



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis



Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”

**PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
MIELES DE POTE DE MELIPONINI PROVENIENTES DEL SUR DE
ECUADOR**

www.bdigital.ula.ve
(Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de
Licenciada en Bioanálisis)

Autor

Neira K. López C.
C.I. V- 19.813.238

Tutor (a)

Dra. Elizabeth Pérez

Mérida, Octubre de 2019.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo dedico a Dios, quien supo guiarme por el buen camino, quien con su luz ha iluminado mis conocimientos, me ha brinda paz, alegría y bendiciones.

A mi madre que ha sido un pilar fundamental en mi formación personal y profesional, por brindarme la confianza, consejos, oportunidades y recursos económicos para lograrlo.

A mi hijo Andrés por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más.

A mis hermanos Cosme y Miguel Ángel esperando que este logro los llene de mucho orgullo y satisfacción.

A Julián por sus palabras, confianza, por su amor y sobretodo su paciencia.

www.bdigital.ula.ve

Neira López

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por darme el don de la sabiduría y constancia e iluminar mis pasos para el logro de esta meta.

A mi madre Melida por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ti he logrado llegar hasta aquí. Es un orgullo y privilegio ser tu hija, siempre serás mi ejemplo a seguir.

A mi hijo Andrés porque su cariño, amor y manifestaciones de afecto, son una bendición de Dios, por ser quien libra mi mente de todas las adversidades y me impulsa para superarme.

A mis hermanos Cosme y Miguel Ángel por su apoyo, cariño y por estar en los momentos importantes de mi vida.

A Julián que con su amor, compañía y respaldo me ayudo a alcanzar mis objetivos.

A mi abuela Elide porque con sus oraciones y cariño siempre me motivo a culminar con éxito.

A mi familia Materna porque sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en mis sueños y metas. Agradezco muy especialmente a mis tías Karina, Eyilda y Mairee que desde pequeña me brindaron su confianza y amistad.

A mi abuelo Valeriano y mi tío José que desde donde estén, sé que siempre me acompañaron.

A mi tutora Elizabeth Pérez por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos y motivación ha conseguido que culmine con éxito este estudio.

A María José por su excelente contribución y apoyo.

A la Señora Yely y al Señor Argenis por su ayuda.

A Anleblek porque sin esperar nada a cambio compartió sus conocimientos, alegrías y tristezas.

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

VEREDICTO	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRAFICOS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
EL PROBLEMA	4
Planteamiento del problema.....	4
Justificación e importancia de la investigación	6
Objetivos de la Investigación.....	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
CAPÍTULO II.....	10
MARCO TEÓRICO	10
Trabajos previos	10
Antecedentes históricos.....	17
Bases Teóricas	18
Miel.....	18
Propiedades fisicoquímicas de la miel.....	18
Humedad.....	19
Carbohidratos.....	20
pH y acidez	20
Vitaminas y minerales.....	20
Enzimas	21
Actividad Antioxidante.....	22
Proteínas	23

Polifenoles.....	24
Flavonoides	24
Tribu Meliponini	25
Operacionalización de las Variables.....	25
Hipótesis de la investigación	27
CAPÍTULO III.....	28
MARCO METODOLÓGICO	28
Tipo de Investigación	28
Diseño de la Investigación.....	28
Población y Muestra	28
Unidad de Investigación.....	29
Procedimientos de la Investigación.....	30
Preparación de las muestras de miel	30
Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo	31
Método de la actividad antioxidante (AOA)	32
Método del catión radical ABTS ^{•+} : Ensayo de Decoloración en solución etanólica	34
Método de la determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos	35
Método para la determinación de la concentración de proteínas	35
Determinación del contenido de flavonoides: Método colorimétrico del cloruro de aluminio	36
Diseño de Análisis	37
CAPITULO IV	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Resultados.....	38
Propiedades fisicoquímicas de las mieles analizadas	39
Discusión.....	54
CAPÍTULO V	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
Conclusiones.....	63
Recomendaciones.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de una muestra de miel.	18
Tabla 2. Operacionalización del evento de estudio.....	26
Tabla 3. Muestras de miel a ser analizadas en este estudio.....	29
Tabla 4. Volúmenes que se utilizaron para el método del AOA.	33
Tabla 5. Volúmenes de reactivos que se usaron para la curva de calibración en la determinación de proteínas.	36
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las mieles analizadas.....	39
Tabla 7. Actividad antioxidante de las mieles analizadas	49
Tabla 8. Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.	54

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dispersión general de la concentración de flavonoides entre las muestras de miel provenientes del sur de Ecuador.	42
Gráfico 2. Distribución de valores medios de las concentraciones de flavonoides en las mieles provenientes de las provincias del sur de Ecuador.....	43
Gráfico 3. Dispersión general de las concentraciones de polifenoles entre las muestras de miel provenientes del sur de Ecuador.....	44
Gráfico 4. Distribución de valor medio de la concentración de los polifenoles recolectados de las mieles provenientes de las provincias del sur de Ecuador.....	45
Gráfico 5. Dispersión general de la concentración de proteínas entre las muestras de miel provenientes del sur de Ecuador.	46
Gráfico 6. Distribución de valor medio de la concentración de proteínas determinadas entre las mieles provenientes de las provincias del sur de Ecuador.	47
Gráfico 7. Distribución de la concentración de las propiedades fisicoquímicas de las mieles provenientes del Sur de Ecuador.....	48
Gráfico 8. Distribución de la concentración de AOA en las mieles provenientes del sur de Ecuador.	51
Gráfico 9. Distribución de los porcentajes de inhibición del radical hidroxilo en las mieles provenientes del sur de Ecuador.	52
Gráfico 10. Distribución de la CAT en las mieles provenientes del sur de Ecuador.....	53



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis



Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES DE POTE DE MELIPONINI PROVENIENTES DEL SUR DE ECUADOR

Autor

Neira K. López C.

Tutor (a)

Dra. Elizabeth Pérez

RESUMEN

Se ha encontrado un contenido antioxidante significativo en las muestras de miel, antioxidantes que actúan suministrando el electrón libre necesario para completar la capa electrónica externa de un radical libre, lo que es de gran relevancia ya que la producción descontrolada de radicales libres se han relacionado con una serie de enfermedades crónicas que afectan al hombre. Es por lo antes mencionado que el objetivo de este trabajo de investigación es determinar la actividad antioxidante de mieles de Meliponini de Ecuador, y correlacionarla con el contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas. Para ello, se analizaron 31 muestras de mieles de pote de *Meliponini* que fueron recolectadas en el Sur de Ecuador en el año 2014, a las cuales se les determinó la cantidad de proteínas, polifenoles y flavonoides, además de la actividad antioxidante a través de 3 métodos. Los flavonoides oscilaron entre 5,54 y 232,78 mg equivalentes de quercetina/100g de miel, los polifenoles entre 569,14 y 2001,63mg equivalentes ácido gálico/100g, y las proteínas entre 21,38 y 266,84 mg de proteína/100 g de miel. En cuanto a la capacidad antioxidante, los valores de AOA se encontraron entre 0,99 y 1,23 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo entre 18,74 y 91,06% de inhibición/100 g, mientras que el valor de AAT estuvo entre 123,9 y 351,1 μ moles equivalentes de Trolox/100 g de miel. Los resultados de correlación de actividad antioxidante y contenido de polifenoles concuerdan con el paradigma que establece que la capacidad antioxidante está positivamente correlacionada con la concentración de polifenoles. Estos resultados valorizan la miel de pote de Meliponini como un alimento funcional, pudiendo considerar a la actividad antioxidante y composición química como indicadores de control de calidad de la miel.

Palabras clave: Miel, Actividad Antioxidante, Meliponini, polifenoles, flavonoides y proteína, AOA, AAT, radical hidroxilo.



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis



Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES DE POTE DE MELIPONINI PROVENIENTES DEL SUR DE ECUADOR

Autor

Neira K. Lopez C.

Tutor (a)

Dra. Elizabeth Pérez

ABSTRACT

Significant antioxidant content has been found in the samples of honey, antioxidants that act by supplying the free electron necessary to complete the external electronic capacity of a free radical, which is of great relevance since the uncontrolled production of free radicals has been related to a series of chronic diseases that affect man. It is for the above mentioned that the objective of this research work is to determine the antioxidant activity of Meliponini honeys from Ecuador, and correlate it with the content of polyphenols, flavonoids and / or proteins. For this, 31 samples of Meliponini pot honeys that were collected in Southern Ecuador in 2014 were analyzed, which were determined the amount of proteins, polyphenols and flavonoids, in addition to the antioxidant activity through 3 Methods Flavonoids ranged between 5.54 and 232.78 mg equivalent of quercetin / 100g of honey, polyphenols between 569.14 and 2001.63mg equivalent of gallic acid / 100g, and proteins between 21.38 and 266.84 mg / 100 g of honey. Regarding antioxidant capacity, AOA values were found between 0.99 and 1.23 mM equivalent of uric acid / 100 g of honey, the percentage of hydroxyl radical inhibition between 18.74 and 91.06% inhibition / 100 g, while the AAT value was between 123.9 and 351.1 μ moles equivalent of Trolox / 100 g of honey. The results of the correlation of antioxidant activity and polyphenol content are consistent with the paradigm that establishes that antioxidant capacity is positively correlated with the concentration of polyphenols. These results value Meliponini pot honey as a functional food, considering antioxidant activity and chemical composition as indicators of honey quality control.

Keywords: Honey, Antioxidant Activity, Meliponini, polyphenols, flavonoids and protein, AOA, AAT, radical hydroxyl.

INTRODUCCIÓN

La miel es la sustancia sin fermentar producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de la exudación de otras partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas, almacenan y maduran en panales (COVENIN, 1984).

Las abejas elaboran la miel a través de materias primas azucaradas disponibles en su medio ambiente, las cuales pueden ser naturales o procesadas; desde luego que el origen de una miel genuina se asocia con jugos azucarados que provienen de fuentes vegetales o animales presentes en la naturaleza, las cuales básicamente son el néctar y la mielada (Loirish, 1985).

Se puede decir que el néctar es un líquido azucarado secretado por glándulas vegetales conocidas como nectario, que pueden ser florales o extraflorales dependiendo de su ubicación en la planta (Piccirillo y col., 1998). Por su parte, la mielada también es una secreción dulce, que en oposición al néctar, es de origen animal y es producida por insectos pertenecientes al orden *Rhynchota*, los cuales extraen la savia directamente del floema (Vit, 1993).

Se ha reportado que néctar de las flores y la mielada producida por los insectos contienen polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos que participan en el sistema antioxidante de la miel (Pérez y col., 2006). Así mismo, la miel contiene una diversidad de compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos, y aminos), carotenoides y vitamina C, que son ampliamente conocidos por su capacidad antioxidante (Larzon, 1998). Es por esto que a la miel se le ha atribuido una considerable capacidad antioxidante, lo cual es un hecho muy importante para la salud humana (Frankel y col., 1998).

Si bien el oxígeno es imprescindible para la vida celular, también genera moléculas reactivas conocidas como radicales libres, las cuales pueden alterar la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas, además puede ocasionar la oxidación de los lípidos. Con la edad los radicales libres pueden producir numerosas complicaciones biológicas relacionadas con el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas como mutaciones genéticas, carcinogénesis, Alzheimer, aterosclerosis y cataratas, entre otras. Es por lo antes mencionado que es de suma importancia encontrar alimentos que contengan compuestos con alta capacidad antioxidante, es decir, alimentos funcionales o nutracéuticos; alimentos o compuestos químicos individuales, presentes en alimentos poseedores de un efecto beneficioso en la salud humana (Tiskow, 1996).

El término antioxidante se usa para describir a cualquier sustancia o compuesto que impide la oxidación de otras sustancias químicas que han sido ocasionadas por reacciones metabólicas; en resumen, los antioxidantes aportan el electrón necesario para completar la capa electrónica externa del radical libre (Gutiérrez y col., 2008). Entre los antioxidantes se encuentra un grupo muy variado de sustancias tales como vitaminas, minerales, pigmentos naturales, enzimas, coenzimas y otros compuestos, que bloquean los efectos dañinos de los radicales libres. Es por todo lo antes mencionado que resulta de suma importancia el estudio de la capacidad antioxidante de los alimentos (Rafecas, 2006).

Es importante destacar que la actividad antioxidante de los alimentos de origen vegetal se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente a flavonoides. Sin embargo, hay autores que expresan que la capacidad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de las propiedades quelantes contra el hierro y captadoras de radicales; mientras que otros autores incluyen la inhibición de oxidasas evitando la generación *in vivo* de especies reactivas del oxígeno (Russo, 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que los flavonoides inhiben a las enzimas involucradas en procesos oxidativos. De esta manera, se demuestra que los flavonoides obstaculizan la formación de los radicales libres (Ciappini y col., 2013).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Se ha demostrado que la miel no es usada sólo como un edulcorante, sino que también es empleada en apiterapia o medicina tradicional para prevenir o curar enfermedades (Vit y col., 2004). Desde hace mucho tiempo se conocen las propiedades antibacterianas de la miel, pero se había perdido el interés en esta importante actividad con la implementación de los antibióticos. No fue sino hasta la aparición de cepas de bacterias multiresistentes que se recuperó el interés en la miel como medicina (Manrique, 1995). Varios estudios han reportado el efecto de la miel para impedir la propagación de aproximadamente 60 especies diferentes de bacterias patógenas, incluyendo Gram positivas y Gram negativas. Se le atribuye esta actividad a los diferentes niveles de peróxido de hidrógeno y de elementos no peróxidos presentes en la miel (Estrada y col., 2005).

Además de gozar de actividad antimicrobiana, la miel demuestra una importante actividad antiinflamatoria, previniendo la formación de exudados serosos que pueden ser colonizados por bacterias, y con la estimulación del crecimiento y reparación de tejidos. Asimismo, estimula la proliferación de los linfocitos y fagocitos, activando así la respuesta inmunitaria ante la infección (French y col., 2005). La eficiente actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de miel deja en claro su gran utilidad en la clínica dermatológica (Zamora y col., 2011).

Lusby (2005) reporta la propiedad antifúngica de la miel contra algunas levaduras y especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, y también contra dermatofitos comunes. Por otra parte, Montenegro (2009) comprobó la actividad antifúngica de la miel contra la levadura *Candida albicans*.

Es importante destacar que la miel contiene cantidades importantes de polifenoles y flavonoides, compuestos a los que debe su bioactividad, entre ellas la actividad antioxidante (Alvarado y col., 2014). Muchos autores han demostrado que la miel sirve como fuente natural de antioxidantes, y al ser consumida, puede mejorar las defensas contra el estrés oxidativo (Montenegro y col., 2013). Por esta gran característica ha llegado a ser comparada incluso con la capacidad antioxidante del ácido úrico, un poderoso antioxidante en los seres vivos (Pérez y col., 2006). Los compuestos fenólicos, como los flavonoides y los ácidos aromáticos contenidos en la plantas, son considerados como los responsables del efecto antioxidante de la miel (Burda y Oleszek, 2001).

En tal sentido, la miel por su origen vegetal contiene flavonoides muy diversos. Eventualmente los flavonoides actúan como activadores moleculares, por lo cual una pequeña dosis funciona como precursor de una respuesta metabólica. Se ha demostrado que algunos flavonoides activan el óxido nítrico sintetasa, la cual actúa como un protector cardiovascular. De esta manera, el cuerpo reconoce a los flavonoides como desechos, activando así mecanismos de limpieza que lo protegen contra enfermedades cardiovasculares y tumorales. Es por esta razón que las bajas concentraciones de flavonoides presentes en la miel de abejas, lograrían ser significativos para activar mecanismos antioxidantes (Gutiérrez y col., 2008).

Así mismo, la ingestión de una dieta rica en polifenoles parece guardar relación con una mejor salud. Se ha observado que la ingesta de polifenoles estaba positivamente relacionada con la disminución de la mortalidad por problemas cardiovasculares, ya que se registró un 60% menos de mortalidad en la población que consumían mayor cantidad de polifenoles en su dieta (Hertog y col., 1993).

El estudio de la actividad antioxidante, además de valorizar la miel como alimento, puede servir como una manera de detectar fraudes en los productos de la colmena (Frankel y col., 1998). En este sentido, Principal y col. (2012) manifiestan que las características de la miel varían según su origen botánico y geográfico, y con las condiciones biológicas y físicas del lugar de origen.

Zamora y col, (2011) explican que existen dos grandes géneros de abejas que producen miel, las muy conocidas *Apis mellifera*, cuya miel es ampliamente conocida y comercializada a nivel mundial; y las abejas pertenecientes a la tribu *Meliponini*, siendo la composición de la miel de estas dos tribus diferentes en lo que se refiere a la cantidad y tipo de sustancias antioxidantes presentes.

Justificación e importancia de la investigación

La miel de abeja constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre ha aprovechado para nutrirse. Su composición es compleja y los carbohidratos representan la mayor proporción, dentro de los que destacan la fructosa y glucosa; pero además contiene una gran variedad de sustancias menores como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales (Ulloa y col., 2010). La composición de la miel es variable, debido al diverso origen geográfico y botánico del néctar recolectado por las abejas para su elaboración, dando lugar a diferentes tipos de miel debido a que adquieren diferentes características organolépticas, como son color, aroma, sabor, consistencia y la mayor o menor facilidad para cristalizar durante el manejo y almacenamiento. Asimismo, los diferentes tipos de miel difieren, en su composición química, principalmente pH, acidez, contenido y proporción de carbohidratos, ácidos orgánicos, minerales, compuestos nitrogenados (Matéu, 1993).

La apicultura es una industria artesanal que no se la ha considerado tan seriamente en Ecuador, ya que no se ha establecido formalmente un riguroso control en los procesos de producción y comercialización de la miel de abeja, dando como resultado el constante abandono de algunas empresas apicultoras que se han fundado a través de los años en el país. Apenas hay un estudio de composición de mieles de pote ecuatorianas en una tesis de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador del año 1989 (Chieruzzi Löwenstein, 1989). Su composición ha sido estudiada también en Venezuela (Vit, 1997), Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008), Colombia (Fuenmayor y col, 2012), Bolivia (Ferrufino y Vit, 2013) y Brasil (Almeida 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 otras partes del mundo, ya que la miel tiene numerosos usos medicinales (Vit y col., 2004).

Estudios realizados a mieles europeas han demostrado que éstas contienen compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran los flavonoides. Se sabe que los compuestos fenólicos tienen gran actividad antioxidantes, en especial los flavonoides por lo que son de gran importancia para la salud humana, ya que tienen efecto contra algunas enfermedades degenerativas, haciendo que se caracterización sea primordial para determinar el poder antioxidante de las mieles. Por otra parte, el conocimiento de los flavonoides y el contenido de estos en la miel podrían ser importantes para la determinación de su origen floral, así como su calidad biológica (Ferrerres y col., 1991). En la actualidad es escasa la información de la cual se dispone con relación a los compuestos fenólicos, proteicos y la actividad antioxidante de las mieles de Ecuador, es por ello que en este trabajo de investigación se realizaron los estudios pertinentes para obtener dicha información y darle un valor agregado a las mieles del Sur de Ecuador.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Determinar las propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante de mieles de pote de *Meliponini* provenientes del Sur de Ecuador.

Objetivos específicos

1. Determinar la cantidad de polifenoles, flavonoides y proteínas en las muestras de miel estudiadas.
2. Determinar la actividad antioxidante por medio de los métodos de actividad antioxidante total (AAT), AOA (ácido úrico) y porcentaje de inhibición del radical hidroxilo.
3. Correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de fenoles, flavonoides y/o proteínas de las muestras de miel.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

En la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante por medio de tres técnicas diferentes: actividad antioxidante (AOA), AAT usando como patrón de comparación el Trolox, y el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo; cada una de las técnicas empleadas ayuda dilucidar efectos antioxidantes diferentes, que además permitieron correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de fenoles, flavonoides y proteínas. Uno de los aportes más importantes que se generan a partir de este estudio es la contribución a la valorización de las mieles de pote de Ecuador, de las cuales no existe información disponible en la literatura, siendo la base para futuras

investigaciones que se realicen con mieles de Ecuador y de otras partes del mundo, cuyo objetivo principal sea la evaluación de las propiedades nutracéuticas de la miel de Meliponini. Además, contribuyó a afianzar la posibilidad de usar la actividad antioxidante y/o propiedades fisicoquímicas como indicadores de calidad y autenticidad de muestras de miel.

Limitaciones de la Investigación

Una de las limitaciones a las que se enfrentó la presente investigación fue el escaso recurso bibliográfico con la relación a los compuestos fenólicos, flavonoides, proteicos y la actividad antioxidante de las mieles de Ecuador. Igualmente, la falta de recursos económicos, lo que dificulta poder realizar una investigación más completa, con pruebas complementarias que ayuden a poner en evidencia la naturaleza de los compuestos fenólicos presentes en estas muestras de miel.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Es bien sabido que los polifenoles, flavonoides y proteínas participan en el sistema 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. El estudio de la actividad antioxidante, además de posicionar a la miel como un nutracéutico (un alimento que proporciona beneficios para la salud), puede servir en un futuro muy cercano como un parámetro para detectar fraudes en los productos de la colmena. Además, son muchos los reportes acerca de la actividad antioxidante de la miel producida por *A. mellifera*, mieles que son ampliamente comercializadas a nivel mundial; pero pocos son los reportes de la actividad antioxidante de la miel producida por abejas sin aguijón. Es por lo antes mencionado, que a continuación se presentan los trabajos más relevantes en este sentido.

En lo que se refiere a la actividad antioxidante de la miel, Muñoz y col. (2007) determinaron la contribución relativa de los polifenoles y flavonoides a la actividad antioxidante total de 20 muestras de miel producidas en diversas zonas de Chile, además de establecer el índice antioxidante de las mismas. Lograron establecer una correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos y su capacidad de absorción de radical oxígeno (ORAC). Por otra parte, identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos presentes en las muestras de miel, logrando detectar flavonoides como pinocembrina, pinobanksina, quercitina, kaempferol, crisina, galangina y otras dos flavononas no identificadas; todos estos flavonoides también han sido detectados en las mieles actualmente comercializadas. Adicionalmente, se identificaron el éter de 3 metilkaempferol, luteolina, éter de 7

metilluteolina, éter de 3 metil-quercetina e isorramnetina, todos ellos son flavonoides característicos también de propóleos y varios de ellos son compuestos típicos de los exudados de las yemas de álamo, aunque como componentes minoritarios. Por último, correlacionaron la cantidad de compuestos fenólicos con la actividad antioxidante, encontrando un coeficiente de correlación bajo ($R^2=0,003$), posiblemente porque la muestra de miel utilizada para el ensayo ORAC no fue fraccionada. En conclusión, los autores proponen que los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides de las mieles chilenas analizadas en este estudio son relativamente altos con respecto a otras mieles, pero su valor relativo es bajo como para tener significación biológica antioxidante individual importante.

En otro trabajo relacionado con la actividad antioxidante de la miel producida por abejas sin aguijón, Rodríguez y col. (2007) evaluaron la actividad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis mellifera*, *Melipona favosa* y *Tetragonisca angustula*, en comparación con una miel artificial, por medio de tres métodos: capacidad inhibitoria de la miel diluida en la formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y del radical hidroxilo (OH^{\bullet}), y la degradación del benzoato, conocida como actividad antioxidante total (AAT). Los resultados obtenidos se compararon con la capacidad antioxidante de soluciones de ácido lipoico, melatonina y quercetina comerciales. Los autores encontraron que los porcentajes de inhibición de las mieles genuinas diluidas variaron desde 69,06 a 80,22% para el anión superóxido, siendo más bajo en la miel artificial con 33,44%. Todas las muestras de miel genuina resultaron ser mejores inhibidores del anión superóxido que el ácido lipoico (27,87%), melatonina (53,84%) y quercetina (53,23%). Por su parte, los porcentajes de inhibición del radical del hidroxilo fueron más altos que los del ácido lipoico para todas las muestras de miel, incluyendo la miel artificial, con variaciones desde 35,92 a 77,77%. Mientras que los porcentajes de inhibición de la formación del radical hidroxilo y anión superóxido fueron similares a los encontrados para la melatonina. En lo que se refiere a la AAT,

las muestras de miel genuina mostraron mayores valores de AAT que las soluciones de melatonina y quercetina. Los autores concluyeron que todas las mieles analizadas presentaron actividad antioxidante, siendo la miel artificial la que presentó la menor actividad antioxidante que las mieles genuinas, en valores medios altos según el método utilizado. Este estudio constituye un claro ejemplo del valor de la determinación de la capacidad antioxidante como criterio para diferenciar entre mieles genuinas y mieles consideradas como fraude.

Por otra parte, Vattuone y col. (2007) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides, prolina y capacidad captadora de radicales libres de 14 muestras de miel de *Tetragonisca angustula* (Fiebrigi) y 15 de *Plebeia wittmanni*, obtenidas de colmenas silvestres ubicadas en distintas regiones de Argentina. Los resultados obtenidos por los autores indicaron que 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; mientras que el de flavonoides estuvo entre 1,2-2,0 y 0,8-1,4mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, la prolina osciló entre 371-394 y 296-307 mg/kg de miel para *T. angustula fiebrigi* y *P. wittmanni*, respectivamente. Los autores observaron diferencias significativas en los contenidos de compuestos fenólicos en las muestras de miel obtenidas de *T. angustula* (Fiebrigi) ($43,1 \pm 2,2$) respecto a las de *P. wittmanni* ($30,5 \pm 2,1$). 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, compuestos fenólicos y los valores de IC50 (concentración de miel o de sustancia activa que produce el 50% de inhibición de la capacidad depuradora de radicales libres) para *T. angustula* (Fiebrigi) ($R^2 \geq 0,98$) y para *P. wittmanni* ($R^2 \geq 0,95$). Los autores concluyen que los componentes de las mieles, entre los que se cuentan los referidos a su actividad antioxidante, fundamentan su empleo en

el área de la medicina y contribuyen a validar su uso como alimento funcional o nutracéutico.

En otro trabajo más reciente, Vit y col. (2008) evaluaron la actividad antioxidante total (AAT) de 50 mieles de origen botánico conocido (floral, mielada, mixto), enviadas al servicio de Análisis Químico del Instituto de Investigaciones Apícolas en Dol, República Checa, por medio del método del radical libre ABTS^{•+}, de modo de poder sugerir cuáles factores podrían causar variaciones de la actividad antioxidante total de la miel de abejas y categorizar las mieles según su valor de actividad antioxidante total. Todas las mieles analizadas presentaron valores de AAT, los cuales variaron 43,55 y 290,35 μ moles equivalentes Trolox/100g miel; sin embargo, no hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las actividades antioxidantes totales de mieles florales, de mielada y mixtas. Los autores sugieren una clasificación de las mieles en tres grupos de actividad antioxidante total en rangos de 100 μ moles equivalentes Trolox para las siguientes categorías: actividad antioxidante total baja, actividad antioxidante total media y actividad antioxidante total alta. Por otra parte, el contenido de flavonoides fue mayor en las mieles de mielada que en las mieles mixtas, y las mieles florales resultaron con valores intermedios. Además, observaron que las diferencias entre el contenido de polifenoles de los tres grupos de mieles no fueron estadísticamente significativas. Los coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante de las mieles y su contenido de flavonoides ($R^2=0,649$), su contenido de polifenoles ($R^2=0,619$) y su color ($R^2=0,462$) fueron significativos ($p=0,01$). Por último, los valores promedio de AAT presentaron un amplio rango de variación dentro de cada grupo de miel: floral (60,12–287,55), mielada (53,71–280,04) y mixta (43,55–290,35); no obstante, según el análisis estadístico realizado no existen diferencias significativas en la actividad antioxidante total según el origen botánico. El color de las mieles varió entre 22 y 120 mm Pfund, el contenido de flavonoides varió entre 1,90 y 15,74 mg EQ/100 g miel, y el contenido de

polifenoles varió entre 47,39 y 265,49 mg EAG/100 g miel. Estos tres parámetros se correlacionaron positivamente con los valores de actividad antioxidante de la miel.

En el mismo año 2008, Álvarez y col. determinaron la capacidad antioxidante de 22 muestras de miel provenientes del Delta Medio y Bajo Delta del río Paraná (Rosario, Santa Fe, Argentina), por medio del método de decoloración del β -caroteno-ácido linoleico. Los autores reportaron valores de actividad antioxidante entre 83,3 y 101,6 mg de TE/100 mg miel, con un valor medio de $93,2 \pm 6,0$ mg TE/100 mg miel. Además, los autores resaltan que el método es muy útil para evaluar la actividad antioxidante de las muestras de miel, pero que el procedimiento requiere extremos cuidados en la preparación de la emulsión de β -caroteno-ácido linoleico, que es muy sensible a la oxidación y que puede decolorarse durante la evaporación del cloroformo, por lo que la oxidación del β -caroteno inducida térmicamente es bastante inespecífica y produce la isomerización de los carotenoides en la primera etapa, generando así productos con diferentes reactividades, que resultan difíciles de controlar y que pueden incidir en la absorbancia de la solución final. Es por ello que proponen que al momento de estudiar la actividad antioxidante de cualquier muestra de origen vegetal se utilicen varios métodos que permitan confirmar la verdadera efectividad del compuesto en estudio como antioxidante.

En el trabajo realizado por Persano y col. (2008) se llevó a cabo la caracterización de la miel producida por *Trigona carbonaria* (Tribu Meliponini) de Australia, por medio de la determinación de parámetros fisicoquímicos tradicionales (acidez, humedad, conductividad eléctrica, contenido de nitrógeno, entre otros), pero también por medio de la determinación del contenido de polifenoles y flavonoides y de su capacidad antioxidante. En cuanto a los parámetros tradicionales, la miel de *T. carbonaria* fue similar a aquellos reportados para las mieles de abejas sin aguijón netropicales, pero si significativamente diferentes a los de la miel producida por *A. mellifera*. En

lo que compete a esta investigación, el contenido de flavonoides fue de $10,02 \pm 1,59$ mg de equivalente de quercetina/100 g de miel, y el de polifenoles fue de $55,74 \pm 6,11$ mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de miel. La actividad antioxidante, expresada como el porcentaje de decoloración del catión radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}), fue de $233,96 \pm 50,95$ μ miliequivalentes de Trolox; mientras que si la expresada como disminución del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) fue de $48,03 \pm 12,58$ equivalente de ácido ascórbico. Los autores concluyen que la actividad antioxidante puede representar un importante valor agregado para la miel de *T. carbonaria*, lo que permite iniciar un ensayo clínico para evaluar las aplicaciones nutricionales y farmacéuticas, además de la tradicional caracterización fisicoquímica.

Así mismo, en un trabajo de investigación publicado por Rodríguez-Malaver y col. en el año 2009, se evaluó la actividad antioxidante y antibacteriana de la miel producida por diez especies de abejas sin aguijón (*M. crinita*, *M. eburnea*, *M. grandis*, *M. illota*, *Nannotrigona melanocera*, *Partamona epiphytophila*, *Ptilotrigonalurida*, *Scaptotrigona polystica*, *Scaura latitarsis*, y *T. angustula*) provenientes de Perú, y se compararon con una muestra de miel producida por *A. mellifera* y una miel artificial. El contenido de flavonoides varió de 2,6 a 31,0 mg de quercetina/100 g de miel; mientras que el de polifenoles estuvo entre 99,7 a 464,9 mg equivalente de ácido gálico/100 g de miel. La actividad antioxidante se ubicó entre 93,8 y 569,6 micromoles de Trolox/100 g de miel. La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue ligeramente menor para *Staphylococcus aureus* (12,5-50 g/100 mL) que para *Escherichia coli* (50 g/100 mL). Se observó una fuerte correlación positiva entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante medida por medio del método del catión radical ABTS.

En un mismo enfoque, en el trabajo realizado por Fernández y col. (2012) se evaluó la actividad antioxidante de muestras de miel de abejas

africanizadas y sin aguijón de diferentes fuentes entomológicas, que se recogieron en la estación seca (comprendida entre 2008 y 2009), de distintas mesorregiones del Estado de Alagoas, al noreste de Brasil. Los autores concluyen que la miel producida por cinco especies distintas de abejas, incluso de la misma región y temporada, mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el contenido de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante, siendo las muestras de miel que presentaron los mayores niveles de estos compuestos las producidas por *Plebeia sp* y *A. mellifera*. La miel de las abejas sin aguijón fue muy diferente de la de *A. mellifera*, especialmente de las especies de *Plebeia*. Un dendrograma de las cinco especies de abejas mostró la formación de tres grupos, uno de ellos formado por *A. mellifera*, uno por el género *Melipona* (*M. subnitida*, *M. quadrifasciata* y *M. scutellaris*), y otro formado por *Plebeia sp*.

Más recientemente, da Silva y col. (2013) estudiaron muestras de miel producidas por *Melipona seminigra merrill* recolectadas en siete estados distribuidos en las regiones central y sur del Amazonas de Brasil. Los autores determinaron origen botánico, contenido y perfil de polifenoles, y actividad antioxidante y antimicrobiana. Los autores identificaron 22 tipos de muestras de polen. En lo que se refiere al contenido de polifenoles, el mismo se encontró entre 17 a 66 mg EAG/g de extracto; y los mayores contenidos fueron encontrados en mieles producidas a partir de polen de *Clidemia* y *Mycrria*. La actividad antioxidante fue mayor para aquellas muestras que presentaron los mayores valores de contenido de polifenoles. En lo que se refiere a la actividad antimicrobiana, las muestras CAD3, CAD4 y SAD3 presentaron los mejores resultados. Por último, se lograron determinar 14 compuestos fenólicos diferentes, entre los que figuraba el flavonoide taxifolin, el cual no había sido reportado previamente para mieles de abejas sin aguijón. Además, los autores reportaron la identificación de catecol por primera vez para las muestras de miel brasileras.

Antecedentes históricos

La miel es uno de los artículos comestibles más antiguos, incluso se conoce mucho antes de la época de Tukankamón, en la que fue usada como vehículo medicinal (Contreras, 2013). Así mismo, en los frisos o esquelas de las tumbas del Reino Medio (2050 al 1750 a. de C.) se menciona con gran frecuencia a la miel de abejas en los túmulos funerarios del Imperio Nuevo. Según como expresara el naturalista C. Berg en una conferencia científica Argentina en el año 1975, eran conocidas por los chinos unos dos mil años antes de Jesucristo. Por su parte, el historiador romano Plinio 'el Viejo' (23-79 a. de C.), en su obra maestra *Naturalis Historia*, hace una gran cantidad de citas sobre las abejas, la apicultura, la miel, sus propiedades medicinales y muchas aplicaciones prácticas (Vit, 2013).

Aristóteles decía que debía aplicarse la miel como unguento para heridas y dolor de ojos. Dioscórides describía que se usaba la miel para quemaduras de sol y manchas en la cara. Los egipcios, chinos y romanos combinaban la miel con otras hierbas para tratar heridas y enfermedades del intestino. En muchas partes de la biblia se hace mención a las capacidades de la miel. Así como también los judíos, hindúes y otros pueblos endulzaban sus alimentos con miel, y la utilizaban sola o asociada con otras sustancias para obtener productos medicinales (Contreras, 2013).

El hombre ha usado la miel desde la era Paleolítica como edulcorante natural, pero ésta además posee una notable actividad bioquímica que le confiere ciertas características dietéticas y terapéuticas especiales, las cuales han sido el atractivo para el estudio de su composición y sus capacidades (Vit, 2013). Su origen fue motivo de curiosidad para los antiguos, y en los siglos XVI y XVII se le recomendaba para aliviar casi todos los males: se le atribuían propiedades curativas, y la aplicaban desde tratamiento para la calvicie hasta para la eliminación de los gusanos

intestinales. En el siglo XX se realizaron grandes avances en el conocimiento científico de este producto, desde comprender su composición fisicoquímica, hasta determinar las bases químicas de las múltiples actividades atribuidas a misma, tales como actividad antibacteriana, antitumoral, antiviral, antioxidante, antiparasitaria, citotóxica, entre otras (Vit, 2013).

Bases Teóricas

Con la finalidad de consolidar y sustentar teóricamente la presente investigación, a continuación se presentan las teorías relacionadas con el planteamiento, enfoques de diversos autores y jerarquización de las palabras claves en relación a la capacidad antioxidante de las mieles comerciales provenientes del sur de Ecuador.

Miel

La miel, según la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación, es una sustancia elaborada por la abeja a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extraflorales. Las abejas liban, transportan (en el buche melario), transforman y almacenan en los panales. La miel es un producto muy complejo, cuya composición depende de numerosos factores como los tipos de abeja, las flores visitadas, la etiología o las técnicas apícolas empleadas, por lo que su composición puede presentar variaciones considerables (Vit, 1993).

Propiedades fisicoquímicas de la miel.

Las propiedades fisicoquímicas más importantes de la miel son las presentadas en la Tabla 1, las cuales se describen a continuación.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de una muestra de miel.

COMPONENTE	RANGO
Humedad	14–20 %
Carbohidratos (totales)	82–95 %
Fructosa	28–44 %
Glucosa	22–38 %
Sacarosa	0,2–5 %
Maltosa	2–16 %
Otros azúcares	0,1–8 %
Proteínas y aminoácidos	0,2–2 %
Grasas	0
Colesterol	0
Energía	304 Kcal
Vitaminas	
Tiamina	<0,0 mg
Riboflavina	<0,06 mg
Niacina	<0,36 mg
Ácido pantoténico	<0,11 mg
Piridoxina (B6)	<0,32 mg
Ácido ascórbico	2,2–2,4 mg
Minerales	
Calcio	4,4–9,2 mg
Cobre	0,003–0,1 mg
Hierro	0,06–1,5 mg
Magnesio	1,2–3,5 mg
Manganeso	0,02–0,4 mg
Fósforo	1,9–6,3 mg
Potasio	13,2–16,8 mg
Sodio	0–7,6 mg
Zinc	0,03–0,4 mg
Cenizas	0,2 – 1 %

Fuente: Vit, 1993; Norma Mexicana NMX-F-036-1997-NORMEX

Humedad

El contenido de agua de las mieles es una de las características más importantes porque determina su grado de conservación, usualmente una miel comercial posee entre 14% y 20% de humedad. En la miel la humedad puede aumentar durante su extracción y almacenamiento debido a sus

propiedades higroscópicas, ya que cuando el producto es almacenado a temperaturas bajas y en un ambiente húmedo, absorbe humedad, lo cual provoca su fermentación (Vit, 1993).

Carbohidratos

Son el principal componente de la miel, dentro de los cuales los azúcares primordiales son los monosacáridos fructosa y glucosa. Estos azúcares simples constituyen el 85% de sus sólidos. Los otros sólidos de la miel contienen al menos otros 25 azúcares complejos, pero algunos de ellos están presentes en niveles muy bajos (Ulloa, 2010).

pH y acidez

La acidez libre no debe superar los 40 miliequivalentes por kilogramo. Los valores promedio de pH normales para una miel se encuentran advertidos entre 3,0 y 4,5 debido a la presencia de ácidos orgánicos, principalmente el ácido glucónico (Vit, 1993).

Vitaminas y minerales

La concentración de vitaminas en la miel es muy baja, tanto así que se expresa en microgramos, encontrando vitaminas como la tiamina, piridina, ácidos ascórbico y riboflavina (Vit, 1993). El contenido mineral de la miel es variable, de 0,02 a 1,0%, y entre los minerales encontrados está el potasio que excede 10 veces al sodio, calcio y magnesio. Los minerales menos abundantes en la miel son hierro, manganeso, cobre, cloro, fósforo, azufre y sílice (Ulloa, 2010).

Enzimas

Las mieles son ricas en enzimas, una de las enzimas de mayor utilidad en la miel es la diastasa que tiene la facultad de escindir el almidón en glucosa (Vit y col., 2008). Sin embargo, la enzima más importante de la miel es la invertasa, que transforma la sacarosa en glucosa y fructosa (Vit, 1993). Las abejas añaden enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel, y éstas son en gran parte las responsables de la complejidad composicional de la miel (Ulloa, 2010).

Proteínas y aminoácidos

La miel contiene aproximadamente 0,5% de proteínas, especialmente como enzimas y aminoácidos. Cerca de 20 proteínas no enzimáticas se han reconocido en la miel, y entre 11 y 21 aminoácidos libres, entre los cuales se encuentran prolina, ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina (Ulloa, 2010).

Viscosidad

Se refiere a la resistencia que presenta un líquido a fluir (Vit, 1993). La miel en estado líquido suele ser muy viscosa, esto depende de su composición química, contenido de agua y temperatura. Una baja viscosidad en la miel puede ser un indicador de falsificación por adición de agua (Vit y col., 2008).

Componentes del aroma, sabor y olor

El color es la propiedad óptica de la miel que resulta de los grados de absorción de ciertos pigmentos y otras sustancias (Vit, 1993). Los azúcares son los principales componentes del sabor, habitualmente la miel con un alto contenido de fructosa es más dulce que una miel con una alta concentración de glucosa. Por su parte, el aroma de la miel depende en gran medida de la

cantidad de ácidos y aminoácidos. El color está relacionado con el contenido de minerales, polen y compuestos fenólicos. Las mieles oscuras tienen un alto contenido de fenoles, por ende, una alta capacidad antioxidante (Ulloa, 2010).

Actividad Antioxidante.

Se puede definir como la capacidad que tiene una sustancia para capturar o neutralizar radicales libres. Cuanto más efectiva es la captación del radical, mayor será la actividad antioxidante de dicha sustancia. Así mismo, se define como antioxidante a una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Mientras que un radical libre es cualquier especie (átomo, molécula o ion) que tenga un electrón desapareado en su orbital más externo (Galleano y col., 2010). Según Balsano y Alisi (2009), los antioxidantes son clasificados y definidos de la siguiente manera de acuerdo a su naturaleza estructural:

1. **Vitaminas**: son un antioxidante natural que reacciona con los radicales libres solubles en lípidos de la membrana celular. Cada molécula de vitamina es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos, y el más conocido es el ácido ascórbico.
2. **Beta-caroteno**: es el carotenoide más importante para la dieta humana, al ser ingerido es transformado en vitamina A, su función es eliminar los radicales libres y protege al ADN de su acción mutagénica, además neutraliza oxígeno singlete.
3. **Polifenoles**: como los flavonoides que son pigmentos vegetales no nitrogenados, al que se le atribuyen más de 5000 estructuras, su efecto antioxidante reside tanto en su capacidad para secuestrar radicales como en su capacidad para formar quelatos con metales.

4. **Otros compuestos:** como son los Glucosinolatos por ejemplo isotiosinatos y ciertos compuestos órgano-azufre (ejemplo dialil-disulfido).

Saavedra (2010) declara que, según el mecanismo de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en:

1. **Antioxidantes primarios:** previenen la formación de nuevos radicales libres, esto lo consiguen convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.
2. **Antioxidantes secundarios:** capturan los radicales evitando las reacciones en cadena, la mayoría de estos compuestos son diarilaminas y fenoles capaces de aceptar el electrón desapareado del radical libre y de estabilizarlo en su estructura, evitando así la propagación de la cadena radicalaria.
3. **Antioxidantes terciarios:** reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres, incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

Proteínas.

Son moléculas orgánicas que están compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y algunas de ellas azufre. Entre sus funciones está acelerar las reacciones bioquímicas, a las cuales se les denominan enzimas, y también ayudan en el transporte hacia el interior o exterior de la célula pasando ciertas sustancias químicas (Gerard, 2007). Su origen puede estar tanto en la abeja (enzimas) como en el vegetal (aminoácidos libres y otras proteínas). Las mieles que provengan de plantas con mucha cantidad de polen tendrán mayor porcentaje proteico, ya que el polen de las plantas está compuesto principalmente por proteínas (Bogdanov y col., 2008).

Polifenoles

Son compuestos orgánicos presentes en la naturaleza, que poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (Bogdanov y col., 2008). Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados. Las principales fuentes de polifenoles son bayas, té, cerveza, uvas/vino, aceite de oliva, chocolate/cacao, nueces, maníes, granadas, yerba mate, y otras frutas y vegetales (Gil, 2010; Maureen y Prieto, 1999).

La abeja obtiene estos compuestos del néctar y los propóleos (Anklam, 1998). Aunque sus niveles en miel son muy bajos, contribuyen en gran medida a las propiedades antioxidantes del producto (Bogdanov y col., 2008). Estos compuestos también son responsables de la coloración de las mieles, apareciendo habitualmente en mayor cantidad en las mieles oscuras (Estevinho y col., 2008). Los beneficios para la salud de polifenoles específicos como la quercetina son bien conocidos, sin embargo, para los demás hay menos resultados. En el cuerpo humano, estos compuestos fermentan activados por las bacterias que habitan en el sistema digestivo, creando metabolitos que pueden ser beneficiosos, por ejemplo, por su actividad antioxidante (Barberán, 2003).

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como rayos ultravioletas, polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias

químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Jimenez y col., 2009).

Tribu Meliponini

La tribu *Meliponini* pertenece al grupo de abejas corbiculadas de la subfamilia *Apinae*. Las diferentes especies colonizan nichos muy particulares y agrupan todas aquellas abejas conocidas como “abejas sin aguijón”, encontradas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Roubik, 1989). En el caso de las abejas sin aguijón (*Apidae: Meliponini*) suelen ocupar agujeros en los árboles, el suelo y las rocas; además, se han observado nidos en cavidades hechas por el hombre, incluyendo las tumbas de los cementerios (Roubik, 1989; Nates-Parra, 1996). Su tamaño varía desde aproximadamente 2 mm hasta 1,5 cm (Camargo y Roubik, 1991; Michener, 2000). Las abejas sin aguijón se caracterizan principalmente por tener aguijón reducido, alas con venación débil o reducida y ojos desnudos, además construyen nidos muy característicos para albergar su cría con entradas generalmente conspicuas, las cuales, en algunos casos, sirven para identificar especies (Roubik, 1982).

Operacionalización de las Variables

Variable Dependiente

La capacidad antioxidante, contenido de fenoles, polifenoles y flavonoides son las variables dependientes ya que es el resultado que depende del tratamiento experimental o de lo que el investigador analiza (Silva, 2006) (Tabla 2).

Variable Independiente

Las muestras de miel son las variables independientes que se manipulan en el proceso de un experimento con el propósito de entender sus efectos sobre la variable dependiente (Silva, 2006).

Variable Interviniente

La variable interviniente corresponde a los factores geográficos y condiciones del medio donde se recolectaron las mieles; ya que tienen influencia y efecto eventual sobre la variable independiente en su relación con la variable dependiente (Silva, 2006).

Tabla 2. Operacionalización del evento de estudio.

Evento de estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variable
Propiedades químicas de la miel de Meliponini	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
Actividad antioxidante de la miel de meliponini	El término antioxidante significa que impide la oxidación de otras sustancias químicas, ocasionada en las reacciones metabólicas o producidas por factores exógenos	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	-Radical Hidroxilo - Radical ABTs - AOA	Dependiente

	(Guisado y col., 2007)	ampliamente conocidos por su actividad antioxidante (Vit, 2008).		
--	------------------------	--	--	--

Hipótesis de la investigación

Hipótesis de trabajo

La actividad antioxidante de las mieles de pote de *Meliponini* del Sur Ecuador, recolectadas en el año 2014, se encontrará correlacionada con el contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La presente investigación es de tipo explicativa, ya que se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto (Arias, 2006). En este caso, se correlacionó la actividad antioxidante de la miel con el contenido de polifenoles, flavonoides y/o proteínas.

Diseño de la Investigación

Se trata de una investigación experimental explicativa, debido a que el objeto a estudiar (la miel) será sometido a unos determinados procedimientos para observar los efectos o reacciones que se produzcan (Silva, 2006).

Población y Muestra

La muestra, según Sabino (2006), es una parte de la población que sirve para representar el universo que se desea estudiar y las conclusiones que se obtengan se referirán a dicha población objeto de estudio. En el presente estudio, la población la constituyen 31 mieles de pote de la tribu *Meliponini* que provienen del Sur de Ecuador, las cuales fueron recolectadas en el año 2014. Las muestras de miel son las especificadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestras de miel a ser analizadas en este estudio.

No.	Contacto	Fecha recepción	Ciudad	Provincia	Nombre común
1	Ubertino Matamoro	12/06/14	Piedras Blancas	El Oro	Catiana
2	Ubertino Matamoro	12/06/14	Piedras Blancas	El Oro	Cananambo
3	María Beatriz Chase	25/06/14	FALSA	Morona Santiago	Abejas
4	María Beatriz Chase	26/06/14	FALSA	Morona Santiago	Abejas
5	Luis Castillo	27/06/14	Zapotillo	Loja	Abeja de tierra
6	Luis Castillo	28/06/14	Zapotillo	Loja	Abeja
7	Alfredo Narváez	05/07/14	El Trapiche	Loja	Catiana
8	Nerbo Romero	05/07/14	Piñas	El Oro	Catiana
9	Oswaldo Ajila	05/07/14	Moromoro	El Oro	Catiana
10	Oswaldo Ajila	05/07/14	Moromoro	El Oro	Catiana
11	Francisco Matairo	18/07/14	Zapotillo	El Oro	Abeja de tierra
12	Oswaldo Ajila	18/07/14	Moromoro	El Oro	Catiana
13	Guillermo Feijóo	13/07/14	Moromoro	El Oro	Catiana
14	José Ramírez	27/07/14	Pindal	Loja	Bermejo
15	José Ramírez	27/07/14	Loja	Loja	Abejas
16	Segundo Lapo	01/08/14	Chiriboga	El Oro	Catiana
17	Luis Castillo	09/08/14	Zapotillo	Loja	Abeja de tierra
18	José Zúñiga	15/08/14	La Moquillada	El Oro	Bermejo
19	José Zúñiga	15/08/14	La Moquillada	El Oro	Catiana
20	Rodrigo García	15/08/14	Quinta Chica	Azuay	Abeja de tierra
21	Oswaldo Ajila	17/09/14	Moromoro	El Oro	Catiana
22	Manuel Aguilar	17/09/14	Calera Chica	El Oro	Catiana
23	Wilmer y Jerson Vásquez	17/09/14	Juan XXIII	El Oro	Catiana
24	Carlos Galarza	02/10/14	San Roque	El Oro	Catiana
25	Artemio Aguilar	02/10/14	Ñalacapa	El Oro	Catiana
26	Angelino Abad	16/10/14	Olmedo	Loja	Abeja
27	César Quishpe	17/10/14	Mombaiza	Morona Santiago	Abeja
28	Ana Matrín	30/10/14	Cochas	Loja	Abeja de tierra
29	Elba Granda	31/10/14	Alamor	Loja	Catiana
30	Elba Granda	31/10/14	Alamor	Loja	Abeja de tierra
31	Elba Granda	31/10/14	Alamor	Loja	Bermejo

Fuente: Propia, 2014

Unidad de Investigación

La unidad de investigación está conformada por 31 mieles de pote adquiridas de diferentes provincias del Sur de Ecuador y pertenecientes al género de abeja *Meliponini*.

Procedimientos de la Investigación

El procedimiento a seguir en esta investigación fue:

1. Consultar información relacionada propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante de la miel y su correlación con los polifenoles, flavonoides y proteínas.
2. El diagnóstico del problema se formó en clave para la obtención de la información requerida por medio de diversos estudios asociados a las variables independientes objeto del estudio, los cuales se establecieron los siguientes: preparación de las muestras de miel, determinación del contenido de flavonoides (Método colorimétrico del cloruro de aluminio), determinación de la concentración de grupos Fenólicos, determinación de la concentración de proteínas, estudio de la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo, Método de la Actividad Antioxidante (AOA) y Método del ABTS (ensayo de decoloración en solución etanólica)
3. Concluido el análisis de las muestras, se procedió a convertir los resultados en valores numéricos y datos estadísticos, para finalmente entrar en la fase de discusión, conclusiones y recomendaciones.

Preparación de las muestras de miel

A cada tubo eppendorf que contenía $0,10 \pm 0,01$ g de miel se le adicionó 1 mL de etanol al 95% v/v. Se agitó en el vórtex hasta que se formó una mezcla homogénea; se centrifugó por 5 min a 10.000 rpm. Luego, se trasladó el sobrenadante a un tubo limpio, ya que es en este sobrenadante en donde se encuentran los compuestos polifenólicos y flavonoides.

Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo

Se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell y col. (1987), el cual se muestra en el Esquema 1. En este método el radical hidroxilo es generado por medio de la reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso oxida al peróxido de hidrogeno para formar la especie $\cdot\text{OH}$ (radical hidroxilo). En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa es fragmentada hasta Malondialdehido (MDA) que forma un complejo detectable a 532 nm con el ácido tiobarbiturico (TBA), las conocidas especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los radicales hidroxilos fueron generados por medio de la reacción de Fenton, la reacción entre iones ferrosos y H_2O_2 en presencia de EDTA y vitamina C, y el MDA determinado por medio del método del TBA. Para una mezcla que contenía 0,1 mL de desoxirribosa 28 mM, se agregaron 0,5 mL de buffer fosfato 40 Mm (pH 7,4), 0,1 mL de FeCl_3 1 Mm, 0,1 mL de EDTA 1,04 Mm, 0,1 mL de H_2O_2 1mM, y 0,1 mL de vitamina C 1 mM, además de 200 μL de cada una de las muestras analizadas. La mezcla se incubó durante 1 h a 37°C , se le agregaron 0,5 mL de TBA 1% en 0,05 M de NaOH y 0,5 mL de ácido tricloroacético 2,8%, y se dejó reaccionar durante 10 min a 100°C . Se leyó el cambio de absorbancia a 532 nm.

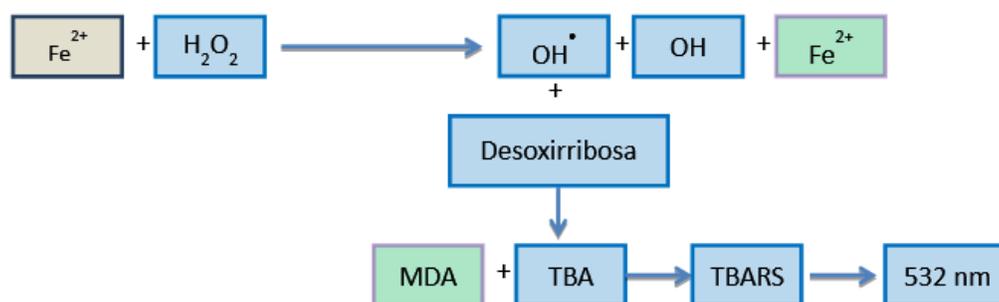


Figura 1. Representación esquemática método de Halliwell(1987) para la medición del radical hidroxilo.

Método de la actividad antioxidante (AOA)

El valor de la AOA fue determinado por el método de Koracevic y col. (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) Fe (NH₄)₂SO₄ 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) H₂O₂ 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 4.

Tabla 4. 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 Potasio	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

Fuente:Koracevic y col. (2001).

Los tubos se incubaron por 10 minutos a 100°C en baño de agua, y se enfriaron 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:

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

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).

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

Se usó el método desarrollado por Re y col. (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 ($\pm 0,02$) a 734 nm a 30°C, lo cual se logró mezclando aproximadamente 40 μ L de la solución de ABTS y 960 μ L de etanol al 20% (v/v). Se tomaron 10 μ L 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.

Método de la 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 (Singlenty col., 1999). Se mezclaron 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 con agua, y se le agregaron 400 µL 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).

Método para la 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:

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

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 5. La solución C se preparó mezclando 500 µL 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 MQ, y se le adicionó a cada tubo 150 µL 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 μL de cada una de las muestras a estudiar siguiendo el procedimiento explicado anteriormente.

Tabla 5. Volúmenes de reactivos que se usaron para la curva de calibración en la determinación de proteínas.

$V_{BSA} (\mu\text{L})$	$V_{\text{Agua}}(\mu\text{L})$	$V_{\text{Sol c}} (\mu\text{L})$
0	500	1500
50	450	1500
100	400	1500
200	300	1500
300	200	1500

Fuente: Lowry y col. (1951).

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 es usada como estándar para construir una curva de calibración. Diez miligramos de quercetina fueron disueltos en etanol al 80% (v/v) y luego diluidos hasta concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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.

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 ($H_0: \rho \geq 0,05$ 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 negara. 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 (Blair y Taylor, 2008).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Las muestras de las mieles analizadas, descritas en la Tabla 3, fueron recabadas del sur de Ecuador, específicamente en las provincias El Oro, Morona Santiago, Loja y Azuay. En dichas muestras se determinó la concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas, así como la actividad antioxidante mediante el uso de los métodos descritos en el Capítulo III (Método de Inhibición del Radical Hidroxilo, Ensayo de decoloración del catión radical ABTS^{••} y AOA). Los datos de la investigación se resumen y presentan mediante tablas simples, gráficos de columnas y de perfiles, y medidas de resumen: media, error estándar. Se aplicó el diseño con 3 repeticiones con un valor de $p < 0,05$ al no encontrarse diferencia estadísticamente significativa en la características fisicoquímicas y capacidad antioxidante en la miel de abeja procedente de las distintas provincias del sur de Ecuador. Los datos fueron procesados con la ayuda de los programas estadísticos SPSS v_19, SAS entorno Windows y la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010.

Propiedades fisicoquímicas de las mieles analizadas

En la Tabla 6 se reflejan los resultados obtenidos en las determinaciones de las concentraciones de flavonoides, polifenoles y proteínas de las mieles usadas en este estudio. En lo que se refiere a la concentración de flavonoides, la cual se determinó aplicando el método colorimétrico del cloruro de aluminio, los valores oscilaron en un rango entre $5,54 \pm 0,22$ y $232,78 \pm 10,92$ mg equivalentes de quercetina /100g de miel, donde la medida de menor concentración corresponde a una muestra proveniente de la provincia El Oro (M16) y la medida de mayor concentración

es procedente de la provincia de Loja (M29). Es importante destacar que existen muestras de la misma provincia cuyos valores de concentración de flavonoides son estadísticamente similares, como es el caso de las muestras M9 y M10 provenientes de la provincia El Oro, lo mismo ocurre para muestras M4 y M27 de la provincia Morona Santiago (Tabla 6).

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las mieles analizadas.

Muestra de Miel	Nombre común de productor	Proteína (mg de proteínas/100g de miel)	Flavonoides (mg equivalentes quercitina/100 g de miel)	Polifenoles (mg equivalentes ácido gálico/100 g de miel)
Provincial El Oro				
Miel 1	Catiana	102,49 ± 10,2f	41,33±2,45f	979,92 ± 3,98e
Miel 2	Cananambo	92,03 ± 2,74e	24,71 ± 1,11d	1378,41 ± 4,57g
Miel 8	Catiana	102,86 ± 27,82f	9,33 ± 1,62b	979,91 ± 9,08e
Miel 9	Catiana	84,25 ± 7,73d	27,32 ± 0,00d	1047,46 ± 6,80e
Miel 10	Catiana	83,51 ± 3,61d	44,71 ± 1,15f	1182,58 ± 18,67f
Miel 11	Abeja de tierra	192,21 ± 10,61m	70,73 ± 0,52h	996,33 ± 5,51e
Miel 12	Catiana	124,34 ± 16,12h	66,06 ± 2,21h	569,14 ± 4,65a
Miel 13	Catiana	127,86 ± 10,21h	118,07 ± 0,00k	1090,07 ± 1,34e
Miel 16	Catiana	176,38 ± 20,12l	5,54 ± 0,22 ^a	1183,18 ± 6,38f
Miel 18	Bermejo	96,19 ± 7,23e	84,09 ± 6,04i	845,44 ± 5,22d
Miel 19	Catana	137,49 ± 5,63i	122,05 ± 17,21k	1340,72 ± 2,97g
Miel 21	Catiana	160,18 ± 25,71k	126,03 ± 3,34k	1203,12 ± 5,65f
Miel 22	Catiana	125,45 ± 7,22h	148,76 ± 4,42l	918,43 ± 3,49e
Miel 23	Catiana	125,45 ± 5,51h	98,09 ± 1,16j	754,15 ± 3,51c
Miel 24	Catiana	119,90 ± 3,90g	124,07 ± 0,57k	1877,41 ± 6,66i
Miel 25	Catiana	128,51 ± 6,71h	59,35 ± 4,77g	1016,48 ± 4,68e
Provincia Morona Santiago				
Miel 3	Abeja	84,81 ± 5,40d	25,31 ± 3,82d	1181,94 ± 10,50f
Miel 4	Abeja	95,08 ± 5,76e	33,32 ± 0,51e	1071,12 ± 13,86e
Miel 27	Abeja	93,88 ± 13,74e	169,33 ± 15,86m	1516,63 ± 8,23h
Provincia Loja				
Miel 5	Abeja de tierra	86,01 ± 6,04d	37,34 ± 1,62e	1240,35 ± 15,55f
Miel 6	Abeja	78,88 ± 3,85c	19,34 ± 3,34c	1261,05 ± 1,02f
Miel 7	Catiana	94,90 ± 5,20e	6,71 ± 0,57 ^a	766,32 ± 0,64c

Miel 14	Bermejo	266,84 ± 91,12n	68,09 ± 2,75h	641,52 ± 2,38b
Miel 15	Abeja	103,79 ± 4,11f	72,72 ± 3,39h	564,22 ± 9,77a
Miel 17	Abeja de tierra	126,56 ± 25,72h	86,78 ± 3,84i	1188,09 ± 7,20f
Miel 26	Abeja	132,77 ± 30,83i	108,04 ± 1,65j	986,54 ± 1,59e
Miel 28	Abeja de tierra	28,97 ± 4,05 ^a	128,79 ± 17,43k	1674,28 ± 8,81h
Miel 29	Catiana	107,40 ± 22,92f	232,78 ± 10,92n	1695,52 ± 4,58h
Miel 30	Abeja de tierra	43,51 ± 1,91b	99,37 ± 4,41j	2001,63 ± 11,61j
Miel 31	Bermejo	150,73 ± 19,5j	127,33 ± 14,25k	1760,05 ± 10,15i
Provincia Azuay				
Miel 20	Abeja de tierra	21,38 ± 0,93 ^a	100,71 ± 5,42j	720,62 ± 1,44c

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P <0.05).

Debido a la magnitud de la desviación estándar obtenidos en los resultados de la concentración de flavonoides de las muestras en estudio, se procedió a realizar un gráfico de dispersión entre las muestras de miel, el cual se pudieron observar los picos pertenecientes a máximos y mínimos locales procedentes de cada muestra, denotándose que el mínimo en la dispersión es efectivamente la concentración de la muestra M16 y el máximo de concentración corresponde a la muestra M29, cada una con su respectivo error estándar (Gráfico 1).

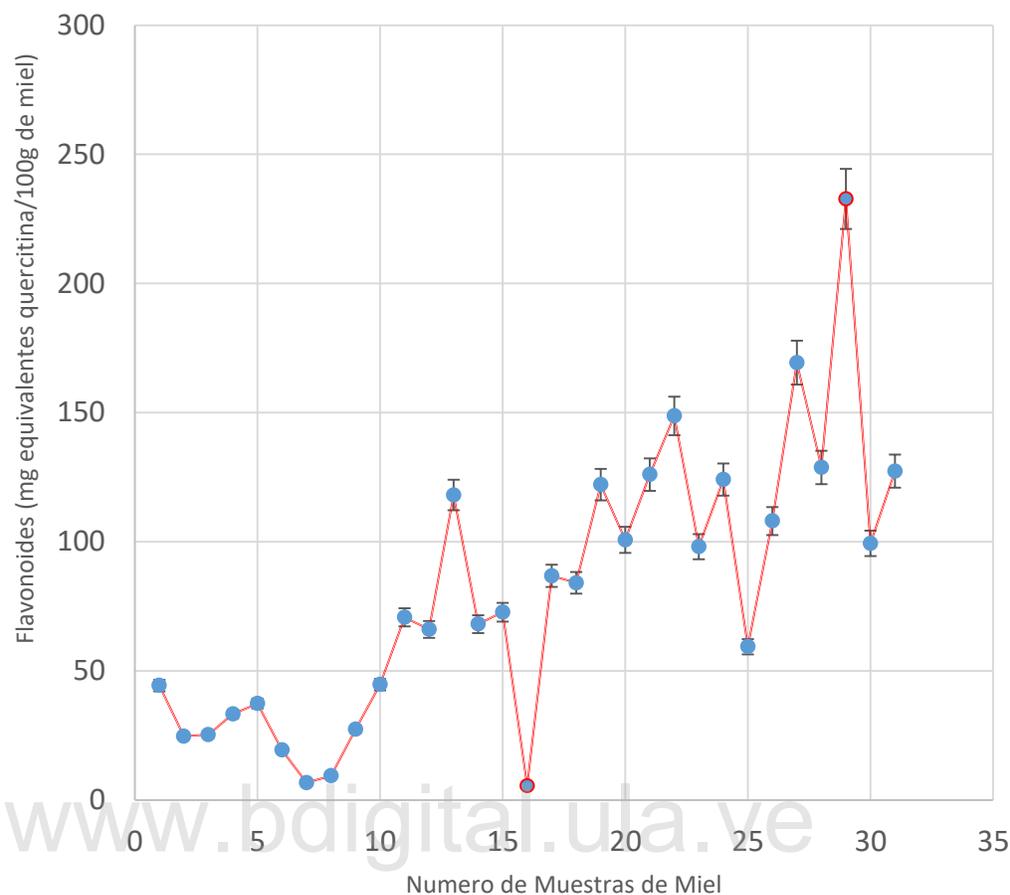


Gráfico 1. *Dispersión general de la concentración de flavonoides entre las muestras de miel provenientes del sur de Ecuador.*

Los resultados de la concentración de flavonoides se dividieron según la media entre las provincias y el tipo de productor, con el objetivo de determinar qué provincia posee la mayor y menor concentración de flavonoides. En el gráfico 2 se presentan las distribuciones de las concentraciones con respecto a las provincias usadas en este trabajo y el tipo de abeja productora según el nombre común. Se puede apreciar que la mayor concentración de flavonoides se encontró en las muestras provenientes de la provincia de Azuay

con un valor medio de $100,71 \pm 5,42$ mg equivalentes quercetina/100g de miel.

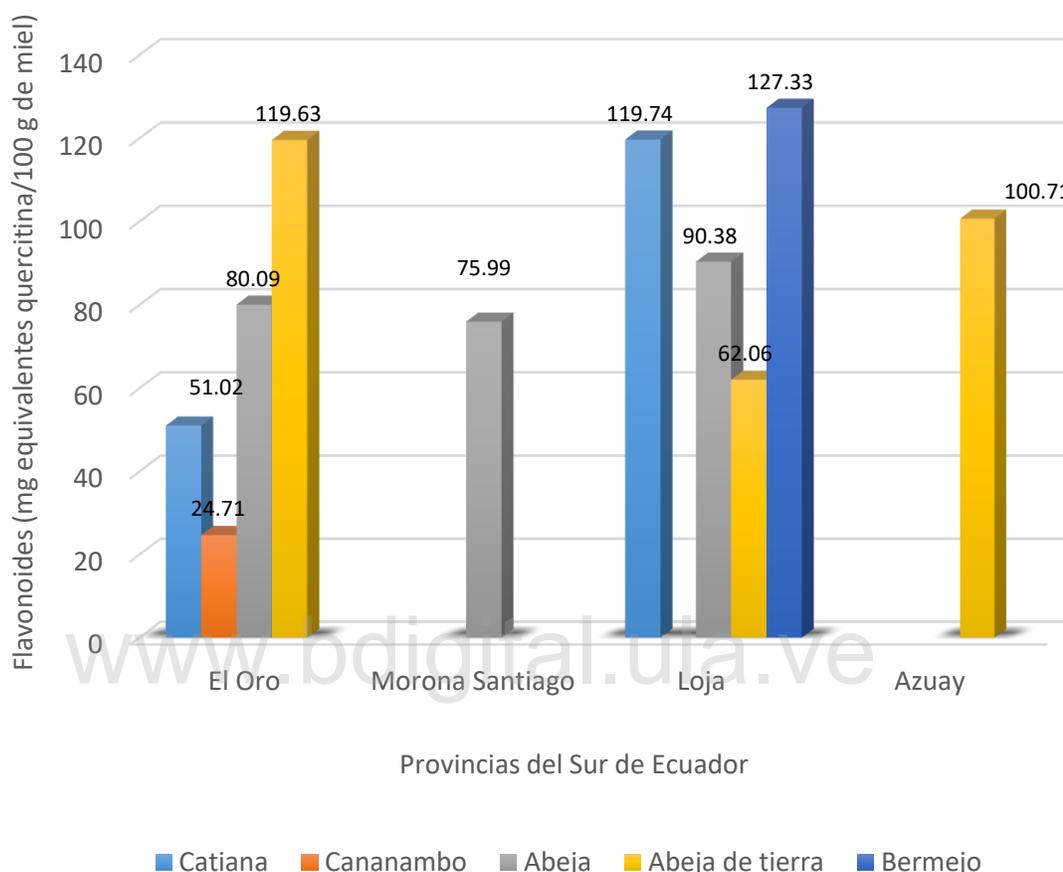


Gráfico 2. Distribución de valores medios de las concentraciones de flavonoides en las mieles provenientes de las provincias del sur de Ecuador.

Así mismo, se determinó la concentración de polifenoles por medio del método de Singleton y col. (1999) usando ácido gálico como estándar, método en el cual se utiliza el reactivo de *Folin-Ciocalteu* el cual es capaz de reaccionar con fenoles y con sustancias reductoras no fenólicas para formar cromógenos que se pueden detectar espectrométricamente, presentándose los valores obtenidos en la Tabla 6. Los valores medidos de concentración

de polifenoles oscilaron entre $569,14 \pm 4,65$ y $2001,63 \pm 11,61$ mg equivalentes ácido gálico/100g de miel, correspondiendo el valor de menor concentración a la muestra M15 proveniente de la provincia de Loja al igual que el valor de mayor concentración (muestra M30), por lo cual se aprecia una desviación estándar considerable entre la concentración de polifenoles en dicha provincia. También se encontraron muestras de la misma provincia con valores estadísticamente iguales (M28 y M31), así como de provincias distintas (M31 y M19). Además, se realizó el gráfico de dispersión para evaluar los máximos y mínimos locales entre las concentraciones de polifenoles de cada muestra, pudiendo observar el intervalo de valores con el mínimo correspondiente a M15 y el mayor a M30 (gráfico 3). También puede observarse que la mayor cantidad de medidas se encuentra entre 1000 y 1500 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel.

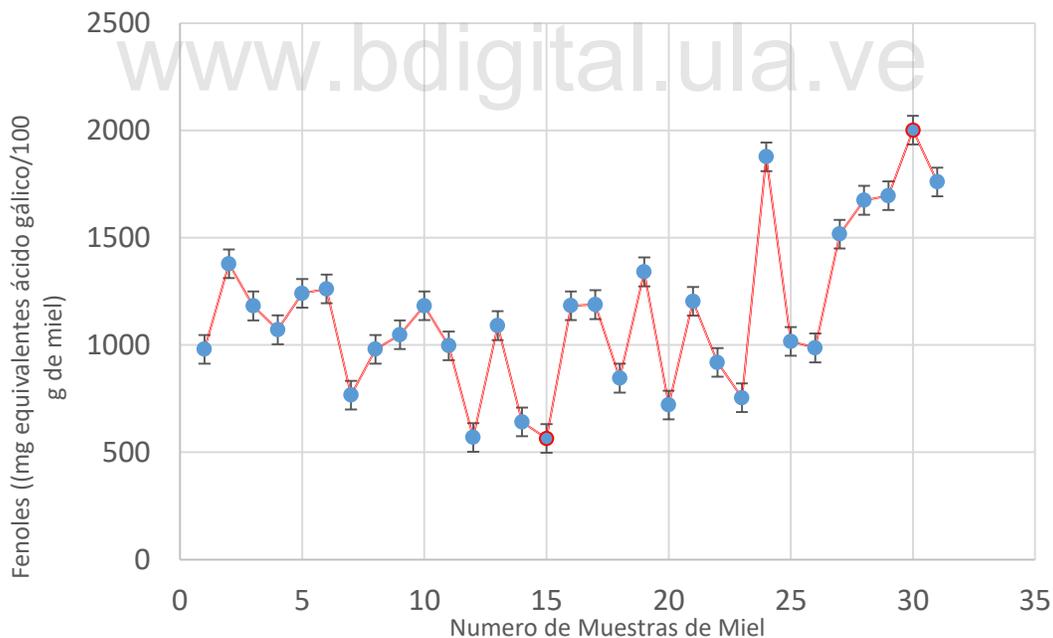


Gráfico 3. *Dispersión general de las concentraciones de polifenoles entre las muestras de miel provenientes del sur de Ecuador.*

En el gráfico 4 se presentan las medias de las concentraciones de polifenoles distribuidas en las provincias de las cuales fueron recolectadas las muestras de miel según el tipo de abeja productora. Se puede observar que la distribución de mayor concentración de polifenoles la obtuvo la provincia de Loja con una media de $1345,10 \pm 387,33$ mg equivalentes ácido gálico/100g de miel; por otro lado, la distribución de menor concentración se encontró en la miel recolectada de la abeja común en la provincia Azuay con una concentración media de $720,62 \pm 1,44$ mg equivalentes ácido gálico/100g de miel.

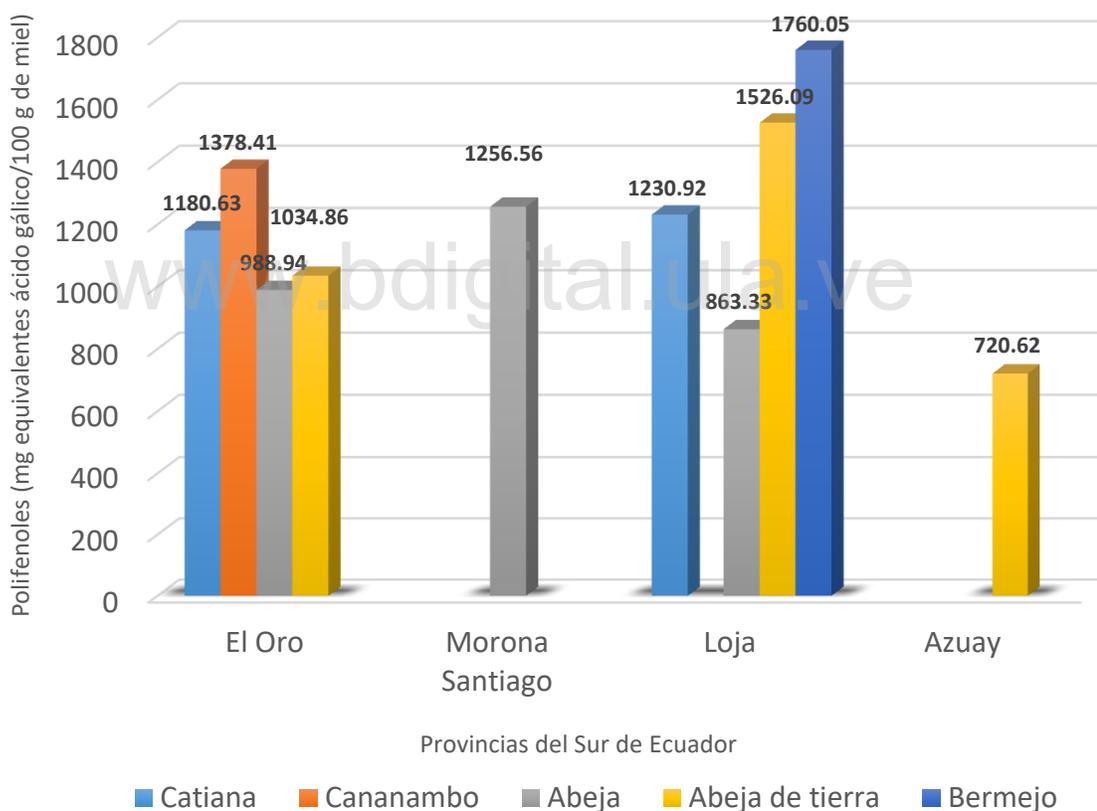


Gráfico 4. Distribución de valor medio de la concentración de los polifenoles recolectados de las mieles provenientes de las provincias del sur de Ecuador.

Por último, para determinar la concentración de proteínas en las muestras analizadas se utilizó el método de Lowry (1951), en el cual se usó una solución de albumina bovina como estándar (Tabla 6). Los valores de concentración de proteínas oscilaron en un rango de $21,38 \pm 0,93$ y $266,84 \pm 91,12$ mg de proteína/100 g de miel, donde la medición de menor concentración correspondió a la muestra M20 proveniente de la provincia de Azuay, y la mayor concentración a la muestra M14 de la provincia de Loja. Al igual que en las concentraciones de flavonoides y polifenoles, se encontraron muestras provenientes de la misma provincia que resultaron ser estadísticamente similares (M9 y M10), así como en muestras provenientes de diferentes provincias (M10 y M3). En el caso de la concentración de proteínas se observó una mayor homogeneidad en los resultados obtenidos, pudiendo observar valores frecuentemente parecidos como es el ejemplo de las muestras 12,13,17,22,23,24,25,26 y 27, las cuales oscilaron en un rango de 125 y 132 mg de proteína/100g de miel. Por otro lado, también se obtuvo frecuencia entre las muestras 2,3,4,9,10 y 18, en las cuales se encontraron valores entre 84 y 92 mg de proteína/100g de miel.

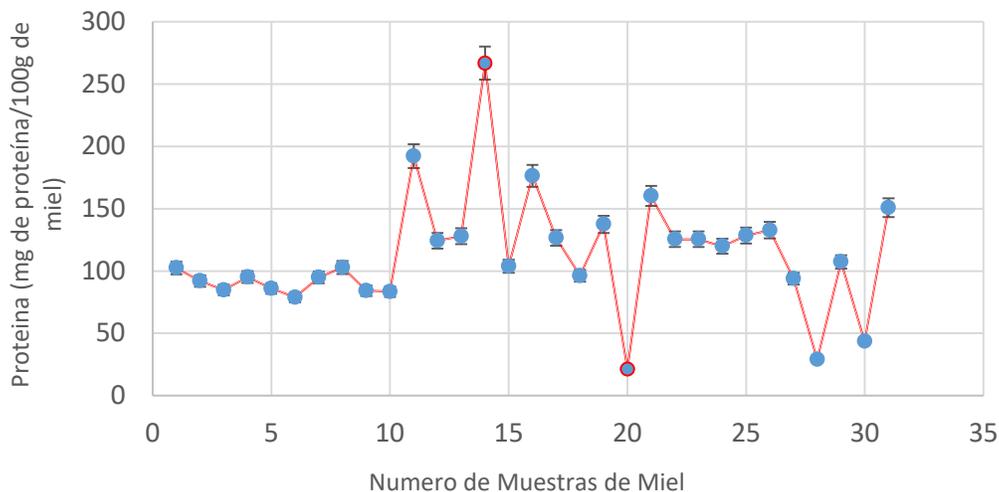


Gráfico 5. Dispersión general de la concentración de proteínas entre las muestras de miel provenientes del sur de Ecuador.

En el gráfico 5 se pueden observar los máximos y mínimos locales, con respecto a la concentración de proteínas entre las muestras, detallándose además los valores frecuentes entre las muestras con el máximo perteneciente a la muestra M14 y el mínimo a la muestra M20.

Así mismo, también se procedió a separar las muestras de acuerdo a la provincia de origen para evaluar en cual se obtiene la miel con mayor concentración de proteínas. Como se puede observar en el Gráfico 6, el valor máximo promedio entre las muestras fue el correspondiente a la provincia de Loja, con un valor medio de $119,11 \pm 22,27$ mg de proteína/100g de miel, entre las llamadas regularmente en la provincia Abeja común. En el Gráfico 6 también se puede observar que la menor concentración de proteínas se obtuvo en la provincia de Azuay entre las llamadas localmente Abejas de tierra con una concentración de $21,38 \pm 0,93$ mg de proteína/100g de miel.

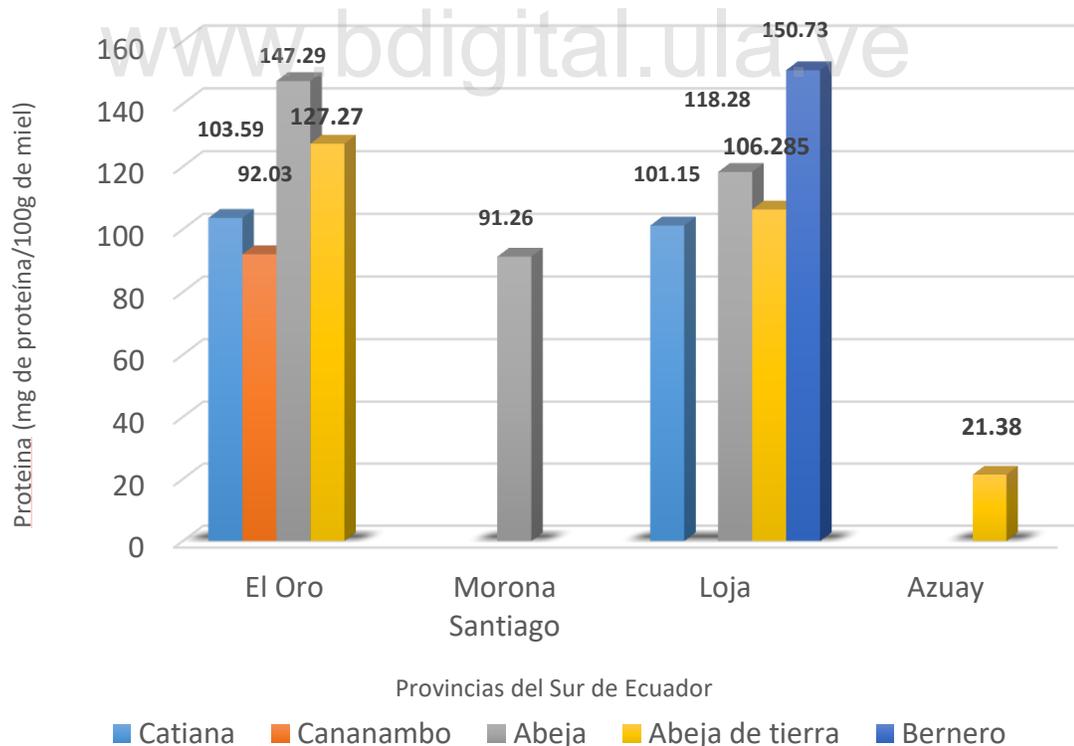


Gráfico 6. Distribución de valor medio de la concentración de proteínas determinadas entre las mieles provenientes de las provincias del sur de Ecuador.

En el gráfico 7 se presentan en conjunto las 3 propiedades fisicoquímicas evaluadas, separadas entre las provincias y con el respectivo valor medio de cada una de los parámetros estudiados. Se evidencia que la mayor concentración promedio de polifenoles y proteínas es la provincia de Loja, mientras que la mayor concentración promedio de flavonoides la presenta la provincia de Azuay.

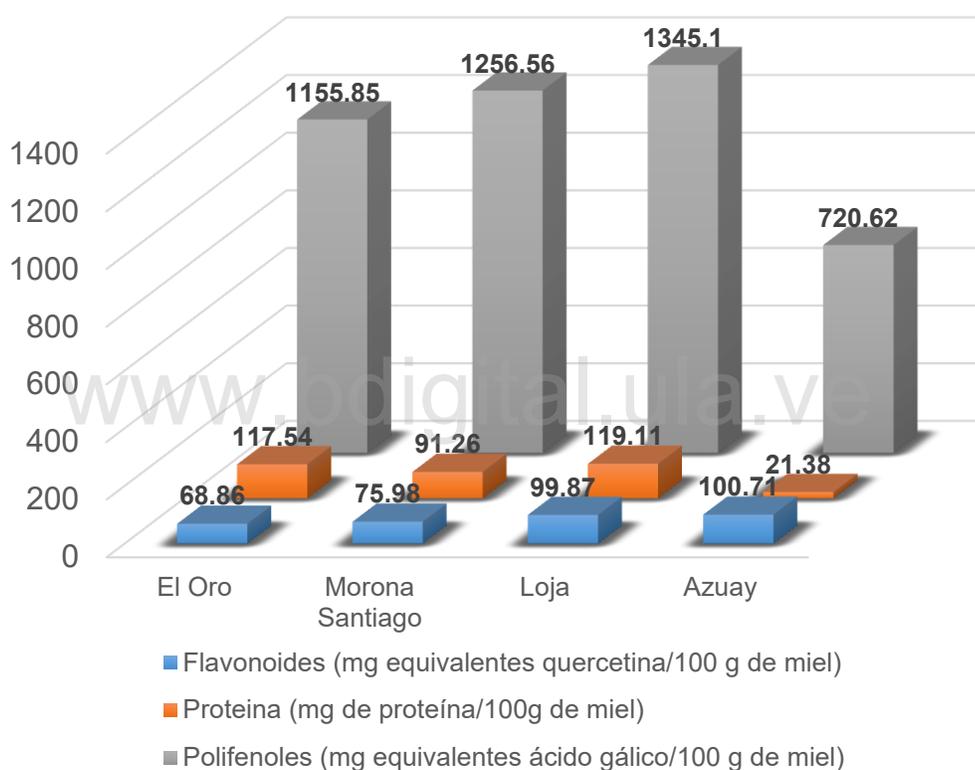


Gráfico 7. Distribución de la concentración de las propiedades fisicoquímicas de las mieles provenientes del Sur de Ecuador.

Actividad antioxidante de las mieles analizadas

Las muestras de miel objeto de este estudio fueron sometidas a los tres métodos de análisis de la capacidad antioxidante descritos en el

Capítulo III. En el caso del método del AOA, en el cual se compara la actividad antioxidante de las muestras usando como patrón de comparación el ácido úrico, el cual es un potente antioxidante no enzimático, los resultados se presentan en la Tabla 7. Los valores de AOA se encontraron en el intervalo entre $0,93 \pm 0,05$ y $1,23 \pm 0,07$ mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, siendo el menor valor el de la muestra de miel procedente de la provincia de Loja y correspondiente a la muestra M14, mientras que el mayor valor de AOA pertenece a la provincia de El Oro y corresponde a la muestra M21. Se puede notar que hubo dispersión considerable entre los resultados, ya que el rango es un intervalo relativamente pequeño. También se puede mencionar que el valor de AOA más frecuente fue de 1,08 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel obtenido para las muestras M10, M17, M18, M19, M20, M21, M22 y M24, encontrándose en este grupo muestras de diferentes provincias. Por último, todas las muestras de miel presentaron valores de AOA superiores a las reportadas para los antioxidantes comerciales ensayados en este trabajo (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad antioxidante de las mieles analizadas

Muestra de Miel	Nombre común de productor	AOA (mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel)	Radical Hidroxilo (% de inhibición/100 g de miel)	CAT (μ moles equivalentes de Trolox (TEAC/100 g de miel)
Provincia El Oro				
Miel 1	Catiana	$1,02 \pm 0,03d$	$25,48 \pm 4,67b$	$172,0 \pm 6,5e$
Miel 2	Cananambo	$1,02 \pm 0,04d$	$79,80 \pm 3,30d$	$206,0 \pm 8,9g$
Miel 8	Catiana	$1,03 \pm 0,03d$	$84,58 \pm 1,17d$	$204,5 \pm 2,7g$
Miel 9	Catiana	$1,00 \pm 0,04d$	$72,66 \pm 16,31d$	$209,1 \pm 6,5g$
Miel 10	Catiana	$1,08 \pm 0,01e$	$87,39 \pm 1,12e$	$229,7 \pm 0,0h$
Miel 11	Abeja de tierra	$1,05 \pm 0,03e$	$81,84 \pm 1,62d$	$186,3 \pm 2,2f$
Miel 12	Catiana	$1,06 \pm 0,02e$	$86,95 \pm 0,68e$	$137,9 \pm 1,5c$
Miel 13	Catiana	$1,05 \pm 0,02e$	$84,50 \pm 1,25e$	$266,8 \pm 11,4i$

Miel 16	Catana	1,05 ± 0,03e	86,27 ± 0,12e	199,9 ± 10,4g
Miel 18	Bermejo	1,08 ± 0,01e	88,31 ± 0,66e	136,4 ± 7,7c
Miel 19	Catana	1,08 ± 0,00e	87,53 ± 0,16e	170,1 ± 0,5e
Miel 21	Catiana	1,23 ± 0,07g	86,44 ± 3,13e	187,2 ± 5,0f
Miel 22	Catiana	1,08 ± 0,00e	89,64 ± 0,83e	184,7 ± 2,5f
Miel 23	Catiana	1,08 ± 0,02e	89,34 ± 1,28e	142,2 ± 4,5c
Miel 24	Catiana	1,11 ± 0,03f	89,31 ± 0,35e	351,1 ± 10,2j
Miel 25	Catiana	1,08 ± 0,02e	86,02 ± 1,13e	192,0 ± 2,5f
Provincia Morona Santiago				
Miel 3	Abeja	1,00 ± 0,05d	55,35 ± 4,67c	136,4 ± 0,2c
Miel 4	Abeja	0,99 ± 0,05d	18,74 ± 1,24a	123,9 ± 1,5b
Miel 27	Abeja	1,11 ± 0,01f	87,23 ± 0,23e	252,9 ± 3,0i
Provincia Loja				
Miel 5	Abeja de tierra	1,01 ± 0,04d	78,48 ± 0,88d	222,1 ± 0,7h
Miel 6	Abeja	1,02 ± 0,03d	70,94 ± 2,02d	245,3 ± 2,2i
Miel 7	Catiana	1,03 ± 0,04d	89,99 ± 0,33e	154,9 ± 0,5d
Miel 14	Bermejo	0,93 ± 0,04c	76,88 ± 8,46d	143,4 ± 2,5c
Miel 15	Abeja	1,07 ± 0,01e	85,08 ± 1,49e	145,2 ± 7,0c
Miel 17	Abeja de tierra	1,08 ± 0,01e	80,26 ± 1,29d	162,8 ± 10,4e
Miel 26	Abeja	1,12 ± 0,02f	90,04 ± 2,55e	166,8 ± 4,2e
Miel 28	Abeja de tierra	1,11 ± 0,01f	91,06 ± 0,49e	139,7 ± 11,4c
Miel 29	Catiana	1,09 ± 0,00e	87,02 ± 0,60e	266,5 ± 4,2i
Miel 30	Abeja de tierra	1,09 ± 0,01e	90,84 ± 0,58e	172,0 ± 2,0e
Miel 31	Bermejo	1,10 ± 0,02f	90,55 ± 0,55e	200,5 ± 1,5g
Provincia Azuay				
Miel 20	Abeja de tierra	1,08 ± 0,02e	87,54 ± 0,57e	145,5 ± 2,7c
Antioxidantes comerciales				
Quercitina		0,86±0,03b	53,07 ± 1,1c	100,6 ± 1,7 ^a
Melatonina		0,83±0,02b	53,98 ± 1,07c	97,6 ± 5,1 ^a
Ácido Lipoico		0,31±0,07 ^a	27,94 ± 0,98b	124,7 ± 3,1b

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P <0.05).

Para el método AOA, se procedió a realizar un diagrama de barras en el cual se pueden visualizar los valores frecuentes entre las muestras analizadas, resaltándose que el máximo corresponde a la muestra M21 y el mínimo a la muestra M14.

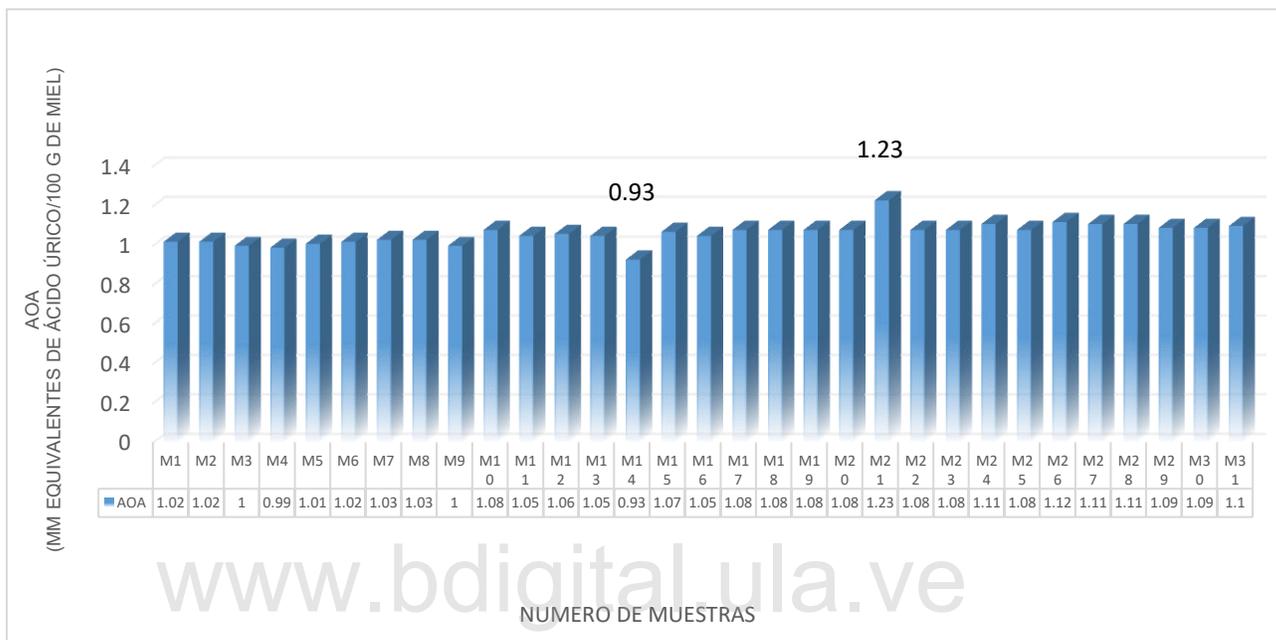


Gráfico 8. Distribución de la concentración de AOA en las mieles provenientes del sur de Ecuador.

En el caso del porcentaje de inhibición de la forma de radical hidroxilo, se encontraron intervalos entre $18,74 \pm 1,24$ y $91,06 \pm 0,49$ % de inhibición/100 g de miel; donde el valor mínimo se encontró en la muestra proveniente de la provincia de Morona Santiago, específicamente a la muestra M4 y el máximo corresponde la muestra M28 proveniente de la provincia Loja (Tabla 7). Se encontraron muestras de la misma provincia que presentan valores estadísticamente similares (muestras M16, M18 y M19 de la provincia El Oro), así como muestras de diferentes provincias cuyos valores de inhibición del radical hidroxilo son estadísticamente iguales (M26 de la provincia de Loja y M27 de la provincia Morona Santiago) (Tabla 7). Por último, casi todas las muestras presentaron porcentajes de inhibición del radical hidroxilo

superiores a los antioxidantes comerciales usados en este estudio, a excepción de la muestra M4 cuyo valor es inferior a todos los antioxidantes comerciales; la muestra M1 que es estadísticamente similar al ácido Lipoico; y la muestra M3 que es estadísticamente similar a la quercetina y la melatonina (Tabla 7). En la Figura 9 se presentan los valores de porcentaje de inhibición del radical hidroxilo, representando los valores máximos y mínimos.



Gráfico 9. Distribución de los porcentajes de inhibición del radical hidroxilo en las mieles provenientes del sur de Ecuador.

Finalizando, se determinó la actividad antioxidante de las muestras de miel a través del ensayo de decoloración del catión radical ABTS⁺, en el cual se evalúa como una muestra de un posible antioxidante disminuye el radical formado evidenciándose a través de una disminución de color, reportándose el valor resultante como CAT (Capacidad Antioxidante Total), y usando como patrón de comparación el Trolox. Los valores de CAT se encontraron en un rango entre $123,9 \pm 1,5$ y $351,1 \pm 10,2 \mu\text{moles}$ equivalentes de Trolox (TEAC/100 g de miel). El valor mínimo de CAT en este estudio corresponde a la provincia de Morona Santiago perteneciente a la muestra M4, mientras

que al valor máximo fue representado por la muestra M24 perteneciente a la provincia El Oro (Tabla 7, gráfico 10). Todas las muestras analizadas en este estudio presentaron valores de CAT superiores a los antioxidantes comerciales, salvo la muestra cuatro cuyo valor de CAT es estadísticamente similar al del ácido Lipoico (Tabla 7). Al igual que para los métodos de AOA y porcentaje de inhibición del radical hidroxilo, se reportaron valores estadísticamente similares para muestras de la misma provincia, como de provincias diferentes. Cabe resaltar que la muestra M4 presentó los valores mínimos para todos los métodos realizados para determinar la actividad antioxidante (Tabla 7).

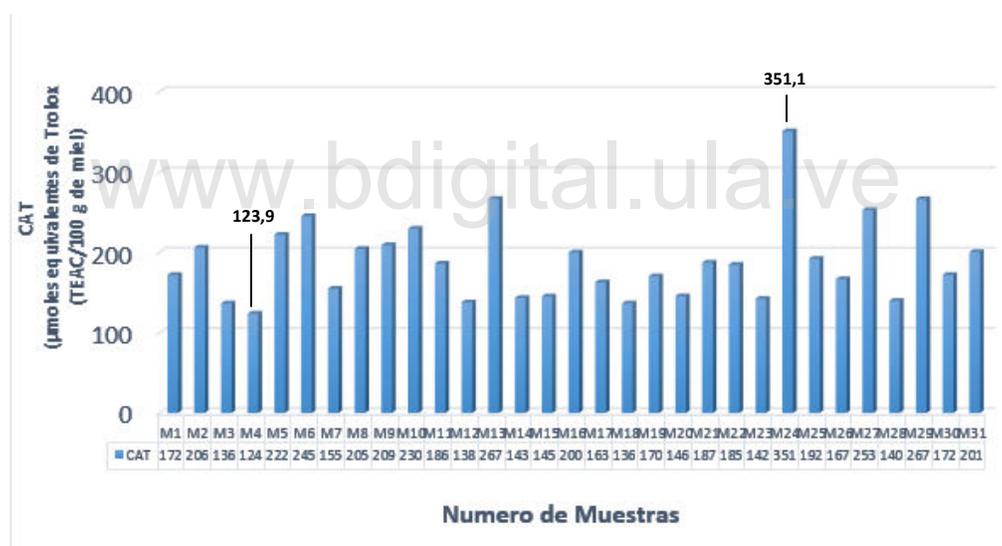


Gráfico 10. Distribución de la CAT en las mieles provenientes del sur de Ecuador.

En la Tabla 8 se presentan los valores de R^2 obtenidos al correlacionar los resultados de la determinación de la actividad antioxidante por los tres métodos empleados en este trabajo con los valores de las determinaciones fisicoquímicas realizadas a cada una de las muestras de miel. Se puede observar una correlación positiva entre las concentraciones de proteínas, flavonoides y polifenoles con los valores de AOA y CAT ($R^2 > 0,5$); sin

embargo, no se encontró correlación entre las concentraciones de proteínas y polifenoles y el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo ($R^2 < 0,5$), pero si una leve correlación positiva con la concentración de flavonoides (Tabla 8).

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

Parámetro	Proteínas	Flavonoides	Polifenoles	AOA	RH	CAT
Proteínas	1	0,056	0,029	0,903	0,404	0,959
Flavonoides		1	0,034	0,918	0,504	0,921
Polifenoles			1	0,853	0,456	0,932
AOA				1	0,182	0,098
RH					1	0,154
CAT						1

AOA, Actividad antioxidante; RH, % inhibición radical hidroxilo; CAT, Capacidad antioxidante total

www.bdigital.ula.ve

Discusión

El análisis fisicoquímico de muestras de miel, especialmente la determinación de su contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas, es de vital importancia para establecer el valor nutracéutico de una miel, ya que a estos compuestos se les atribuyen una gran variedad de actividades biológicas relacionadas con la prevención de diversos procesos patológicos. Desde el punto de vista de su actividad biológica, muchos polifenoles y flavonoides tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer, entre otras enfermedades crónicas (Tomás-Barberán, 2003). Si bien la determinación de polifenoles totales, no está directamente relacionada con la

medición de la actividad antioxidante, puede ser útil para tales estudios, en especial si se combina con métodos que permitan cuantificar tal propiedad.

Los compuestos fenólicos de la miel actúan como antioxidantes naturales y se ha incrementado su uso debido a la contribución a la salud humana. En la miel se encuentran un amplio rango de polifenoles tales como ácido cafeico, quercetina, acacetina, kaempferol, galangina, crisina, acacetina, pinocembrina, apigenina, entre otros. En general, la mayoría de los compuestos fenólicos que se encuentran en la miel se encuentran en la forma de flavonoides y ácidos fenólicos (Tomás-Barberán y col., 2001; Cushnie y Lamb, 2005; Fiorani y col., 2006; Lianda y col., 2012). La concentración de estos compuestos depende de varios factores, incluyendo la especie de planta usada por las abejas para obtener el polen, la salud de la planta, la estación, y factores ambientales (Kücük y col., 2007).

En los resultados obtenidos para la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides, se puede apreciar que la concentración difiere considerablemente entre las muestras, lo que puede estar justificado por el hecho de la composición química de las mieles que puede variar significativamente dependiendo de las diferentes provincias, condiciones climáticas, la vegetación que crece alrededor de las colmenas, así como el momento de recolección, todos estos factores pueden influir en la actividad biológica (Kücük y col., 2007). Los resultados de concentración de polifenoles y flavonoides de las muestras de miel usadas en este trabajo son superiores a las reportadas por Rodríguez-Malaver y col. (2009), quienes reportan valores de polifenoles totales entre 99,7 y 464,9 mg EAG/100 g y de flavonoides entre 2,6 a 31,0 mg EQ/100 g de miel, para mieles de diferentes especies de abejas sin aguijón (*M. crinita*, *M. eburnea*, *M. grandis*, *M. illota*, *Nannotrigona melanocera*, *Partamona epiphytophila*, *Ptilotrigona lurida*, *Scaptotrigona polystica*, *Scaura latitarsis*, y *Tetragonisca angustula*) de Perú. También son significativamente mayores a los reportados por Vit y col.

(2012) quienes realizaron la caracterización inicial de las mieles de *M. favosa* de la Península de Paraguaná (Venezuela), reportando valores de Polifenoles de 51,50-217,19 mg EAG/100 g miel y de flavonoides entre 0,10-8,15 mg EQ/100 g miel.

En lo que se refiere a la concentración de proteínas, se encontraron valores que variaron entre 21,38 y 266,84 mg de proteína/100 g de miel (Tabla 6). Estos resultados son inferiores a los reportados por Rodríguez-Malaver y col. (2009) quienes reportan mg de proteínas/100 g de miel entre 750,0 y 2.860,0; o los de Pérez-Pérez y col. (2013) con concentraciones de proteínas entre 486,5 a 655,4 mg proteínas/100 g de miel.

Desde hace mucho tiempo se ha propuesto que la capacidad antioxidante de la miel se debe principalmente a los compuestos fenólicos y flavonoides que contiene, y se ha puesto en evidencia una fuerte correlación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de la miel (Alzahrani y col., 2012). La actividad antioxidante de las mieles en estudio, medida por medio de tres métodos se reporta en la Tabla 7. Para el método del AOA, con valores que oscilaron entre 0,93 y 1,23 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel. Los resultados obtenidos en este trabajo son superiores a los reportados por Colmenares y col. (2015), quienes encontraron valores de AOA entre 0,85 y 1,12 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel en diferentes muestras de miel producidas por *Apis mellifera* provenientes de Malasia. Los valores de AOA de las muestras de miel analizadas en este trabajo también son superiores a los reportados por Steinbrück y col. (2017) para muestras de miel producidas por tres especies del género *Apis* (*A. mellifera*, *A. dorsata* y *A. cercana*) provenientes de Asia y Europa, con valores de AOA que oscilaron entre 0,89 y 0,92 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel. Otro dato importante es que los valores AOA de las muestras de miel analizadas en este trabajo son superiores a los encontrados para el ácido úrico, un potente antioxidante

encontrado en organismos vivos, y usado a una concentración de 1 mM en este método (Koracevic y col., 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que el radical hidroxilo y el anión superóxido se forman en sitios de heridas a partir del anión superóxido producido por los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), y son considerados factores claves en la inadecuada sanación de heridas. Además, el anión superóxido también puede reaccionar con el óxido nítrico producido por los macrófagos y formar peroxinitrito, un tercer antioxidante fuerte que es capaz de dañar los tejidos circundantes (Tomás-Barberán y col., 2001). Además, el potente radical hidroxilo está relacionado con el desarrollo de otras enfermedades como cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Rajendran y col., 2014). Es por lo antes mencionado que se hace necesario estudiar el efecto de una muestra potencialmente antioxidante sobre diversos tipos de radicales libres.

En cuanto al método de porcentaje de inhibición del radical hidroxilo, se denotó que la mayoría de las muestras se encontraron entre 80 y 90% de inhibición/100 g de miel (Tabla 7). También es importante destacar que la mayoría de las muestras en estudio presentaron porcentajes de inhibición del radical hidroxilo superiores a los encontrados para la quercetina, melatonina y ácido lipoico (Tabla 7). Estos resultados son superiores a los reportados por Rodríguez y col. (2007) quienes encontraron porcentajes de inhibición entre 62,73 y 77,77% de inhibición/100 g de miel, siendo estos mayores a la melatonina, ácido lipoico y quercetina. También son similares a los reportados por Colmenares y col. (2015) para mieles fabricadas por *A. mellifera* de Malasia, Grecia y Australia (entre 36,7 y 68,3 % de inhibición/100 g), y que los de Steinbrück y col. (2017) con muestras de miel de tres especies del género *Apis* (*A. mellifera*, *A. dorsata* y *A. cercana*) provenientes de Asia y Europa (entre 52,7 y 75,4 % de inhibición/100 g). Alvarez-Suarez y col. (2012) evaluaron la capacidad de secuestrar radicales libres (anión

superóxido y radical hidroxilo) de varias mieles monoflorales de Cuba, encontrando que la formación de DMPO-OH es más pronunciada en el control positivo (sin miel), mientras que la presencia de la muestra de miel disminuye la intensidad de la señal DMPO-OH. De hecho, los componentes antioxidantes de las muestras de miel son capaces de secuestrar estas especies.

El último método para medición de capacidad antioxidante fue el de la decoloración del catión radical ABTS^{•+}. Los valores de CAT se encontraron en un rango entre 123,9 y 351,1 μ moles equivalentes de Trolox (TEAC)/100 g de miel, siendo en todos los casos superiores a los encontrados para la melatonina y quercetina, y en algunos casos para el ácido lipoico. Estos valores son superiores a los reportados por Muñoz y col. (2014) quienes determinaron la capacidad antioxidante de 18 tipos de mieles colectadas en supermercados de Perú, encontrando valores entre 28,75 (miel de zapote) y 68,45(miel de eucalipto) TEAC/100 g de miel. Lo mismo ocurre con los resultados de Ciappiani y col. (2013), quienes indican valores de CAT de $102,02 \pm 44,69$ TEAC/100 g de miel. Sin embargo, son inferiores a los encontrados por Colmenares y col. (2015) con rangos de CAT de 309,5 y 563,1 μ mol equivalente de Trolox/100 g; o los encontrados por Steinbrück y col. (2017) cuyos valores de CAT variaron entre 319,5 y 545,0 μ mol equivalente de Trolox/100 g.

Los resultados presentados en la Tabla 8, en donde se observa correlación positiva entre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante, concuerdan con el paradigma en el que se establece que la capacidad antioxidante está positivamente correlacionada con la concentración de polifenoles y/o flavonoides (Martos y col., 2000; Tomas-Barberán y col., 2001), y con la actividad antimicrobiana de la miel (Snow y Manley-Harris, 2004), de los cuales existen múltiples reportes en la literatura. Por ejemplo, Vit y col. (2008) evaluaron la actividad antioxidante total (AAT)

de 50 mieles enviadas al servicio de Análisis Químico del Instituto de Investigaciones Apícolas en Dol, República Checa, con el método del catión radical ABTS^{•+}, encontrando que la AAT no varió significativamente según el origen botánico de las mieles, pero fue directamente proporcional al color y al contenido de flavonoides y de polifenoles. Otro ejemplo lo constituye el trabajo de Pérez-Pérez y col. (2013) en el que se midió la actividad antioxidante de productos de la colmena de *Tetragonisca angustula* de Mérida (Venezuela), encontrando una fuerte correlación entre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante. Durante muchos años ha sido demostrada una correlación positiva entre la actividad antioxidante de la miel y su contenido de polifenoles en mieles de diferentes orígenes florales, geográficos y entomológicos tales como España (Pérez y col., 2007), Australia (Persano Oddo y col., 2008), Perú (Rodríguez y col., 2009), y México (Rodríguez y col., 2012), entre otros. Todos estos autores proponen un efecto sinérgico entre los polifenoles de la miel y los más de 181 compuestos presentes en una muestra de miel, tales como azúcares, aminoácidos y proteínas, carotenos, entre otros (Erejuwa y col., 2012).

En la Tabla 8 también es evidente la fuerte correlación positiva entre la concentración de proteínas y la actividad antioxidante de la miel medida por los métodos de AOA y decoloración del catión radical ABTS^{•+}. Se ha reportado que la miel contiene aproximadamente 0,5% de proteínas, principalmente como enzimas y aminoácidos. Los niveles de aminoácidos y proteínas en la miel son el reflejo del contenido de nitrógeno, el cual es variable y no supera el 0,04%. Cerca de 20 proteínas no enzimáticas se han identificado en la miel, muchas de las cuales son comunes a distintas mieles (Ulloa y col., 2010). 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 (Crane, 1985; Piana y col., 1989; Prior, 1989). De los aminoácidos, la prolina es el más abundante

de todos, le siguen la lisina, el ácido glutámico y el ácido aspártico (Kumul y col., 2015).

Las proteínas 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 éstas 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 col., 2010).

Se han encontrado y documentado cientos de sustancias bioactivas en las mieles de abejas sin aguijón, entre las que destacan las mieles producidas por *Melipona* en diferentes países (Oddo y col., 2008; Oliveira y col., 2012; Silva y col., 2013). Entre estos compuestos con actividad biológica, los compuestos que muestran gran actividad antioxidante tales como ácidos fenólicos, flavonoides y las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, 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 Kamaruddin, 2004). Es por esto que se descubrió que la actividad antioxidante de la miel está asociada a la presencia tanto de compuestos de naturaleza enzimática como la catalasa, la glucosa oxidasa y la peroxidasa; como a compuestos como el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol, los carotenoides, aminoácidos libres, ácidos orgánicos, compuestos polifenólicos, flavonoides, flavonoles, ácidos fenólicos, catequinas y derivados del ácido cinámico (Ita, 2011).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó una gran variación entre los valores de los parámetros fisicoquímicos, así como de la capacidad antioxidante, tanto en mieles que provenían de la misma provincia como de provincias diferentes (Tablas 6 y 7). Se sabe que la composición de la miel, así como capacidad antioxidante varía de gran forma según el origen botánico de la miel, condiciones climáticas, tipo de suelo, entre otras (Gheldof y col., 2002).

A pesar de la evidente relación que se ha demostrado ampliamente en varias oportunidades entre la Bioactividad de la miel y el contenido de Polifenoles y flavonoides, y en algunos casos de proteínas, el mecanismo de acción exacto no se conoce. Se ha propuesto que mecanismos como secuestro de radicales libres, donación de hidrógenos, quelación de iones metálicos, ser sustrato de los radicales como el anión superóxido y el radical hidroxilo, interferir con las reacciones de propagación, o inhibición de los sistemas enzimáticos, contribuyen con la actividad antioxidante de la miel (Maruyama y col., 2010; Al-Waili y col., 2011). Tal como se ha propuesto para los alimentos funcionales, todas las bioactividades relacionadas a la miel pueden ser atribuidas a su actividad antioxidante. Por ejemplo, la miel inhibe el crecimiento de microorganismos y hongos, a través de su efecto bacteriostático y bactericida. El efecto antimicrobiano de la miel se debe a diferentes sustancias como la glucosa oxidasa que produce el agente antimicrobiano peróxido de hidrógeno, polifenoles y flavonoides, y el bajo pH (Choudhari y col., 2012).

A pesar de que la miel producida por las abejas sin aguijones comercializada y consumida como alimento y con fines medicinales, la definición oficial de miel incluida en el Codex Alimentarius (2001), solo reconoce a la miel de *Apis mellifera*. Diversos países han normado a ciertos parámetros fisicoquímicos de calidad, pero sólo para la miel de *A. mellifera*. Debido a los atributos medicinales que se le confieren a la miel de las abejas

sin aguijón, en los mercados de diversos países latinoamericanos como Costa Rica, Guatemala, México o Venezuela, se comercializan productos adulterados o imitaciones (Vit, 2009). Lo anterior, cobra relevancia cuando se considera que mundialmente ha crecido la demanda de productos orgánicos y con propiedades funcionales que puedan influir en aspectos fisiológicos del organismo, más allá de su aporte nutrimental. En este sentido, la miel de las abejas sin aguijón podría quedar incluida en ambas categorías, debido a las características de su producción y las propiedades medicinales que se le atribuyen. Es por ello que incrementar la producción de miel de abejas sin aguijón a través de una revalorización de sus propiedades podría generar nuevas áreas de crecimiento económico y desarrollo social para las comunidades productoras. Esto plantea la necesidad de establecer parámetros fisicoquímicos de calidad para la miel de abejas sin aguijón que permitan establecer una correlación no solo con su calidad sino también con su origen entomológico y funcionalidad fisiológica.

Este tipo de trabajos en el que se evalúen parámetros de composición, tales como flavonoides, polifenoles y proteínas, así como actividad antioxidante de mieles de abejas sin aguijón, valoriza el uso de este tipo de mieles como agentes terapéuticos, sobre todo en aquellos casos en los que la medicina convencional no es suficiente. Por otra parte, continúa aportando datos y refuerza la idea de generar un manual de control de calidad para las mieles de abejas sin aguijón, el cual solo existe para las mieles de *A. mellifera*. Además, este tipo de parámetros pueden ser usados para distinguir entre mieles fraude y legítimas, proceso bastante difícil de hacer solo con los parámetros fisicoquímicos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Los valores de concentración de flavonoides se encontraron entre 47,25 y 94,96 mg equivalentes quercetina/100g de miel, los de concentración de polifenoles entre 268,2 y 1036,8 mg equivalentes ácido gálico/100g de miel; mientras que los de concentración de proteínas se reportaron entre 90,39 y 178,76 mg proteínas/100 g de miel.
2. En cuanto a la actividad antioxidante, los valores de AOA variaron entre 99 y 1,23 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel; los de porcentaje de inhibición de la forma de radical hidroxilo entre 18,74 y 91,06% de inhibición/100 g de miel d; y los de CAT entre 123,9 y 351,1 μ moles equivalentes de Trolox (TEAC/100 g de miel).
3. Para la mayoría de las muestras de miel, los valores de actividad antioxidante fueron superiores a los reportados para la quercetina, melatonina y ácido Lipoico, los cuales son fuertes antioxidantes naturales usados como comparación en este estudio.
4. Se observó para todos los parámetros medidos (parámetros bioquímicos y actividad antioxidante) una gran variabilidad, encontrando semejanza estadística entre muestras provenientes de la misma provincia como de provincias distintas, posiblemente debido diferencias en las condiciones climáticas, origen entomológico, tipo de suelo, condiciones de cultivo y almacenamiento, entre otras.
5. Se encontró una fuerte correlación positiva entre los valores de concentración de flavonoides, polifenoles y proteínas con la actividad antioxidante reportada como AOA y CAT; mientras que la correlación

positiva fue débil entre el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo y la concentración de flavonoides.

6. Los parámetros bioquímicos (polifenoles, flavonoides y proteínas) y actividad antioxidante resultaron ser útiles para valorizar una muestra de miel en función de su bioactividad, además de su valor nutritivo, lo que se adapta al paradigma de que la miel es un alimento con alta calidad nutracéutica.
7. Cada muestra de miel presentó valores de actividad antioxidante diferentes dependiendo del método utilizado, presentando algunas muestras valores de CAT bajos, pero altos o muy altos para AOA y porcentaje de inhibición del radical hidroxilo, lo que supone diferentes mecanismos de acción del tipo de moléculas presentes en cada muestra de miel, posiblemente debido a diferencias en la composición de las mismas.
8. Este es el primer estudio en el que se hace un análisis estadístico formal de los parámetros fisicoquímicos y actividad antioxidante de mieles de abeja sin agujón provenientes de las provincias del sur de Ecuador, en el marco de un proyecto de colaboración internacional llamado “Valorización de la miel de meliponini”, resultando que los valores de concentración de polifenoles, proteínas, flavonoides y capacidad antioxidante son útiles para evaluar la calidad nutracéutica de la miel de abejas sin agujón, siendo útiles estos parámetros para los fines propuestos en este trabajo. De este modo, se sugiere que estos valores sean anexados a los estándares de calidad de las muestras de miel de abejas sin agujón provenientes de las provincias del sur de Ecuador, así como de todas las muestras de miel producidas por abejas sin agujón.

Recomendaciones

1. Es necesario realizar el mismo trabajo con una muestra estadísticamente más significativa, que incluya un mayor número de mieles comerciales y auténticas.
2. Debido a que cada muestra de miel presenta diferentes mecanismos de acción dependiendo de la naturaleza de los compuestos con actividad antioxidante presentes, es importante determinar el tipo de compuestos que contribuyen con la actividad antioxidante usando técnicas como HPLC, cromatografía de gases, espectrometría de masas, así como medir la actividad enzimática de las diferentes enzimas que pueden contribuir con esta actividad antioxidante.
3. En virtud de lo valiosos de los parámetros determinados, se sugiere realizar un estudio formal en el que se evidencie la utilidad de los mismos como controladores de las mieles fraude, por ejemplo, comparando mieles de abejas sin aguijón reales con mieles fraude, y determinar las diferencias estadísticas en caso de encontrarse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljadi AM, Kamaruddin MY (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry* 85: 513–518.
- Almeida-Muradian, L.B. (2013). *Tetragonisca angustula* pot-honey compared to *Apis mellifera* honey from Brazil. En: P. Vit, S.E.M. Pedro, D.W.Roubik (Eds.), *Pot-honey. A legacy of stingless bees*, New York, USA: Springer. pp. 375–382
- Alvarado, A., Alvarado, C., Blanco, T., Castañeda, B., Muñoz, A. y Ruiz, J. (2014). Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM: Perú.
- Álvarez M, Burgués M, Colosito J, Galetti V. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en mieles mediante el método de decoloración del β -caroteno. Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología, Santa Fe, Argentina. p: 4.
- Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Fattorini D, Regoli F, Quiles JL, Battino M (2012). Radical-scavenging Activity, Protective Effect Against Lipid Peroxidation and Mineral Contents of Monofloral Cuban Honeys. *Plant Foods Hum Nutr* 67, 31–38.
- Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi A, Ansari MJ. (2011). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: Human health hazards. *The Scientific World Journal*: 1-9.
- Alzahrani HA, Alsabehi R, Boukraâ L, Abdellah F, Bellik Y, Bakhotmah BA (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules*, 17: 10540-10549.
- Anklam E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chemistry*, 63: 549–562.
- Arias F. (2006). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la metodología científica*. 5ª Edición.
- Balsano C, Alisi A. (2009). Reactive oxygen specie: A radical role in development. *Free Radical Biology and Medicine*. 49(7): 1147-1151.

- Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentacion, nutrición y salud*, 10 (2), 41-53.
- Blair C, Taylor R (2008). *Bioestadística*. Peason Prentice Hall. pp. 126.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. y Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.
- Burda S, Oleszek W. (2001), Antioxidant and anti- radical activities of flavonoids. *J. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2774-2779.
- Camargo J.M.F., Roubik D. (1991). Systematics and bionomics of the apoid obligate necrophages: The *Trigona hypogea* group *Biological Journal of the Linnean Society* 44:13-39.
- Chieruzzi Löwenstein, M.C. (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, Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica de Ecuador. 192 pp.
- Choudhari MK, Puneekar SA, Ranade RV, Paknikar KM. (2012). Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona sp.*) propolis used in the folk medicine of WesternMaharashtra, India. *Journal of Ethnopharmacology* 141, 363-367.
- Ciappini, M.C, Stoppani, F.S, Martinet, Álvarez, M.B. (2013). Actividad capturadora de radicales libres en mieles de eucalipto, trébol y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*. 19: 45-51.
- Codex Alimentarius Commission. 2001. Revised Codex Standard for Honey. CODEX STAN 12-1981. Rome, Italy: FAO/WHO.
- Colmenares, Y., Carreño, J., Peña, M. y Pérez, E. (2015). Estudio de la capacidad antioxidante y antibacteriana de mieles de origen asiático. Trabajo especial de grado. pp. 62.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (1984). Miel de Abejas. *Fondonormas*. 2194(84):5-6.
- Contreras RR. (2013). Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Correspondiente Estatal de la Academia de Mérida.

- Crane, E. 1985. El libro de la miel. Fondo de Cultura Económica. México, DF
- Cushnie, T. y Lamb, A. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 243–248.
- Da Silva IA, da Silva TM, Camara CA, Queiroz N, Magnani M, de Novais JS, Soledade LE, Lima Ede O, de Souza AL, de Souza AG. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* 141(4): 3552-3558.
- Dardón, M.J., Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia* 33: 916–922.
- Erejuwa, O., Sulaiman, S., Ab Wahab, M, Sirajudeen, K., Salleh, M. y Gurtu, S. (2012). Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; 1-14.
- Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Quinta de Santa Apolónia, Apartado 1172.
- Estrada H, Gambao M.M, Chaves C, Arias ML. (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abejas contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *ALAN*. 55(2): 2-6.
- Fernandez AW, dos Santos MR, de Menezes AP, da Silva SCh, Oda-souza M, Queijeiro AM. (2012). Composición y actividad antioxidante de la miel de abejas africanizadas y sin aguijón en Alagoas (Brasil): un análisis multivariante. *Journal of Apicultural Research*. 51 (1): 23 – 35.
- Ferrerres F, Tomás-Barberán FA, Gil MI, TomásLorente F (1991) An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 56, 49-56
- 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
- Fiorani, M., Accorsi, A., Blasa, M., Diamantini, G. y Piatti, E (2006). Flavonoids from Italian multifloral honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J. Agric. Food Chem.*, 54:8328–8334.
- Frankel S, Robinson GE, Berenbaum MR. (1998). Capacidad antioxidante y características correlacionadas de 14 mieles monoflorales. *J Apicult.* 37(1): 27-31.
- French R, Cooper A, Molan P. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemoth.* 56: 228–231.
- 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.
- Galleano M, Vertraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. (2010). Antioxidante actions of flavonoides: thermodynamics and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 501(1): 23-30.
- Gerard, J.T., Berdell, R.F., Y Christine, L. Case. (2007). Proteínas. Introducción a la microbiología. Buenos aires, Argentina: Ed. Medica Panamerica, 9na edición. Pp 43.
- 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, A. (2010). Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Medica panamericana (Ed.). Tratado de nutrición. España. pp.788
- Guisado R. Guisado B., Bordes González, García Morales MC, Fernández T. (2007). Universidad de Granada Oxidación y producción de radicales libres.
- Gutiérrez M.G, Rodríguez-Malvaer A, Vit P. (2008a). Miel de abejas: una fuente de antioxidantes. *Fuerza Farmaceutica.* 12(1):39-43.

- Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. (1987). The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*.165:215–219.
- Hernández Sampieri, Roberto Fernández Collado, Carlos Baptista Lucio, Pilar McGraw-Hill (2010). *Metodología de la Investigación*. Interamericana México.
- Hertog MG, Fesckens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *National Institute of Public Health and Environment Protection*. 342(8): 11-12.
- Ita BN (2011). Antioxidant activity of honey samples from the southernrainforest and northern savannah ecosystems in Nigeria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*; 2(8): 2115-2120.
- Jimenez, R., y Kuhn, G. (2009). Mecanismos de toxicidad no mediados por receptores. *Toxicología fundamental*. Madrid, España. pp. 172-175.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. (2001). Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *J ClinPathol*.54:356–361.
- Kücük M, Kolayli S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry* 100: 526-534.
- Kumul RC, Ruiz C, Ortiz E, Segura MR (2015). Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutr Hosp*. 2015; 32(4):1432-1442.
- Larzon RA. (1998) The antioxidants of higher plants. *Phyto-chemistry*. 27: 969-78.
- Lianda, R., Sant'Ana, L., Echevarria, A. y Castro, N. (2012). Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Soc., 23: 618-627.
- Loirish N. (1985). *Las Abejas*, Farmacéuticas Aladas. Mir. Moscú. 168-169.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Lusby P, Coombes A, Wilkinson J. (2005) Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Rev* 2005; 36:464-7.
- Manrique, A. J. (1995). Evaluación de prácticas de manejo de abejas sobre la producción de miel y cera. *Revista Zootecnia Tropical*. 13(2): 215-223.
- Martos I, Ferreres F, Yao L, D-Arcy B, Caffin N, Tomas-Barberan FA. (2000). Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 4744-4748.
- Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. 2010. Antiinflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. Of Spanish honey induces dextran-induced paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 23, 10-30.
- Mateu, A.I, Burgaz, M.M.E, Rosello, C.J. (1993). La Apicultura valenciana. Tradición y aprovechamiento. Generalidad Valenciana. Conselleria D` Agricultura y Pesca. España
- Maureen, H., y Prieto, G. E. (1999). Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana Invest Biomed*, 18, (1), 4-12.
- Michener C.D. (2000) *The bees of the world* The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London.:913.
- Montenegro G, Salas F, Peña RC, Pizarro R. (2009). Antibacterial and antifungal activity of the unifloral honeys of *Quillajasaponaria*, an endemic Chilean species. *International Journal of Experimental Botany*. 78: 141-146
- Montenegro G, Santander F, Jara, C, Nuñez G, Fredes C. (2013). Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 12(3):257-268.
- Muñoz A, Alvarado C, Blanco T, Castañeda B, Ruiz J, Alvarado A. (2014). Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM: Perú

- Muñoz, O, Copaja S, Speisky H, Peña R.C y Montenegro G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*. 39(0): 848-851.
- Nates-Parra G. (1996) Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponinae) de Colombia. Centro Editorial Javeriano, Bogotá. D.C.: 181-268.
- Oliveira PS, Sarkis RC, Gracias K, Alves C (2012). Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em meles de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (apidae, apini) da amazonia *Quim. Nova* 2012; Vol. 35, No. 9, 1728-1732.
- Pérez E, Rodríguez-Malaver AJ, Vit P. (2006). Antioxidant capacity of Venezuelan honey in Wistar rat homogenates. *Journal of Medicinal Food*. 510(6): 20-21.
- Pérez, R., Iglesias M., Pueyo, E., Gonzalez, M. y De Lorenzo, C. (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 360-365.
- Pérez-Pérez EM, Suárez E, Peña-Vera MJ, González AC, Vit P. (2013). Antioxidant activity and microorganisms in nest products of *Tetragonisca angustula*. Latreille, 1811. from Mérida, Venezuela. pp. 1-8. In Vit P & Roubik DW, eds. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>
- Persano 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. *Journal of Medicinal Food* .11(4): 789-794.
- Piana, G., G. Recceardelle y A.I. Dálbores. 1989. La miel. MundiPrensa. Madrid, España.
- Piccirillo GA, Rogríguez B, G. de Rodriguez O. (1998). Study of some physicochemical parameters of dry season honeys from eight bee zones of Zulia State, Venezuela. *Fac. Agron.* 1612(96): 488-489.
- Principal J. Morales Y, Fuselli S, Pellegrini MC, Ruffinengo S, Eguara M, Barrio C. (2012). Origen botánico de las mieles de *Apis Mellífera* L.

- producidas en la cuenca del Embalse Guaremal, Estado Yaracuy, Venezuela. *Zootecni.* 30(1): 89.
- Prior, C.M.L. 1989. La miel en la alimentación humana. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Rafecas M. (2006). Antioxidantes para una mejor calidad de vida. *Revista Acofar* (454):28-30.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta.* 436, 332-347.
- Reboiras, M. (2006) *Química: La ciencia básica.* pag 3
- Roberta RE, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay free radical biology & medicine, 26(10):1231–1237.
- Rodríguez AJ, Pérez EM, Vit P. (2007). Titulado Capacidad antioxidante de mieles Venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.* 38(2).
- Rodríguez, B., Mendoza, S., Iturriga, M., y Castaño-Tostado, E. (2012). Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *J. Food Sci.*, 77: C121-C127.
- Rodríguez-Malaver AJ, Rasmussen C, Gutiérrez MG, Gil F, Nieves B, Vit P. (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Natural Products Community.* 4: 1221-1226.
- Roubik D. (1982). Obligate necrophagy in a social bee *Science* 217:1059-1060
- Roubik D. (1989). *Ecology and Natural History of Tropical Bees* Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.: 514.
- Russo, A., R. Acquaviva, A. Campisi, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Virgata, M.L. Barcellona & A. Vanella (2000) *Cell. Biology Toxicology.* 16: 91-8

- Saavedra, O., Vásquez, E., Guapillo, M., Ceballo, G. y Bolaina, E. (2010) Radicales libres y sus papel en la enfermedades crónico-degenerativas, Revista Médica de la Universidad de Veracruz; pag. 33.
- Sabino, C. (2006). Como Hacer una Tesis. Editorial Panapo. Caracas. Venezuela.
- Silva TMS, Santos FP, Rodrigues AE, Silva EMS, Silva GSS, Novais JS (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (Meliponassubnitida) honey. Journal of Food Composition and Analysis 2013; 29, 10–18.
- Silva, J.A. (2006). Metodología de la investigación. Caracas: Co-Bo. 67-90.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152–178.
- Snow MJ, Manley-Harris M. (2004). On the nature of nonperoxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. Food Chem. 84, 145-147.
- Sote A. (2005). Principios de Estadística. Editorial Panapo de Venezuela. Caracas. pp. 143.
- Steinbrück, I., Peña, M. y Pérez, E. (2017). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos etanólicos de mieles comerciales de origen Asiático y Europeo. Trabajo Especial de Grado. pp. 50
- Tiskow G. (1996). Radicales Libres en biología y medicina. Gacetas de ciencias veterinarias. 2(1):44-57.
- Tomas-Barberán FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. J. Sci. Food Agric. 81, 485-496.
- Tomás-Barberán FA. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentos, nutrición, salud, instituto danone Vol. 10, N.º 2, pp. 41-53.
- Ulloa J, Mondragon P, Rodriguez R, Resendiz JY, Rosas P (2010a). La miel de abeja y su importancia., Revista Fuente 2010; 2(4), Nayarit - Mexico. Pp. 1-4.

- Vattuone MA, Quiroga EN, Sgariglia MA, Soberón JR, Jaime GS, Martínez ME, Sampietro DA. (2007). Compuestos fenólicos totales, flavonoides, prolina y capacidad captadora de radicales libres de mieles de *Tetragonisca angustula*, *T. fiebrigi* y de *Plebeia wittmanni*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 6(5): 299-300.
- Vit P (1993). Miel de Abejas. Consejo de Publicaciones ULA, Merida. 1(1): 97-98
- Vit P, Gutiérrez MG, Titera D, Bednar M, Rodríguez-Malaver JA. (2008). Miele checas categorizadas según su actividad antioxidante. Actabioquim.42 (2).
- Vit P, Medina M, Enríquez E. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. BeeWorld. 85: 2-5.
- Vit P, Mejías A, Rial L, Ruiz J, Peña S, González AC, Rodríguez-Malaver A, Arraéz M, Gutiérrez C, Zambrano A, Barth M. (2012). Conociendo la miel de *Melipona favosa* en la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. INHRR 43(1): 12-16.
- Vit P. (2008). Valorización de la miel de abejas sin aguijón (*Meliponini*). Vit/Revista de la Facultad de Farmacia; 50(2): 20-28
- Vit P. (2009). Caracterización fisicoquímica de mieles de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene.40(2): 7-12.
- Vit P. (2013). Mis Recetas de miel. Editor institucional Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de los Andes Mérida, Venezuela.3-5
- Vit, P, Suescún L. (2008). Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. Fuerza Farmacéutica. 12: 6-15.
- Vit, P. (1997). Quality factors and approach to the putative anticataract properties of stingless bee (*Apidae; Meliponinae*) honey from Venezuela". PhD Thesis, School of Pure and Applied Biology. Cardiff, UK: University of Wales, 233 pp.

Woisky, R, Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apiculture Research*. 37: 99-105.

Zamora LG, Arias ML. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomédica*. 22(2): 59-66.

www.bdigital.ula.ve