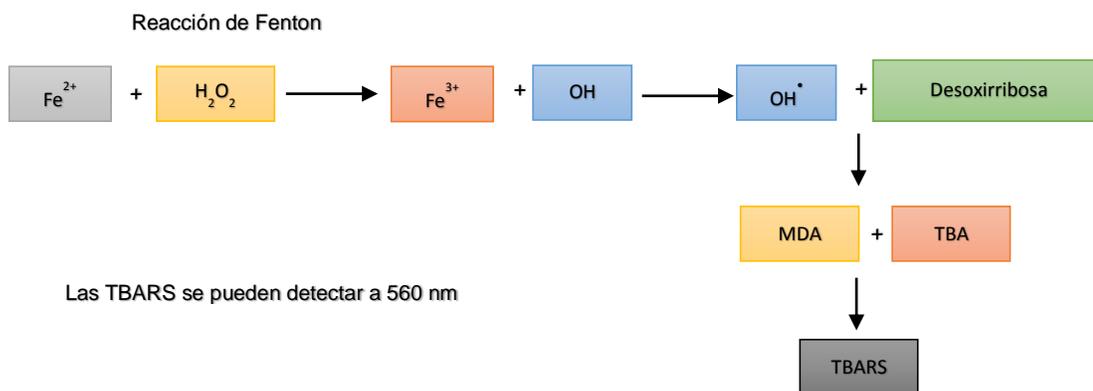
La solución C se preparó mezclando 500 μ L de la solución B (sulfato de cobre 4,0%) con 50 mL de la solución A (Carbonato de Sodio 2%, Hidroxilo de Sodio 2%, Tartrato de Sodio y Potasio 0,16% y SDS 1 %). Los tubos de ensayos se colocaron en baño de maría por 10 minutos a 37 °C. Se diluyó un volumen del reactivo de Folin en un mismo volumen de H₂O MilliQ, y se le adicionó a cada tubo 150 μ L del reactivo de Folin diluido. Los tubos se regresaron al baño de maría por 10 minutos más.

Después se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Una vez realizada la curva de calibración se prosiguió a la medición de las proteínas presentes en las muestras, para lo cual se utilizaron 10 μ L de cada una de las muestras a estudiar siguiendo el procedimiento explicado anteriormente.

Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo

www.bdigital.ula.ve

Se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell y cols., (1987), el cual se muestra en el Esquema 1. En este método el radical hidroxilo se generó por medio de la reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso oxida al peróxido de hidrogeno para formar la especie OH[•]. En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa se fragmento hasta Malondialdehido (MDA) que forma un complejo con el ácido tiobarbitúrico conocido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), detectable a 532 nm. Para llevar a cabo la reacción fueron agregados los siguientes reactivos 0,1 mL de desoxirribosa 28 mM, 0,5 mL de buffer fosfato (pH 7,4) 40 mM, 0,1 mL de FeCl₃ mM, 0,1 mL de EDTA 1,04 mM, 0,1 mL de H₂O₂ 1 mM, 0,1 de ácido ascórbico 1 mM, y 0,2 mL de cada extracto etanólico. Esta mezcla fue incubada por 1 h a 37°C. Entonces, se agregaron 0,5 mL de TBA 1% (p/v) en 0,05 M de NaOH y 0,5 mL de ácido tricloroacético 2,8% (v/v) y se dejó reaccionar por 10 min a 100°C. Fue registrada la absorbancia a 532 mM.



Esquema 1. Representación esquemática método de Halliwell y cols. (1987) para la medición del radical hidroxilo.

Método de la actividad antioxidante (AOA)

El valor de la AOA fue determinado por el método de Koracevic y cols., (2001). En este método una solución estandarizada de Fe-EDTA reaccionó con el peróxido de hidrogeno, produciendo la formación del radical hidroxilo. Este radical libre degradó el benzoato, resultando en la liberación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reacción fue monitoreada espectrofotométricamente, y la inhibición del desarrollo de color en presencia del antioxidante es definida como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar. Los reactivos que se prepararon fueron los siguientes: (1) Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,4, (2) Benzoato de sodio 10 mM, (3) NaOH 50 mM, (4) EDTA 2 mM en buffer fosfato (solución 1), (5) $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 2 mM, (6) solución Fe- EDTA (se preparó fresco mezclando iguales volúmenes de las soluciones 4 y 5, y se dejó reposar 60 minutos a temperatura ambiente), (7) H_2O_2 10 mM, (8) ácido acético 20% (v/v), (9) ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (p/v) en 50 mM de NaOH, (10) ácido úrico 1 mM en 5 mM de NaOH.

Las soluciones 4 y 9 se prepararon inmediatamente antes de su uso. El buffer fosfato de sodio y el benzoato de sodio se almacenaron en el refrigerador (0-4 °C) y el ácido úrico en el congelador (-20 a -30 °C).

Cada muestra (A1) tuvo su propio control (A0, muestra blanco) en la cual la mezcla Fe-EDTA y el H₂O₂ se agregaron después del ácido acético 20%. Para cada serie de análisis se preparó un control negativo (K1 y K0), por triplicado conteniendo los mismos reactivos que A1 o A0, excepto que la muestra antioxidante fue reemplazada con buffer fosfato. Los estándares contenían 1 mM de ácido úrico (UA1 y UA0) y fueron usados en la calibración. Para el análisis se pipetearon en los tubos los volúmenes (en microlitros) especificados en la Tabla 5.

Tabla 5. Volúmenes que se utilizaron para el método del AOA.

	A1	A0	K1	K0	UA1	UA0
Muestra	10	10	-	-	-	-
Ácido úrico	-	-	-	-	10	10
Buffer	490	490	500	500	490	490
Benzoato de Sodio	500	500	500	500	500	500
Ácido acético	-	1000	-	1000	-	1000
Fe-EDTA	200	200	200	200	200	200
H₂O₂	200	200	200	200	200	200
Incubar por 60 min a 37°C						
Ácido Acético	1000	-	1000	-	1000	-
TBA	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Los tubos se incubaron por 10 minutos a 100 °C en baño de agua, y se enfrió en baño de hielo. Se midió la absorbancia a 532 nm donde se usó agua destilada como blanco. La actividad antioxidante fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\text{AOA (mM)} = (\text{CUA}) * (\text{K}-\text{A}) / (\text{K}-\text{UA}), \text{ donde}$$

K= absorbancia del control (K1-K0),

A= absorbancia de la muestra (A1-A0)

UA= absorbancia de la solución de ácido úrico (UA1-UA0)

CUA= es la concentración de ácido úrico (en mM).

www.bdigital.ula.ve

Método del catión radical ABTS^{•+}: Ensayo de Decoloración en solución etanólica

Se usó el método desarrollado por Re y cols., (1999). En este método el ABTS se diluyó en agua a una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS (ABTS^{•+}) se produjo por la reacción de la solución stock de ABTS 7 mM con persulfato de potasio a una concentración final de 2,45 mM (en agua), en oscuridad durante 12-16 h antes de su uso. Para el estudio de compuestos fenólicos, la solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol hasta una absorbancia de 0,70 (±0.02) a 734 nm a 30°C, lo cual se logró mezclando aproximadamente 40 µl de la solución de ABTS y 960 µl de etanol al 20% (v/v). Se tomaron 10 µl de las soluciones stock de antioxidantes fenólicos preparados en etanol y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro con 1,0 ml de la solución de

ABTS^{•+}. Entonces se midieron los valores de densidad óptica a 734 nm de 1 min y 6 min después de la mezcla.

Se usó como estándar una solución de 8 mM de Trolox, la cual se diluyó para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8 μ M, en buffer PBS 5 mM (pH 7,4) (el cual fue usado como antioxidantes en plasma y para el patrón). Se calculó el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical ABTS) a 734 nm después de 6 min de reacción, luego se realizó una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), y se reportó el valor de actividad antioxidante total (AAT) de las muestras problemas en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de AAT para una muestra dada sería el equivalente en concentración de Trolox que produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones se llevaron a cabo tres veces, para cada una de las muestras y soluciones estándar.

Diseño de Análisis

Hernández, Fernández y Baptista (2010) refirieron que existen dos tipos de enfoques de Investigación: cualitativo y cuantitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. En la presente investigación se empleó el diseño de análisis estadístico obtenido de las pruebas bioquímicas de determinación del contenido de flavonoides, concentración de grupos fenólicos, concentración de proteínas, estudio de la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo, Método de la Actividad Antioxidante (AOA) y Método del ABTS. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado aplicando los test o pruebas paramétricas, para el análisis de distribución normal o diferencias significativas entre los grupos de muestra. Se empleó el

sistema cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas, empleándose el análisis de la varianza por medio de la prueba ANOVA *post hoc* Scheffé.

Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)

El análisis de varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado (Sote, 2005). El análisis de varianza (ANOVA) de un factor permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa, y se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. La hipótesis nula ($H_0: p \geq 0,05$ Las medias poblacionales son iguales) traducirá la idea de que en los diferentes grupos se obtienen resultados similares y la hipótesis alternativa ($H_1: p < 0,05$ Al menos dos medias poblacionales son distintas) lo negará. La significación del contraste nos dará una idea de si las diferencias observadas en los diferentes grupos son imputables al azar (significación grande) o hay una diferencia intrínseca entre algunos grupos (significación pequeña) (Sote, 2005).

Pruebas Post-Hoc

Una vez que se determinó que existen diferencias entre las medias, las pruebas de rango *post-hoc* y las comparaciones múltiples por parejas permitieron determinar qué medias difieren. Las pruebas de rango son aquellas que buscan identificar grupos homogéneos (medias parecidas). Las comparaciones múltiples buscan establecer diferencias entre grupos basándose en diferencia dos a dos, y generan una matriz donde los asteriscos indican las medias de grupo significativamente diferentes a un nivel alfa de 0,05. En este caso, se llevó cabo la prueba *post-hoc* conocida como *Test de Scheffé*. Por medio de esta prueba se hacen todas las comparaciones posibles, por ejemplo, el primer grupo con respecto a cada uno de los restantes, pero también el primero con respecto al grupo formado (Taylor, 2008)

IV CAPÍTULO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Las 17 muestras de mieles analizadas en este trabajo de investigación, fueron seleccionadas de un total de 40 muestras recolectadas y enviadas en colaboración con el proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”. Las muestras escogidas pertenecen a la zona noroeste de Ecuador, regiones 1, 2 y 4, específicamente. Estas muestras fueron analizadas en el laboratorio de Análisis Biotecnológico y -Molecular “Prof. Guillermo López Corcuera” en Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, donde se le determinó la concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas; y también se logró determinar la actividad antioxidante de acuerdo a tres métodos (Método Radical hidroxilo, ABTS y del AOA). Las determinaciones antes mencionadas fueron comparadas por medio de métodos estadísticos para observar la relación entre la concentración de sus componentes con la actividad antioxidante presente en la muestra.

Caracterización química de las mieles en estudio

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la concentración de flavonoides, polifenoles y proteínas de cada una de las muestras de miel usadas en este estudio. En cuanto a la concentración de flavonoides los rangos de los mismos se encontraron entre 56,6 y 96,2 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel,

presentándose un amplio rango de valores de concentración de flavonoides para las diferentes muestras en estudio. A su vez, algunos valores estadísticamente similares entre algunas mieles de la misma provincia como las muestra 79 y 80 con concentración media de 90,6 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel; así como también existe similitud entre algunas mieles de diferentes provincias como la muestras 83 y 84 con concentración media de 80,8 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel.

Tabla 6. Concentración media de flavonoides, polifenoles y proteínas de las muestras analizadas.

N°	Flavonoides (mg equivalentes de quercetina/100 g de miel)	Polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel)	Proteínas (mg equivalentes de proteína/100 g de miel)
Pichincha (Ecuador)			
77	59,6 ± 0,5b	117,9 ± 0,5 ^a	16,3 ± 0,8 ^a
82	81,3 ± 1,6f	444,9 ± 2,2d	340,6 ± 5,7e
83	80,8 ± 1,2f	555,3 ± 0,2e	444,4 ± 0,7f
86	56,6 ± 0,1 ^a	633,7 ± 0,7f	406,4 ± 2,6f
87	77,3 ± 0,1e	633,7 ± 1,6f	352,7 ± 7,6e
92	62,4 ± 0,5c	486,4 ± 1,8d	224,0 ± 5,6d
94	73,6 ± 0,9d	373,4 ± 3,0c	189,7 ± 3,2c
Carchi (Ecuador)			
78	84,1 ± 1,1g	191,2 ± 0,2b	374,9 ± 2,5e
Imbabura (Ecuador)			

79	90,6 ± 1,0i	405,1 ± 1,8d	493,4 ± 6,1f
80	90,6 ± 1,0i	659,6 ± 1,6f	370,3 ± 4,1e
81	96,2 ± 0,3j	474,0 ± 9,9d	408,2 ± 3,4f
93	63,8 ± 0,7c	464,2 ± 3,0d	344,4 ± 2,0e
Esmeralda (Ecuador)			
84	80,8 ± 0,8f	663,6 ± 0,6f	83,2 ± 4,7b
95	57,9 ± 0,1 ^a	584,1 ± 3,4e	292,5 ± 2,6d
Manabí (Ecuador)			
88	88,7 ± 0,3h	405,1 ± 3,1d	469,4 ± 2,7f
89	64,7 ± 0,3c	713,5 ± 4,0g	195,3 ± 4,5c
Santa Elena (Ecuador)			
101	73,9 ± 0,5d	518,2 ± 1,9e	332,3 ± 5,5e

De igual forma, el contenido total de polifenoles de las muestras en estudio fue determinado por espectrometría usando el reactivo de Folin-ciocalteu, empleando una curva de calibración de ácido gálico como estándar. Los resultados de la determinación de la concentración de polifenoles se presentan en la Tabla 6, donde se puede observar que los valores de concentración de polifenoles se encontraron entre 117,9 y 659,6 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, siendo la muestra 77 (Pichincha) la que presentó el menor valor de concentración de polifenoles, y la muestra 80 de miel (Imbabura) la del mayor contenido de polifenoles. En líneas generales, se presenta un amplio rango de valores de concentración de polifenoles entre las mieles en estudio, encontrándose valores estadísticamente iguales entre muestras de miel de la misma provincia como en el caso de las muestras 86 y 87

(Pichincha) con una concentración media de 633,7 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel.

En cuanto al cálculo de la concentración de proteínas se utilizó el Método de Lowry (1951), usando una solución de albúmina bovina como estándar. Los resultados de la concentración de proteínas se presentan en la Tabla 6, siendo la muestra 77 (Pichincha) la que presentó el menor valor de concentración de proteínas (16,3 mg de proteína/100 g de miel) de la misma forma que en el caso de los polifenoles; mientras que la muestra de miel 79 (Imbabura) mostró el mayor valor de concentración de proteínas (493,4 mg de proteína/100 g de miel). Por otra parte, se presenta un amplio rango de valores entre todas las muestras analizadas.

Actividad antioxidante de las mieles en estudio

Una vez realizada la caracterización química de las muestras en estudio, se procedió a determinar la actividad antioxidante de las mismas por medio de 3 métodos. Los resultados se representan en la Tabla 7. En primer lugar, el método del AOA tiene como objetivo analizar la actividad antioxidante de una muestra usando como patrón de comparación el ácido úrico, el cual es un potente antioxidante no enzimático. El valor obtenido se conoce como Actividad Antioxidante (AOA) y se expresa en mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel. Los valores de AOA para las mieles en estudio fueron muy cercanos, desde 1,07 y 1,11 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, siendo las muestras 77, 79, 82, y 84 las que presentan el valor más bajo, mientras que la muestra 92 fue la que presentó el mayor valor de AOA (1,11 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel).

No se encontró correlación lineal entre el contenido de flavonoides ($R^2 = 0,211$), concentración de proteínas ($R^2 = 0,001$) y polifenoles (0,042) con la actividad antioxidante medida por el método del AOA. Por último, todas las

muestras de miel usadas en este ensayo presentaron valores de AOA superiores a las reportadas para la quercetina, melatonina y ácido lipoico, los cuales son antioxidantes comerciales y purificados usados como comparación en este trabajo (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de la actividad antioxidante de las mieles analizadas. Métodos AOA, radical hidroxilo y ABTS.

Nº	AOA (mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel)	Radical Hidroxilo (% de inhibición/100 g de miel)	ABTs (µmoles equivalentes de Trolox/100 g de miel)
Pichincha (Ecuador)			
77	1,07 ± 0,02c	96,0 ± 0,24d	166,7 ± 0,28g
82	1,07 ± 0,02c	97,5 ± 0,20d	126,1 ± 0,65e
83	1,08 ± 0,02d	98,3 ± 0,06e	108,7 ± 0,67d
86	1,09 ± 0,01e	96,9 ± 0,09d	101,8 ± 0,04c
87	1,08 ± 0,0 2d	99,4 ± 0,04e	134,7 ± 0,25f
92	1,11 ± 0,00g	97,4 ± 0,16d	124,9 ± 0,90e
94	1,10 ± 0,01f	98,8 ± 0,03e	100,0 ± 0,63c
Carchi (Ecuador)			
78	1,09 ± 0,02e	97,0 ± 0,27d	89,4 ± 0,60a
Imbabura (Ecuador)			
79	1,07 ± 0,03c	99,6 ± 0,01e	91,3 ± 0,60a
80	1,08 ± 0,01d	99,0 ± 0,07e	97,5 ± 0,74b
81	1,08 ± 0,02d	97,5 ± 0,09d	100,6 ± 0,75c
93	1,09 ± 0,01e	98,7 ± 0,04e	102,2 ± 0,74c
Esmeralda (Ecuador)			
84	1,07 ± 0,01c	98,4 ± 0,04e	192,0 ± 0,27d
95	1,10 ± 0,02f	98,5 ± 0,03e	88,0 ± 0,13a
Manabí (Ecuador)			
88	1,09 ± 0,01e	98,8 ± 0,08e	93,1 ± 0,57a

89	1,09 ± 0,02e	99,5 ± 0,02e	106,7 ± 0,68d
Santa Elena (Ecuador)			
101	1,10 ± 0,03f	93,5 ± 0,51c	90,0 ± 0,63a
Antioxidantes Comerciales (preparados a 1 Mm)			
Quercetina	0,86 ± 0,03b	53,0 ± 1,10b	100,6 ± 1,70c
Melatonina	0,83 ± 0,02b	53,9 ± 1,07b	97,6 ± 5,10b
Ácido Lipoico	0,71 ± 0,07a	27,9 ± 0,98 ^a	124,7 ± 3,10e

En cuanto al efecto de las muestras sobre el radical hidroxilo, los valores de porcentaje de inhibición de la formación del radical hidroxilo variaron entre 93,5 y 99,5 % de inhibición/100 g de miel, siendo la muestra 79 la que presentó mayor porcentaje de inhibición con 99,6 % de inhibición/100 g de miel y la muestra 101 la que reportó el menor % de inhibición con 93,5 % de inhibición/100 g de miel. Por otro lado, las muestras que tienen similitudes estadísticas son la 94 y 88 con 98,8 % de inhibición/100 g de miel, y las muestras 81 y 82 con 97,5 % de inhibición/100 g de miel. No se encontró correlación entre la concentración de proteínas ($R^2 = 0,019$) el contenido de polifenoles ($R^2 = 0,110$) y el contenido de flavonoides ($R^2 = 0,051$) con la capacidad de inhibición del radical hidroxilo (Tabla 8). Al comparar la capacidad de inhibición de las muestras de miel con la de antioxidantes comerciales, se observa que todas las muestras de miel presentaron % de inhibición superiores a los reportados para los antioxidantes comerciales usados en este estudio (Tabla 7).

Tabla 8. Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.

Parámetro	Proteínas	Flavonoides	Polifenoles	AOA	RH	CAT
Proteínas	1	0,249	0,017	0,001	0,019	0,517
Flavonoides		1	0,003	0,211	0,051	0,022
Polifenoles			1	0,042	0,110	3E-06

AOA				1	0,034	0,166
RH					1	0,001
CAT						1

Para finalizar, se determinó la actividad antioxidante por medio del método del catión radical ABTS, con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante total (CAT) usando como patrón de comparación el Trolox, en la que se evaluó la capacidad antioxidante de una muestra de miel al secuestrar el catión radical ABTS, evidenciándose a través de la disminución en el desarrollo de color. Los valores de CAT variaron desde 88,0 hasta 192,0 μ moles equivalente de Trolox/100 g de miel, siendo la muestra de miel artificial 95 la que presentó el menor valor, y la muestra 84 la de mayor valor de CAT. Existe mucha variación en los valores de CAT de las muestras de miel estudiadas, observándose diferentes valores en todas las mieles. En este caso se encontró correlación entre la concentración de proteínas ($R^2 = 0,517$) sin embargo no hubo correlación entre la concentración de flavonoides ($R^2 = 0,022$) y la concentración de polifenoles ($R^2 = 3E-06$) con los valores de CAT, estando esta última en un valor muy bajo. Por otra parte, los valores de CAT de la mayoría de las muestras de miel fueron superiores a los reportados para los antioxidantes comerciales usados como patrón de comparación en este estudio (Tabla 8).

Discusión

Caracterización química

Los análisis químicos de muestras de miel de abejas sin aguijón han tomado gran importancia, principalmente la determinación de su contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas, debido a que estos compuestos presentan actividad biológica, las cuales muestran gran actividad antioxidante, y a su vez

un importante rol en la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Aljadi y cols., 2004).

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la concentración de flavonoides, proteínas y polifenoles de las muestras de miel usadas en este trabajo. Se reportaron valores de concentración de polifenoles que variaron entre 117,9 y 659,6 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, mientras que la concentración de flavonoides se encontró entre 56,6 y 96,2 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, para las muestras de mieles de *Meliponini* de Ecuador (Tabla 6). Al comparar estos resultados con la bibliografía se encontró, que los valores obtenidos son más altos que los reportados por Vattuone y cols. (2007). Quienes determinaron compuestos fenólicos totales y flavonoides de mieles de *Tetragonisca angustula fiebrigi* y *Plebeia wittmanni* obtenidas de colmenas silvestres ubicadas en distintas regiones de Argentina, donde el contenido total de compuestos fenólicos varió entre 41,8 - 44,0 y 28,3 - 32,1 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel; el de flavonoides entre 1,2 - 2,0 y 0,8 - 1,4 expresados como mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, respectivamente. Los resultados de concentración de polifenoles y flavonoides de las mieles evaluadas en este estudio también son mucho mayores a los reportados por Oddo y cols. (2008) quienes evaluaron las mieles de *Trigona carbonari* de Australia donde el contenido de flavonoides fue de $10,02 \pm 1,59$ mg de equivalentes de quercetina/100 g de miel, y el contenido de polifenoles fue de $55,74 \pm 6,11$ mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de miel. De igual manera se encontró que los valores de flavonoides y polifenoles obtenidos en esta investigación son mayores que los reportados por Rodriguez y cols., (2009) en mieles producida por diez especies de abejas sin aguijón (*Melipona crinita*, *M. eburnea*, *M. grandis*, *M. illota*, *Nannotrigona melanocera*, *Partamona epiphytophila*, *Ptilotrigona lurida*, *Scaptotrigona polystica*, *Scaura latitarsis*, y *Tetragonisca angustula*) del Perú, donde la concentración de flavonoides variaron de 2,6 a 31,0 mg equivalentes de

quercetina/100 g miel, y los polifenoles de 99,7 a 464,9 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel.

En relación a la concentración de proteínas, es importante mencionar que las investigaciones sobre este tema en mieles de abejas sin aguijón son muy escasas, lo que dificulta un poco comparar los resultados obtenidos con los de otras investigaciones. En este estudio, los valores de concentración de proteínas variaron entre 16,3 - 493,4 mg de proteína/100 g de miel (Tabla 6). Al comparar estos resultados, se encontró que son inferiores que los reportados por Rodríguez y cols. (2009) en mieles producida por diez especies de abejas sin aguijón del Perú, donde la concentración de proteínas se encontró entre 750 a 2860 mg/100g de miel.

Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos

Es importante mencionar, que son pocos los trabajos realizados anteriormente, que guarden relación con el estudio de la capacidad antioxidante en mieles de abejas sin aguijón mediante los tres métodos utilizados en esta investigación, conocidos como AOA, porcentaje de inhibición del Radical Hidroxilo y ABTS.

Los resultados de la actividad antioxidante en las mieles estudiadas, se encuentran en la Tabla 7. Los valores de AOA para las mieles en estudio fueron muy cercanos, entre 1,07 a 1,11 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, siendo las muestras 77, 79, 82, Y 84 las que presentan el valor más bajo, mientras que la muestra 92 fue la que presentó el mayor valor de AOA. Al comparar estos resultados con la bibliografía se encontró que son mayores a los reportados por Rodríguez y cols. (2007). Quienes estudiaron la capacidad antioxidante de mieles venezolanas de tres géneros *Apis mellifera* L, *Melipona favosa* Fabricius y *Tetragonisca angustula* Latreille, donde los valores que reportaron fueron de 0,64 - 0,74 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel

para *Apis*, 0,72 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel para *Melipona* y 0,67 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel para *Tetragonisca*.

En cuanto al efecto de las muestras sobre el radical hidroxilo, los valores de porcentaje de inhibición de la formación del radical hidroxilo variaron entre 93,5 a 99,5 % de inhibición/100 g de miel, siendo la muestra 89 la que presentó mayor porcentaje de inhibición, y la muestra 101 la que reportó el menor % de inhibición. Estos valores también son mayores que los reportados por Rodríguez y cols. (2007) donde los valores variaron entre las diferentes especies con diferencias mínimas, en el caso de la miel de *Apis* entre 62,73 a 77,77 % de inhibición/100 g de miel, 74,48 % de inhibición/100 g de miel para *Melipona* y 71,36 % de inhibición/100 g de miel para *Tetragonisca*.

El último método utilizado en este trabajo para evaluar la actividad antioxidante de las muestras de miel, es el que se basa en la decoloración del catión radical ABTS⁺, en el cual se evalúa como una muestra con un posible antioxidante disminuye el radical formado, reportándose el valor resultante como CAT. Los valores de CAT variaron de 88,0 a 192,0 μ moles equivalente de Trolox/100 g de miel, los cuales se encuentran por debajo de los reportados por Oddo y cols. (2008) en mieles australianas donde el valor de CAT fue de $233,96 \pm 50,95 \mu\text{M}$ equivalentes de Trolox/ 100g miel. De igual forma los valores de CAT de esta investigación son menores que los reportados por Rodriguez y cols. (2009) en mieles peruanas, donde los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante son de 93,8 a 569,6 μM equivalentes de Trolox/ 100 g de miel.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de la correlación existente entre la actividad antioxidante medida por los 3 métodos usados en este trabajo y la concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas. En la mayoría de los casos se evidencian correlaciones negativas ($R^2 < 0,500$) con cada uno de los parámetros en estudio (polifenoles, flavonoides y proteínas); salvo en el caso de la CAT y la concentración de proteínas donde la correlación presentó valores de CAT de $R^2 = 0,517$. Estos resultados son semejantes a los obtenidos

por Vattuone y cols. (2007) en un trabajo donde se estudió el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y prolina en mieles de *Tetragonisca angustula fiebrigi* y de *Plebeia wittmanni* obtenidas de colmenas silvestres ubicadas en distintas regiones de Argentina. En dicha investigación el coeficiente de correlación entre compuestos fenólicos totales y flavonoides totales no fue elevado para ninguna de las especies estudiadas ($R^2 \leq 0,21$). Sin embargo, se observó una alta correlación entre los contenidos de prolina, para la miel de *T. angustula fiebrigi* ($R^2 \geq 0,98$) indicando que la miel de *T. angustula fiebrigi* posee un mayor contenido de prolina que la de *P. wittmanni*, lo que sugiere un mayor nivel nutricional. En el caso de los resultados obtenidos por Muños y Copaja (2007), en una investigación realizada en mieles producidas en diversas zonas de Chile, se encontró correlación insignificante entre el contenido de flavonoides con el potencial antioxidante de Trolox, de igual forma que con el contenido de compuestos fenólicos ($R^2 \geq 0,003$). Esto probablemente sobreviene porque la muestra de miel utilizada para el ensayo utilizado en esa investigación fue entera y no fraccionada. (Muños y Copaja, 2007). El bajo índice de correlación observado entre compuestos fenólicos y flavonoides totales podría ser consecuencia de la metodología empleada para la determinación de flavonoides que requiere de ciertas restricciones estructurales.

Cerca de 20 proteínas no enzimáticas se han identificado en la miel, muchas de las cuales son comunes a distintas mieles. Las proteínas se encuentran en muy pequeñas cantidades (0.38% aproximadamente), en donde se han identificado algunas enzimas, como la invertasa, la amilasa y la glucosidasa. De los aminoácidos, la prolina es el más abundante de todos, le siguen la lisina, el ácido glutámico y el ácido aspártico (Ulloa y cols., 2010). Por otra parte, las enzimas son añadidas principalmente por las abejas, aunque algunas pocas proceden de las plantas. Las abejas añaden enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel y estas son en gran parte las responsables de la complejidad composicional de la miel. El proceso

involucrado en la conversión de los tres azúcares básicos del néctar a por lo menos 25 azúcares adicionales de gran complejidad es difícil de entender. La enzima más importante de la miel es la α -glucosidasa, ya que es la responsable de muchos de los cambios que ocurren durante la miel; también se conoce como invertasa o sucrasa y convierte el disacárido sacarosa de la miel en sus constituyentes monosacáridos fructosa y glucosa (Ulloa y cols., 2010).

Al observar los valores de las propiedades químicas de las muestras analizadas (Tabla 6) se evidencia que existen muestras de mieles con valores estadísticamente similares provenientes de la misma región, como es el caso de las muestras 79 y 80 provenientes de Ibambura, las cuales presentan los mismos valores de concentración de flavonoides (90,6 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel). De igual forma ocurre con las concentraciones de polifenoles, donde las muestras 86 y 87 provenientes de Pichincha, presentan los mismos valores (633,7 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel).

Por otra parte, se puede evidenciar que hay muestras que presentan los mismos valores, y no pertenecen a la misma provincia, como es el caso de las muestras 83 y 84 pertenecientes a las provincias Pichincha y Esmeraldas respectivamente, las cuales presentan la misma concentración de flavonoides (80,8 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel). De igual forma ocurre con las muestras 79 y 88 provenientes de Ibambura y Manabí, respectivamente, que presentan el mismo valor de polifenoles (90,6 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel). Sin embargo, en la mayoría de los resultados se puede observar que, aunque existen muestras que pertenecen a la misma región, no presentan valores semejantes en relación a su composición química.

La composición química de la miel varía según su origen floral, además, influyen muchos factores externos como el suelo, el clima, es decir las condiciones ambientales (Rodríguez, 2012). Lo que quiere decir que al haber abejas que comparten las mismas condiciones ambientales, o que, al momento de extraer el néctar de las flores u otras partes de la planta,

seleccionan el mismo tipo vegetación, podría ocasionar que sus propiedades nutricionales sean similares o no.

En el caso de la actividad antioxidante, al observar los valores obtenidos (Tabla 7) se puede visualizar que existen valores estadísticamente semejantes entre todas las muestras analizadas. La capacidad antioxidante varía en gran medida dependiendo de la fuente floral de la miel, posiblemente debido a las diferencias en el contenido de metabolitos secundarios de plantas y actividad de las enzimas, como lo son los fitoquímicos originarios de cada planta (Alvares y cols., 2013)

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. La concentración de flavonoides presentó un rango entre 56,6 a 96,2 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel. Se evidenciaron muestras estadísticamente similares provenientes de la misma región, así como de regiones diferentes.
2. Los valores de concentración de polifenoles se encontraron entre 117,9 a 659,6 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, con muestras estadísticamente semejantes provenientes de la misma provincia, así como de provincias diferentes.
3. Los valores de la concentración de proteínas presentaron rangos entre 16,3 a 493,4 mg de proteína/100 g de miel, evidenciando un amplio rango de valores entre todas las muestras analizadas.
4. Las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas fueron comparados con los valores obtenidos por diferentes autores, siendo superiores a los obtenidos por varios autores.
5. En cuanto a la actividad antioxidante, los valores de AOA estuvieron en el rango entre 1,07 a 1,11 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel, la inhibición del radical hidroxilo entre 93,5 a 99,5 % de inhibición/100 g de miel, y la CAT entre 88,0 a 192,0 μ moles equivalente de Trolox/100 g de miel. Para los tres métodos utilizados, los valores fueron superiores a los encontrados para la melatonina, quercetina y ácido Lipoico.
6. No se encontró correlación entre la actividad antioxidante y las concentraciones de polifenoles y flavonoides para ninguno de los tres

métodos usados en este estudio. Sólo se observó la correlación positiva entre la concentración de proteínas y los valores de CAT.

7. Este es uno de los primeros trabajos en los que se hace un estudio detallado de las propiedades antioxidantes y composición fisicoquímica de muestras de mieles producidas por abejas sin aguijón del noreste de Ecuador, lo que contribuye en el proceso de conocimiento de dichas mieles, así como en la valorización de las mismas.

Recomendaciones

- Es necesario repetir el estudio con una mayor cantidad de muestras provenientes de una mayor cantidad de regiones del noreste de Ecuador, para contar con una población más representativa del área, y poder establecer correlaciones entre el origen geográfico y la actividad antioxidante.
- En virtud de la correlación positiva entre los valores de CAT y la concentración de proteínas, es recomendable llevar a cabo un perfil proteico de las muestras en estudio, con el objetivo de determinar qué tipo de proteínas están presentes en estas muestras, y medir la actividad enzimática de aquellas que puedan contribuir con la actividad antioxidante.
- Sería de gran utilidad investigar acerca del tipo de polifenoles y flavonoides presentes en estas muestras para comparar con otras en las que dicha correlación es positiva.
- El bajo índice de correlación observada entre compuestos fenólicos y flavonoides totales podría ser consecuencia de la metodología empleada para su determinación, por lo que se recomienda medir estos parámetros usando otras metodologías de modo de verificar que la falta de correlación no es dependiente del procedimiento usado para determinarlos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAB. Agência Estadual de Defesa Agropecuaria da Bahía. (2014). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero *Melipona* (pp. 1-9), Bahía, Brasil: Portaria ADAB Nº 207 DE 21/11/2014
- Aljadi AM, Kamaruddin MY. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry* 2004; 85: 513–518.
- Almeida da Silva, Sarmiento IA, da Silva TM., Camara CM, Queiroz M, Magnan M, Santos de Novais, Bastos J, Soledade LE, Oliveira LE, De Souza AL, De Souza AG. (2013) Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*;14: 3552-3558
- Amaya L. (2013). Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. San Salvador, el Salvador, centro América.
- Anklam E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.*;63(4):549–62.
- Barrantes Echavarría, R. (2001) “Investigación un camino al conocimiento, un enfoque cuantitativo y cualitativo, San José de Costa Rica.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. y Gallmann, P. (2004). Honey for nutrition and health: a review. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689

- Callebaut J. (2001). Estudio de las abejas sin aguijón y sus prácticas de manejo por la población local en el sur occidente de Loja. 50 p.
- Camargo JMF, Pedro SR. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie* 23: 509-522.
- Camargo J. M. F; Pedro, S. R. M. (2007). Meliponini. En: Moure, JS; Urban, D; Melo, GAR (Eds.). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Curitiba (Paraná), Sociedade Brasileira de Entomologia. p. 272- 578 1058 p.
- CODEX STAN 12 (1981). Codex Norma para la Miel. Norma adoptada en 1981. Revisiones en 1987 y 2001. FAO; Roma, Italia. 8 pp.
- Codex Alimentarius Commission. (2001). Revised Codex Standard for Honey. CODEX STAN 12-1981. Rome, Italy: FAO/WHO.
- Coloma, L.A. (1986). Contribución para el conocimiento de las abejas sin aguijón (*Hymenoptera, Apidae, Meliponinae*) de Ecuador. Quito, Monografía. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales. (1984). Miel de Abejas. Métodos de Ensayo. COVENIN 2136-84. Fondonorma. Caracas. Venezuela. 32 pp.
- Crane, E. (1992). Features of honeybees in relation to their use by man. In: The world history of beekeeping and honey hunting. New York. Routledge. pp. 19-26.
- Dardón, M., Enríquez, M. E. (2008). Caracterización de la miel de meliponinos de distintas regiones biogeográficas de Guatemala. Resúmenes de investigación, Área técnica de la Dirección General de Investigación DIGI.
- Engels MS. (2009). A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae). *American Museum Novitates* 3296:11pp.

- FAO / OMS. (1969). "Norma Regional Europea recomendada para la miel". Codex Alimentarius. Commission CAC / RS12.Labores de la Conferencia CCI. "Desarrollo del comercio apícola
- Ferrufino, U., Vit, P. (2013). Pot-honey of six species of Meliponini from Amboró National Park in Bolivia. En: P. Vit, S.R.M. Pedro, D.W.Roubik (Eds.), Pot-honey. A legacy of stingless bees (pp. 409-416), New York, USA: Springer.
- Fuenmayor, C.A., Zuloaga-Domínguez, C.M., Díaz-Moreno, A. C., Quicazán, M.C. (2012). 'Miel de angelita': Nutritional composition and physicochemical properties of *Tetragonisca angustula* honey. *Interciencia* 37(2): 142-147.
- García-Tenesaca M, Navarrete E, Iturralde G, Villacrés Granda I, Tejera E, Beltrán-Ayala P, Giampieri F, Battino M, Alvarez-Suarez J. (2017). "Influence of Botanical Origin and Chemical Composition on the Protective Effect against Oxidative Damage and the Capacity to Reduce In Vitro Bacterial Biofilms of Monofloral Honeys from the Andean Region of Ecuador" *Journal of molecular science*. 19-45.
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. (2002) "Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21): 5870–5877.
- Gil de Albuquerque, D. (2011) Biosensor evaluation of the Antioxidant activity of wines and teas. Interference studies and comparison with other methods, Universidad de Lisboa.
- González-Acereto JA. (2012) Cría y manejo de abejas nativas sin aguijón en México, Mexico: Planeta Impresores
- Guisado R. (2007) Guisado B., Bordes González, García Morales MC, Fernández T., Universidad de Granada Oxidación y producción de radicales libres.

- Gutiérrez MG, Enriquez E, Lusco L, Rodríguez-Malaver A, Persano L, Vit P. (2009) Caracterización de mieles de *Melipona beecheii* y *Melipona Solani* de Guatemala. *Rev. Fac Farm.* 50(1): 2-6.
- Gutiérrez, M.G., Rodríguez-Malavaer, A., Vit, P. (2008). Miel de abejas: una fuente de antioxidantes. *Fuerza Farmacéutica*, 12 (1), 39 – 44.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. y Aruoma, O. (1987). The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal of Biochemistry* 165: 215–219.
- Hernández Sampieri, Roberto Fernández Collado, Carlos Baptista Lucio, Pilar. (2004.) *METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN*. McGraw-Hill Interamericana México.
- ICONTEC. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2007). Norma Técnica Colombiana. Miel de Abejas. NTC 1273. ICONTEC (pp. 1-6), Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- Kasprzyk A, Żbikowska B, Sroka Z, Gamian A. (2012) The antiradical activity of some plant raw materials and extracts obtained from these raw materials. *Postępy Hig. Med. Dośw.*; 66: 146-152.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. y Cosic, V. (2001). Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology* 54: 356-61.
- Kumul (2015) Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud. Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida. México.
- Chieruzzi Löwenstein MC. (1989) Etnomeliponicultura y análisis químico de las mieles de cinco especies de abejas sin aguijón (*Meliponinae*). Tesis para Licenciatura de Biología. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica de Ecuador: Quito, Ecuador. 192 pp.

- Latreille, (1809) (Hymenoptera, Apidae), con notas sobre su biología y distribución. *Revista Peruana De Entomología*, 43(1), 31-45.
- León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A. V., San Andrés, M. P. (2013). Vitamin C and sugar levels as simple markers for discriminating Spanish honey sources. *Journal of Food Science*, 76, 356-361.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. y Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Manrique, A.J. (1995). (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay (Venezuela). Evaluación de prácticas de manejo de abejas sobre la producción de miel y cera. *Zootecnia Tropical (Venezuela)*. v. 13(2) p. 215-223.
- Marshall T, Williams KM. (1987) Electrophoresis of honey: Characterization of trace proteins from complex biological matrix by silver staining. *Analytical Biochemistry*; 167, 301–303.
- Mendes E, Brojo-Proença E, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. (1998) Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydr. Polym.*; 37, 219.
- Michener C. D. (1974) *The social behavior of the bees; a comparative study* (Cambridge. Mass. Harvard University Press)
- Michener C.D. (2000) *the bees of the world* The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, 913 pp.
- Molan P. (1992) Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. In: *Honey and healing*. Munn, P; Jones, R (eds) Cardiff, UK: International Bee Research Association (IBRA)
- Moure J.S. (1971) Descrição de uma nova especie de *Tetragona* do Brasil *Central Boletim Universidade Federal do Paraná, Zool.* 4:47-50

- Muñoz y Copaja (2007) contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago – Chile.
- Muradian M. Arsel L. Pellegrini F. Adaman B. Aguilar B. Agarwal E. Corbera D. Ezzine de Blas J. Farley G. Froger E. Garcia-Frapolli. (2012) Payments for ecosystem services and the fatal attraction of win-win solutions. First published: 26 November
- Núñez, A. (2011) Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*. 37 (suppl.): 644-60.
- Oddo LP, Heard TA, Rodríguez-Malaver A, Pérez RA, Fernández-Muiño M, Sancho MT, Sesta G, Lusco L, Vit P. (2008) Composition and antioxidant activity of Trigona carbonaria honey from Australia. *J Med Food*.11(4):789-94. doi: 10.1089/jmf.2007.0724.
- Pérez G. (2003) Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón *Rev. Cubana Invest Bioméd* v.22 n.1 Ciudad de la Habana.
- Quezada-Euán J. J. G., W. May-Itzá, J.A. González-Acereto. (2001). Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development. *Bee World*, 82 (4), 160—167.
- Ramos (2005) Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera, Meliponini)
- Rasmussen C. (2004). Abejas en el sur de Ecuador, Lyona: a journal of ecology and application, 7 (2): 29—35
- Re, R., Pellegrini, N., Protoggnte, A., Pannala, A., Yang, M.y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical in Biology and Medicine* 26: 1231-1237.

- Reboiras, M. (2006) Química: La ciencia básica. pag 3
- Roberfroid, M. B. (2002) Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* 88 Suppl 2:S133-S138.
- Rodríguez, A., Pérez, E, y Vit P. (2007). Capacidad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. *Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel"* 2007; 38 (2): 13-7.
- Rodríguez, A., Rasmussen, C., Gutiérrez, M., Gil, F., Nieves, B. y Vit P (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *NPC*, 4: 1221-1226.
- Rosso, J; Nates, G. (2005) Meliponicultura: una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales Laboratorio de Investigaciones en Abejas (LABUN), Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490 Bogotá, Colombia. *LEISA revista de agroecología*
- Roubik D. (1989). *Ecology and natural history of the tropical bees* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Roubik, D. (1997) Pollination of cultivated plants in the tropics. *FAO Agricultural Services Bulletin* 118:1-6.
- Sabino, C. (2007). *El proceso de investigación*. Caracas: Panapo.
- Schwarz H.F. (1948) Stingless bees (*Meliponidae*) of the Western Hemisphere *Bulletin of the American Museum of Natural History* 90:1-546
- Singleton, VL., Orthofer, R.y Lamuela-Raventos, RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152–178.
- Snelling (1981) Systematics of social, Hymenoptera in: *Social insects*. Volumen 2. New York: academic press, xiii+491pp.
- Schwarz H.F. (1948) Stingless bees (*Meliponidae*) of the Western Hemisphere *Bulletin of the American Museum of Natural History* 90:1-546

- Terán, S. y C. Rasmussen (1994). La milpa de los mayas. La agricultura de los mayas prehispánicos y actuales en el noreste de Yucatán. Mérida, Yucatán, Gobierno del Estado de Yucatán y Gobierno de Dinamarca (DANIDA).
- Ulloa, Mondragón P, Rodríguez R, Reséndiz, J. Vázquez. (2010) La miel de abeja y su importancia. Revista Fuente Año 2, No. 4, septiembre.
- Vattuone, M.A., Quiroga, E.N., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., et al. (2007) Compuestos fenólicos totales, flavonoides, prolina y capacidad captadora de radicales libres de mieles de *Tetragonis caangustula* Fiebrigi y de *Plebeia wittmanni*, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6 (5), 299-300.
- Villanueva G. R., D. W. Roubiky W.CollíUcán. (2005). Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatan peninsula. *Bee World*, 86 (2): 35 – 41
- Vit, P. (2005). *Melissopalynology*, Venezuela (205 pp.). Mérida, Venezuela: APIBA-CDCHT, Universidad de Los Andes.
- Vit P, Medina M, Enriquez ME. (2004) Quality standards for medicinal uses of *Meliponinae* honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*; 85(1): 2-5.
- Vit, P., Mejías, A., Rial, L., Ruiaz, J., Peña, S., Gonzales, A.C., Rodriguez, A., Arraez, M., Guitierrez, C., Zambrano, A., y Ortrud, M. (2013). Knowing the *Melipona favosa* honey from Paraguaná Peninsula, Falcon state, Venezuela. *INHRR*, 43, (1).
- Vit P. (2008) Valorización de la miel de abejas sin aguijon (Meliponini). *Vit/Rev Fac Farm*; 50(2): 20-28.
- Vit P. (2012) conociendo la miel de melipona favosa en la península de paraguaná, estado falcón, Venezuela. Revista del instituto nacional de

higiene rafael rangel *versión impresa* issn 0798-0477inhrr vol.43 no.1 caracas.

- Vit, P., O. Vargas, L. zTriny, and F. Valle. (2015) "Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from el oro province in Ecuador". Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol. 27, no. 6, Apr., pp. 502-6,
- Vit, P., S. Bertha, P. Silvia, J. Ruíz, F. Maza, P.- María, and P.- Elizabeth. (2016) "Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by melipona and scaptotrigona stingless bees from paria grande, Amazonas state, Venezuela". Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol. 28, no. 2, pp. 78-84.
- Wade (1993). Quimica Organica, vol 1. 7a Edicion.
- White J. (1978) Composition of Honey. In Crane E (ed) Honey. A comprehensive survey. London, UK: Heinemann.
- Wille A. (1979) Las abejas jicotes del genero Melipona (Apidae, Meliponinae) de Costa Rica. Revista de Biología Tropical; 24, 123 147.
- Woisky, R. y Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apiculture Research 37: 99-10