



**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 DE LAS REGIONES 5 y 7 DE ECUADOR**

**Autor**

Sequeda, B. Leimar, A

C.I. V- 21.168.468

**Tutor (a)**

Dra. Elizabeth Pérez

**Mérida, Febrero 2020**

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios Todopoderoso**, mi Padre Celestial por siempre estar conmigo, en cada momento de mi vida, cuidándome, ayudándome, dándome fuerzas, sabiduría e inteligencia, además de responder mis oraciones y colocándome en el lugar indicado con las personas correctas que han formado parte de mi aprendizaje a lo largo de esta carrera universitaria, sin su voluntad y provisión no hubiese podido lograrlo. Todo se lo debo a él, gracias Señor!

**A mis Padres Leonardo Sequeda y Fanny Bazán**, por darme la vida y ser los ángeles que Dios puso en mi camino para protegerme, guiarme y apoyarme con mucha comprensión y dedicación en cada paso y decisión que he tomado, por ser el ejemplo más grande de amor puro e incondicional que tengo. Todo es gracias a ustedes y por ustedes, los amo inmensamente!

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

**A la Dra. Elizabeth Pérez**, tutora de tesis, por brindarme la asesoría y herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación, por su paciencia y comprensión gracias.

**A las mejores hermanas del mundo Naireth y Leydy**, por su amor desmedido, por ser fundamentales e indispensables en todos los momentos de mi vida, en especial en esos en los que quise renunciar y con sus palabras y apoyo me dieron aliento para continuar; las amo inmenso!

**A mi hermano José Leonardo y mis sobrinos Helder Alejandro y Helder Antonio;** quienes con su inocencia y carisma llenan mis días de risas y alegrías, ustedes también son parte de esto. Los quiero mucho mis niños.

**A mi amiga Rebeca Pérez,** la hermana que me regaló la vida, a quien me ha acompañado incondicionalmente durante esta carrera universitaria y en los mejores y peores momentos de mi vida con la mejor disposición siempre de ayudarme, escucharme, apoyarme y motivarme a seguir adelante. Sin ti no hubiera sido lo mismo, te quiero infinito, gracias por tanto.

**A Mis amigas Nixi Linares, Dionela Salas, Vanessa Guillen, Letty Jaimes, Dayri Montes, Rosana Gómez, Alianis Ortega, Paola Pineda, Marlys Maldonado y Desiree Silva (Sé que desde el cielo estas feliz por mi).** Gracias a todas por su apoyo, por las risas y los llantos compartidos, con ustedes el camino fue más llevadero y feliz, son el regalo que me deja haber escogido esta ciudad y universidad como casa de estudio, las quiero.

**A mis compañeros de clases y amigos, Scarleht Rodriguez, Jose Alberto Canelones, Maria de los Angeles Gonzalez y Maria Alejandra Molina.** Gracias por toda la ayuda brindada, por transitar junto a mí este camino lleno de aprendizaje, por esos momentos únicos; en especial gracias por su amistad.

A cada una de las personas que durante el transcurso de mi carrera universitaria han formado parte de este proceso de mi vida; mi familia en general, amistades y conocidos, que de una u otra forma, me apoyaron, ayudaron e incentivaron a seguir adelante.

**Sin ustedes este logro no habría sido posible... ¡GRACIAS!**

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

<b>Pág.</b>	
	VEREDICTO ii.
	AGRADECIMIENTOS iii.
	ÍNDICE DE CONTENIDO vi.
	ÍNDICE DE TABLAS vii.
	ÍNDICE DE FIGURAS viii.
	RESUMEN 1
	INTRODUCCIÓN 5
	CAPÍTULO I. EL PROBLEMA 5
	Planteamiento del problema 10
	Justificación de la investigación 11
	Objetivos de la investigación 11
	Objetivo general 11
	Objetivos específicos 12
	Alcances de la investigación 12
	Limitaciones de la investigación 14
	CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 15
	Trabajos previos 17
	Antecedentes históricos 23
	Bases teóricas 23
	Abejas sin aguijón 23

Meliponinis	25
Meliponicultura	26
Miel	30
Composición química de la miel	31
Características químicas de la miel	32
Color	32
Aroma	33
Sabor	33
Actividad antioxidante	36
Proteínas, aminoácidos y enzimas	36
Polifenoles	36
Flavonoides	39
Radicales libres	39
Operacionalización de las variables	40
<b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>41</b>
Tipo de investigación	42
Diseño de investigación	42
Población y muestra	43
Unidad de investigación	43
Selección del tamaño muestral	43
Metodología de la investigación	44
Preparación de las muestras de miel	44
Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos	44

Determinación del contenido de flavonoides: Método colorimétrico	44
del cloruro de aluminio	44
Determinación de la concentración de proteínas	46
Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo	47
Método de la actividad antioxidante (AOA)	49
Método del catión radical ABTS+•: Ensayo de Decoloración	en 49
Solución Etanólica	50
Diseño de análisis	50
Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)	51
Pruebas Post Hoc	53
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
Resultados	54
Caracterización química de las mieles en estudio	56
Actividad antioxidante de las mieles en estudio	59
Discusión	59
Caracterización química.	60
Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos	67
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
Conclusiones	69
Recomendaciones	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.Estandares sugeridos para mieles de abejas sin aguijón.	29
Tabla 2.Operacionalización del evento de estudio.	38
Tabla 3.Muestras de miel analizadas en el presente estudio.	42
Tabla 4.Volúmenes de reactivos que se usaron para la curva de calibración en la determinación de proteínas.	45
Tabla 5.Volúmenes que se utilizaron para el método del AOA.	48
Tabla 6.Concentración media de flavonoides, polifenoles y proteínas de las muestras analizadas.	54
Tabla 7. Concentración de la actividad antioxidante de las mieles analizadas. Métodos AOA, radical hidroxilo y ABTS.	57
Tabla 8.Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Abeja sin aguijón ( <i>Meliponayucatanica</i> )	24
<b>Figura 2.</b> <i>Melipona beecheii</i>	25
<b>Figura 3.</b> Cámara de cria y ánfora de miel.	27
<b>Figura 4.</b> Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo.	41
<b>Figura 5.</b> Distribución geográfica de las muestras de miel de Meliponini analizadas.	36

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



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



PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES DE POTE DE  
MELIPONINI PROVENIENTES DE LAS REGIONES 5 y 7 DE ECUADOR

**Autor:**

**Leimar A. Sequeda B.**

**CI: 21.168.468**

**Tutora:**

**Dra. Elizabeth M. Pérez**

**RESUMEN**

La miel es un producto natural alimenticio de alto valor nutritivo que ha sido utilizado en la medicina tradicional de todo el mundo por sus propiedades curativas, antibacterianas y antiinflamatorias. Diversos estudios indican que la miel posee propiedades quimiopreventivas e inmunorreguladoras, así como fuente potencial para servir como antioxidante natural alimenticio (Fauzi y cols 2011). El objetivo de esta investigación fue analizar las propiedades químicas y actividad antioxidante de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 5 y 7 de Ecuador, para lo que se analizaron 12 muestras de miel recolectadas en diferentes provincias de Ecuador. La metodología empleada en esta investigación se basó en realizar una extracción etanólica a cada una de las mieles analizadas, y a ese extracto se le determinó la concentración de grupos fenólicos, flavonoides y proteínas. Además, se estudió la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo, Actividad Antioxidante (AOA) y Método del ABTS. Se obtuvieron concentraciones de flavonoides entre 81,5 y 146,5 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, polifenoles entre 353 y 711,7 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, proteínas entre 97,8 y 418,4 mg de proteína/100 g de miel. Los valores de AOA variaron entre 1,08 y 1,11 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, la inhibición del radical hidroxilo entre 96, 67 y 99,44% de inhibición/100 g de miel, y la CAT entre 89,8 – 155,9  $\mu$ moles equivalente de Trolox/100 g de miel. Se observó la correlación positiva entre la concentración de proteínas y flavonoides con los métodos utilizados.

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

## INTRODUCCIÓN

Las abejas sin aguijón, pertenecientes a la sub-familia Meliponinae (Hymenoptera:Apidae) son especies nativas de los trópicos y subtrópicos y presentan una mayor diversidad en América neotropical. Estas abejas producen miel, cera y otros productos que pueden ser aprovechados tanto en el campo de la nutrición como en el de la medicina. Además, por su abundancia son especies importantes en los procesos de polinización de cultivos y de plantas no cultivadas. Hasta ahora, alrededor de 500 especies han sido descritas, muchas de ellas en los trópicos del Nuevo Mundo, los cuales son considerados las principales áreas de diversificación de estas especies de insectos (Michener, 2007). Este grupo de organismos ha sido relevante en la cultura humana, debido a que proveen recursos y han sido parte de la vida social y religiosa de diversas culturas, quienes han desarrollado técnicas de manejo de estos insectos, técnicamente llamado "Meliponicultura" (Quezada *et al*, 2001).

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

Biológicamente entendemos por miel a la sustancia producida por las abejas y otros insectos sociales, a partir del néctar o melazas que ellas recolectan sobre plantas vivas, y que transforman o elaboran mediante evaporación de agua y acción de enzimas, segregadas por ellas, quedando almacenada en los alveolos o celdillas de los panales(Ulloa y cols., 2010). Este producto viscoso o cristalizado, con distinto colores, olores, aromas y sabores, y que es llamado por todos “miel de abejas”, necesita ser caracterizado porque no todas las mieles son iguales. La composición de la miel está muy relacionada con el tipo de plantas, es decir, con el origenbotánico, sobre todo en cuanto a la calidad de la miel se refiere, el modo de obtención, la temporada de recolección, y el origen geográfico. Todo esto influye de manera sustancial en el producto final (León, 2013).

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

En la Región Sur del Ecuador es una práctica común la recolección de miel de nidos naturales de abejas sin aguijón, aunque también se conserva la tradición de explotar abejas sin aguijón de forma empírica para la producción de miel y polen. Sin

embargo, estas prácticas extractivas y el incremento de la frontera agrícola están amenazando la supervivencia de estas especies. Por tal motivo, en el presente trabajo de investigación se analizaron 12 muestras de mieles de Abejas Meliponini, las cuales fueron recolectadas en diferentes provincias de la zona suroeste de Ecuador, y enviadas hasta nuestra casa de estudio para determinar por medio de diferentes métodos analíticos sus propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante. Esto en un convenio con el proyecto Prometeo titulado “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”, el cual está vinculado con la Universidad Técnica de Machala, provincia de El Oro (Ecuador).

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

Toda la metodología aplicada en la realización de este trabajo siempre estuvo enfocada en cumplir con el objetivo principal de esta investigación, la cual fue

analizarlas propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante, de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 5 y 7 de Ecuador, en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### Planteamiento del problema.

La miel ha sido definida como un fluido dulce, denso, transparente y viscoso; resultante de la acción enzimática de las abejas sobre el néctar de las flores y exudados de las partes vivas de las plantas que es producida por *A. mellifera* (White, 1971). Dentro de esta definición existe un vacío para la miel producida por *Meliponinis*, por lo que su reconocimiento es una prioridad (Souza *et al.*, 2006). En general, la miel presenta diferentes características que han sido estudiadas para reconocer diferentes tipos de miel, características que varían por factores tales como el recurso floral disponible para la obtención del polen y néctar (Molan, 1992). De los componentes más utilizados para el análisis de la miel están la composición fisicoquímica, actividad antimicrobiana y recursos florales de los que proviene. Las propiedades fisicoquímicas suelen medirse para determinar las cualidades en especial con fines de comercialización.

La tribu Meliponini pertenece al grupo de abejas corbiculadas de la subfamilia Apinae y agrupa todas aquellas abejas conocidas como “abejas sin aguijón” encontradas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Roubik, 1989). Su tamaño varía desde aproximadamente 2 mm (*Leurotrigonapusilla*) (Moure *et al.*, 1988) hasta 1,5 cm (género *Melipona*) (Michener, 2000). Junto con las abejas mieleras (*Apis mellifera*), son las únicas que poseen comportamiento altamente social (eusocialidad). Existen varios cientos de especies, pero su número real es difícil de establecer debido

a la abundancia de especies crípticas (Michener, 1990) y razas geográficas, las cuales muchas veces difieren entre sí en caracteres muy superficiales. Las abejas sin aguijón se caracterizan principalmente por tener aguijón reducido, alas con venación débil o reducida y ojos desnudos (excepto en el género *Trichotrigona* (Camargo y Moure, 1983); además construyen nidos muy característicos para albergar su cría con entradas generalmente conspicuas, las cuales en algunos casos sirven para identificar especies, y almacenan su miel en botijas elaboradas con una mezcla de cera y resina lo cual les confiere flexibilidad ante cambios de volumen ocasionados durante su fermentación, no en panales de cera más rígidos como lo hacen los miembros del género *Apis*. La miel de meliponíes muy valorada porque se emplea para el tratamiento de diversas afecciones respiratorias, dermatológicas y gastrointestinales (Vitet *al.*, 2004), lo que incrementa su valor en relación a otras especies como *Apis mellifera*.

Actualmente se reconocen siete familias de abejas en el mundo: cinco de lengua corta (*Stenotritidae*, *Colletidae*, *Andrenidae*, *Halictidae* y *Melittidae*) y dos de lengua larga (*Megachilidae* y *Apidae*) (Michener, 2000). El comportamiento social, primitivo o avanzado, se presenta en menos del 10% de las especies, originado independientemente en dos familias: *Halictidae* y *Apidae* (Snelling, 1981). También se consideran abejas silvestres aquellas diferentes de *A. mellifera* (abejas no-*Apis*) que no han sido sometidas a domesticación, en su mayoría de hábitos solitarios (una hembra cava, aprovisiona y pone huevos en un nido y generalmente no está presente cuando nace su descendencia) que construyen nidos en suelo, paredes y troncos; no producen miel ni forman grandes colonias. Este grupo de organismos han sido relevantes en la cultura humana, debido a que proveen recursos y han sido parte de la vida social y

religiosa de diversas culturas, quienes han desarrollado técnicas de manejo de estos insectos, técnicamente llamado Meliponicultura (Quezada y cols., 2001).

Las normas venezolanas para miel de abejas elaboradas en el año 1984 sugieren siete indicadores de calidad: acidez, contenido de humedad, cenizas, azúcares reductores, sacarosa, hidroximetilfurfural y actividad de la diastasa. Estas normas aún no han sido revisadas y tampoco se han incluido las mieles autóctonas producidas por abejas diferentes a *A. mellifera*.

En Ecuador existen normas de calidad sólo para la miel de abejas producida por *A. mellifera*. Es importante señalar que en Ecuador, y particularmente en la Región Sur, existen pocos estudios referentes a las abejas sin aguijón, las cuales se encuentran amenazadas por las prácticas extractivas (extracción de miel de nidos silvestres) que por lo general son destructivas, donde se desconocen aspectos como la diversidad, la biología de este grupo de insectos y tecnologías de manejo. Ante esta problemática se han desarrollado investigaciones orientadas al conocimiento de la diversidad de las abejas sin aguijón en el mencionado país, para proponer alternativas de manejo y conservación, para lo cual se realizaron viajes de recolección de especímenes a varios sectores de las provincias de Loja, Zamora y El Oro, identificándose 89 especies de abejas sin aguijón agrupadas en 17 géneros, y se determinó que el mayor número de especies correspondió al género *Trigona* (Vitet *al.*, 2016). Brasil es el único país que cuenta con una norma estatal para miel producida por abejas del género *Melipona*, en el estado de Bahia (ADAB, 2014).

Hasta ahora, los reportes químicos de la miel se concentran a la de *A. mellifera*, y solo unos pocos reportan poca información acerca de la composición química de miel producida por las abejas sin aguijón, a pesar del número estimado de 500 especies Neotropicales (Ramos, 2005). En general, los azúcares y el agua representan los componentes químicos principales de la miel (>95%); entre los primeros, fructosa (38%) y glucosa (31%) son los constituyentes principales. Los azúcares representan la porción más grande de la composición de la miel (95-99% de sólidos de la miel) mientras que las proteínas, aldehídos aromáticos, ácidos carboxílicos aromáticos y sus ésteres, carotenoides degradados, terpenoides, flavonoides y otros contribuyen al sabor de las mieles (Mendes *et al.*, 1998). Vit en el 2004, publicó la composición bioquímica de la miel de algunas especies de abejas sin aguijón, provenientes de Guatemala, México y Venezuela, en la que señala la alta cantidad de monosacáridos (60-80%), agua (15-20%), y sustancias minoritarias como minerales, sustancias nitrogenadas, ácidos orgánicos, los cuales confieren a la miel un pH de 3,6 a 4,2; además de enzimas, vitaminas y hormonas. Se han encontrado y documentado cientos de sustancias bioactivas en la miel de *Melipona* en diferentes países. Entre estos compuestos con actividad biológica, quienes muestran gran actividad antioxidante son los ácidos fenólicos, flavonoides y las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, los cuales han recibido una atención especial de grupos de investigación debido a su rol en la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Aljadiet *et al.*, 2004).

Estudios realizados en Guatemala por Gutiérrez en el 2009, han puesto de manifiesto la actividad antioxidante, la cual es atribuible al contenido de flavonoides y

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

En la actualidad diversas organizaciones e instituciones buscan impulsar a través de múltiples proyectos la conservación de la especie, la producción de la miel, y la realización de diferentes estudios, con la finalidad de identificar las sustancias presentes en este tipo de miel, así como las concentraciones que presentan dichas sustancias, y establecer concordancia de éstas con la actividad antioxidante de la miel, instaurando un adecuado valor a las mieles autóctonas y justificar la elaboración de las normas para su control de calidad.

Por lo tanto, el autor ve la necesidad de colaborar con el proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”, permitiéndose realizar el presente trabajo analítico para complementar investigaciones realizadas anteriormente, y de esta forma proporcionar información sobre las propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante presentes en 12 muestras de mieles de abejas *Meliponini* enviadas desde Ecuador. Debido a esto, en la presente investigación, fue formulado el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad antioxidante de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 5 y 7 de Ecuador, analizadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” en Facultad

de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, durante el periodo del 12 de febrero al 21 de junio del 2018?

### **Justificación de la investigación.**

Las abejas sin aguijón se distribuyen y son más diversas de forma natural en los trópicos y sub trópicos, a lo largo de su distribución este grupo de abejas es importante en los ecosistemas naturales como agente polinizador entre otros aspectos, debido a su abundancia y diversidad (Roubik 1989). Además las mieles, ceras y propóleos producidos por muchas de estas especies tienen importancia a nivel de la medicina tradicional, como alimento y con fines religiosos. Por otro lado se ha comprobado que la miel y el propóleo de *A. mellifera* poseen efectos bactericidas en el tratamiento de enfermedades tanto humanas como animales (Molan, 1992). Tomando en cuenta las propiedades medicinales que el conocimiento tradicional le atribuye a los productos de las abejas sin aguijón es importante realizar estudios para conocer y evaluar los efectos curativos, antioxidantes, antibacterianos y entre muchos otros que los productos de colmena de las abejas *Meliponinis* puedan ofrecer en el campo de la medicina humana como animal.

Debido a esto ha surgido un mayor interés en estudiar las mieles de abejas autóctonas sin aguijón (*Meliponini*) con la finalidad de promover su utilización y comercialización en diferentes países, como México, Guatemala, Venezuela, Argentina, Ecuador, entre otros. Lo que ha permitido integrar equipos de trabajo nacionales e internacionales con el fin de estudiar las mieles de abejas autóctonas, y lograr determinar su caracterización fisicoquímica y su bioactividad. Por tal razón, fueron

analizados mediante diferentes métodos analíticos 12 muestras de mieles de abejas de pote de *Meliponini* provenientes de las regiones 5 y 7 Ecuador, con la finalidad de conocer sus propiedades químicas y antioxidantes, con el objetivo a largo plazo de impulsar el uso terapéutico de estas mieles como alimento funcional, proporcionando grandes beneficios para la salud.

### **Objetivos de la investigación**

#### ***Objetivo General***

- Analizar las propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante de las mieles de pote de *Meliponini* de las regiones 5 y 7 de Ecuador.

#### ***Objetivos específicos***

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

## **Alcances y limitaciones de la investigación**

### ***Alcances de la investigación.***

La presente investigación consistió en determinar las propiedades fisicoquímicas de las mieles de pote de *Meliponini* provenientes de las zonas 5 y 7 de Ecuador, en las que se midió la concentración de fenoles, flavonoides y proteínas, así como la actividad antioxidante. La actividad antioxidante se evaluó por medio de tres técnicas diferentes: actividad antioxidante (AOA), ABTS y efecto sobre el radical hidroxilo. Todo esto permitió correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de fenoles, flavonoides y proteínas presente en las mieles.

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

### ***Limitaciones de la investigación***

Una de las limitaciones más significativas durante la realización de este trabajo de investigación fue en el aspecto económico, lo que complicó en cierto grado adquirir todos los reactivos y equipos necesarios para la aplicación de otros métodos diferentes, evitando así realizar un estudio más riguroso. Otra limitación recurrente durante este proceso analítico fueron las fallas presentadas por parte del sistema eléctrico mientras se aplicaban los diferentes métodos para la obtención de los resultados. Además, fue necesario enfrentarse a la insuficiente información bibliográfica encontrada sobre el estudio de la actividad antioxidante de la miel de abejas sin aguijón (*Meliponini*), mediante las técnicas usadas en este estudio, ya que se encontraban escasos reportes con varios años de publicación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos previos

La miel es producida exclusivamente por las abejas melíferas (*Apis* sp.) y las abejas sin aguijón (*Meliponini* sp.), y exhibe propiedades medicinales como antimicrobianas, anticancerígenas y antioxidantes. Sin embargo, no se ha incluido como un enfoque general para el manejo de enfermedades y se ha ignorado en la era farmacéutica moderna. La abeja sin aguijón, conocida localmente como lebahkelulut en Malasia, es una especie importante que está bien adaptada para los países tropicales y se ha convertido en una fuente alternativa de miel. El proyecto de reinventar la calidad de la miel (RHQ) se introdujo en 2012 para potenciar el crecimiento en la industria de las abejas sin aguijón, que tiene un impacto directo en la producción de miel de alta calidad. Los objetivos del proyecto incluyen transformar la industria en una fuente sostenible de ingresos para los apicultores, al tiempo que catalizan simultáneamente las actividades de conservación de las abejas para la polinización de plantas y cultivos, convirtiéndose así en un nuevo medio para focalizar la economía y la ecología (Mustafa *et al.*, 2018).

Cauichet *et al.* (2015) revisaron el potencial antioxidante de la miel de *Meliponabeecheii* y su relación con la salud a través de una revisión a algunas tendencias en investigación sobre los aspectos nutraceuticos relacionados con los compuestos bioactivos presentes en la miel de la especie de abeja sin aguijón, reconocida por sus características medicinales tradicionales en la Península de

Yucatán. Actualmente existe una sólida evidencia que demuestra que la miel de *M. beecheii* posee compuestos bioactivos tales como proteínas, flavonoides y polifenoles con alta actividad antioxidante. La evidencia científica obtenida permite proponer a la miel de esta especie de abeja sin aguijón como alternativa para la obtención de compuestos bioactivos con actividad antioxidante en la Península de Yucatán, y ser propuesto como alimento funcional para reducir algunos tipos de cáncer asociados al estrés oxidativo. Sin embargo, aún falta información que explique dicha actividad antioxidante; por lo tanto, de acuerdo con la literatura revisada, se ve la necesidad de abordar aspectos nutracéuticos y funcionales en correlación con los compuestos bioactivos presentes en esta miel de abeja.

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

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

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

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

## www.bdigital.ula.ve **Antecedentes Históricos**

Las abejas sin aguijón son consideradas, junto con las abejas melíferas, insectos con un alto nivel de desarrollo social y por eso se dice que son insectos eusociales. Las características que les otorgan este grado son la formación de colonias donde existen varias generaciones de obreras que comparten el cuidado de las crías y el mantenimiento del nido, además se observa una diferenciación de castas según la función reproductiva que desempeñan: reina madre fértil, obreras y machos, y entre las obreras existe una división del trabajo. Por otra parte cuando el individuo fértil muere la colonia persiste reemplazándola (Amano *et al.*, 2000; Nogueira-Neto, 1986; Wille, 1976). El hecho de que los *Meliponini* formen colonias perennes y que hayan sido los únicos productores de miel en el continente americano antes de la introducción de la abeja europea, fueron unos de los factores que propiciaron el cultivo de varias especies

de este grupo en épocas antiguas. Varios autores reportan que en Centroamérica el cultivo de las abejas sin aguijón o meliponicultura fue importante en épocas anteriores a la conquista (Crane *et al.*, 1985) citan una descripción del Obispo Diego de Landa sobre las abejas nativas del Yucatán y su aprovechamiento por los indígenas mayas. Durante la época colonial fue introducida en América la abeja europea *A.mellifera*. Gracias a la alta productividad de esta abeja, su cultivo se expandió en todo el continente y fue desplazando el de las abejas sin aguijón, las cuales producen menores cantidades de miel (Buchmann, 1996; Amador, 1991). Sin embargo, aunque en baja escala, las abejas sin aguijón siguen siendo cultivadas por los campesinos. En Costa Rica se ha encontrado que domestican colmenas de *Melipona* y nidos de *Trigona* (Sommeijer, 1990). En Brasil, los Kayapós aprovechan distintos productos de las colmenas de varias especies de abejas sin aguijón y a cada uno le pueden dar varios usos. La miel es utilizada como alimento, y como medicina para afecciones de los ojos. La cera es utilizada para elaborar objetos ceremoniales, si se quema sirve para ahuyentar insectos. Los indígenas Kayapó del Brasil utilizan la cera como aislante para sus canoas y lazos, el betumen también lo utilizan como resina para las cuerdas de los arcos y también aprovechan las larvas y las pupas como alimento (Posey, 1983). En México, los indígenas asocian el cultivo de las abejas nativas a sus ritos religiosos. Las colonias domesticadas son manejadas de manera poco eficiente, ya que durante la cosecha una parte del nido es destruido, provocando que el período de recuperación (antes de poder ser cosechado de nuevo) sea muy largo, en otros casos la colmena puede morir (Sommeijer, 1990). El escaso conocimiento de la biología reproductiva ha retrasado el desarrollo de tecnología apropiada para mejorar el cultivo.

La miel es un producto que ha utilizado el ser humano desde sus orígenes, forma parte de la dieta mediterránea desde la época de los egipcios. Cuando los antiguos egipcios hacían sus expediciones, conservaban la carne en barriles llenos de miel. Su uso está muy bien relatado en los papiros encontrados; entre otras cosas, empleaban la miel para tratar las cataratas, llagas, cortes, quemaduras; en cosmética y como alimento fortificante. (Bilbao, 1981).

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

El primer registro de abejas sin aguijón fue publicado en el año 1557 por el mercenario alemán Hans Staden en Brasil (Engels, 2009). Las abejas del género *Tetragonisca* son las más extendidas en la geografía neotropical, desde México hasta el norte de Argentina (Camargo *et al.*, 2007). Por otra parte, Schwarz(1948) consideraba solamente tres géneros de abejas sin aguijón: *Melipona*, *LestrimelitayTrigona*, éste último con varios subgéneros. Mientras que Moureen(1951) propuso 12 géneros y 19 subgéneros para la región Neotropical. En años posteriores reconsideró su propuesta,

hasta que en 1971 propuso 27 taxasupraespecíficos (géneros y subgéneros) para los Meliponinos del Nuevo Mundo, posición reafirmada por el mismo autor y por Camargo en 1989. Sin embargo, Wille(1979) formuló un nuevo arreglo con ocho géneros y 14 subgéneros. Michener (2000) revisó la clasificación de los Meliponini y basado en el análisis de gonostilos, agujones y palpos labiales de las obreras, y la genitalia de los machos, reconsideró los géneros propuestos por Moure en 1971, argumentando que su establecimiento se basa en caracteres externos de las obreras tan similares entre sí que no justifica su elevación a nivel de género; para todo el mundo reconoce 21 géneros, 17 subgéneros y sinonimiza 19 de los admitidos por Moure a saber: *Cleptotrigona*, *Hypotrigona*, *Austroplebeia*, *Pariotrigona*, *Lisotrigona*, *Trigonisca*, *Liotrigona*, *Plebeia*, *Trichotrigona*, *Dactylurina*, *Oxytrigona*, *Cephalotrigona*, *Trigona*, *Lestrimelitta*, *Melipona*, *Nannotrigona*, *Scaptotrigona*, *Paratrigona*, *Partamona*, *MeliponulayPlebeina*. Para la región Neotropical, Michener(1990) reconoce 12 géneros, mientras que Camargo y Pedro en 1992, siguen reconociendo como géneros todos los subgéneros propuestos por Moure, además de aquellos más recientes: *Camargoia* del Amazonas brasileiro, propuesto por Moure en 1989 y revisado por Camargo en 1996; y *Melliwillea*, endémico de los bosques de niebla de Costa Rica (Roubiket *al.*, 1997). *Sakagamilla*, que fue descrito por Moure en 1989, resultó ser un sinónimo de *Scaptotrigona* (Camargo y Pedro 1992). Michener (2000) sinonimiza *Aparatrigona* con *Paratrigona*, *Parapartamona* con *Partamona* y *Ptilotrigona* con *Tetragona*. En Ecuador y particularmente en la Región Sur, existen pocos estudios referentes a las abejas sin aguijón como los de Coloma (1986) que reporta para el Ecuador 73 especies, especificando que en esta región se encontraron *Melipona ebúrnea* en Palanda,

*Meliponamimetica* (gr. *fasciata*) en Sabanilla, *Meliponaindecisa* en Olmedo y San Roque, *Trigonafulviventris* en Machala y Chaguarpamba. Callebaut (2001) realizó un estudio de las abejas sin aguijón y sus prácticas de manejo por la población local en el sur occidente de Loja; mientras que Rasmussen (2004) reportó 16 especies de abejas sin aguijón para la Región Sur.

Aprender sobre las abejas sin aguijón es una pasión con diferentes facetas. El Profesor Joao Camargo, entomólogo brasileño, especializado en *Meliponini*, empezó integrando el rompecabezas de su biogeografía y las adaptaciones evolutivas. Sin su colaboración sólo se habría llegado a conocer los nombres comunes de las abejas autóctonas que almacenan miel en botijas; y también habría sido imposible el estudio de su composición por especies. En el mes de marzo de 2008, el Prof. Camargo de la Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras, Universidad de São Paulo (USP) Brasil, visitó la Universidad de Los Andes, invitado por Intercambio Científico para dictar una conferencia sobre Biogeografía histórica de *Meliponini* (*Hymenoptera, Apidae, Apinae*) en la región Neotropical. Las abejas sin aguijón (*Meliponini*) producen miel en botijas y han sido estudiadas en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. La colaboración del Prof. Camargo para identificar las especies de abejas sin aguijón en Venezuela fue muy valiosa para conocer su biodiversidad. Asimismo, la recolección sistemática de ejemplares de *Meliponini* en diversas localidades, permitió aumentar la información para el progreso de su conocimiento. Recientemente, luego de la visita de este apasionado investigador, quien además ilustra personalmente su objeto de estudio en el Liceo Bolivariano Francisco Uzcátegui Dávila de Aricagua, se generó una motivación para conocer la fauna apícola. Un grupo de aplicadas estudiantes inició la observación de

abejas sin aguijón en este pueblo del Sur del Estado Mérida. Otro grupo de estudiantes universitarios en su primer año de la carrera de Farmacia, aprendieron a recolectar sistemáticamente abejas sin aguijón en la asignatura Metodología de la Investigación, semestre U-2008. De esta manera, la visita de un científico notable, fue un estímulo para diversos niveles de interés en las comunidades humanas.

Un estudio de composición de mieles de pote fue realizado en Ecuador, en una tesis de la Pontificia Universidad Católica del mencionado país, en el año 1989 (Chieruzzi, 1989), donde se incluye la miel producida por la abeja *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811). Su composición ha sido estudiada también en Venezuela por la profesora Patricia Vit de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis en la Universidad de Los Andes. En el año 2009, Vit realizó un trabajo sobre la caracterización fisicoquímica de mieles de abejas sin aguijón (*Meliponini*) de Venezuela, donde analizó mieles producidas en Venezuela por seis especies de abejas sin aguijón: *Frieseomelitta paupera*, (Provancher 1888), *Scaura aff. Latitarsis*, (Friese 1900), *Tetragonisca angustula*, (Latreille 1811), *Plebeia sp.*, *Scaptotrigona sp.*, y una especie no identificada, obteniendo variaciones en los valores de la composición fisicoquímica de las mieles de abejas sin aguijón. Otros estudios se han realizado en diferentes países como Guatemala (Dardón y Enríquez, 2008), Colombia (Fuenmayor *et al.*, 2012), Bolivia (Ferrufino y Vit, 2013) y Brasil (Muradian, 2013). Estos estudios son indispensables para recomendar los estándares de calidad, tan necesarios para promover su comercialización e impulsar la meliponicultura de Ecuador, y de otras partes del mundo, ya que la miel de angelita tiene numerosos usos medicinales, siendo el más notable su aplicación oftálmica tópica para tratar cataratas oculares (Vit *et al.*, 2004).

## **Bases teóricas**

### ***Abejas sin aguijón***

Las abejas sin aguijón, pertenecientes a la sub-familia Meliponinae (Hymenoptera:Apidae) son especies nativas de los trópicos y sub-trópicos y presentan una mayor diversidad en América neotropical. Estas abejas producen miel, cera y otros productos que pueden ser aprovechados tanto en el campo de la nutrición como en el de la medicina; además, por su abundancia son especies importantes en los procesos de polinización de cultivos y de plantas no cultivadas. Hasta ahora, alrededor de 500 especies han sido descritas, muchas de ellas en los trópicos del Nuevo Mundo, los cuales son considerados las principales áreas de diversificación de estas especies de insectos (Michener, 2007). Este grupo de organismos han sido relevantes en la cultura humana, debido a que proveen recursos y han sido parte de la vida social y religiosa de diversas culturas, quienes han desarrollado técnicas de manejo de estos insectos, técnicamente llamado Meliponicultura (Quezada y cols, 2001).

### ***Meliponini***

Los meliponinos (Tribu Meliponini) son abejas que, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina y varias docenas o miles de obreras. Son las únicas abejas, junto con las abejas melíferas (tribu Apini), que son altamente sociables. La característica importante de los meliponinos es la carencia de aguijón funcional (Velthuis, 1997). Se caracterizan por su tamaño

relativamente grande (8-15 mm de longitud), morfología similar a abejorros o abejas melíferas, alas anteriores relativamente cortas y pelos largos en parte superior del tórax y cabeza, producen reinas ligeramente más pequeñas que las obreras, celdas reales mezcladas con celdas de obreras y machos, y la piquera es de barro. Un ejemplo de estas abejas es la *Meliponayucatanica* (Figura 1), la cual es altamente sociable, polinizadoras, muy eficientes y buenas productoras de miel y cera. El área geográfica que puede ser explotada por una especie de *Melipona* es directamente proporcional a la extensión del vuelo que sea capaz. Las especies de tamaño mediano (5 mm) pueden recorrer y recolectar a unos 600 m alrededor de su nido; mientras que las especies más grandes (10 mm) pueden recorrer de 800 a 980 m.



**Figura 1. Abeja sin aguijón *Melipona yucatanica***

A pesar de que la miel producida por las abejas sin aguijón, como el caso de *M. beecheii* (Figura 2), es 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*.



**Figura 2. Abeja sin aguijón *Melipona beecheii*.**

### ***Meliponicultura***

La meliponicultura, o la práctica de la crianza de abejas sin aguijón, se remonta a los años 2.000 a.C. en la civilización Maya. Los Mayas fueron los pioneros en meliponicultura, que ahora ha evolucionado en mantener Meliponas en colmenas artificiales para la producción de miel y polinización, a diferencia de la abeja de la miel (*A. mellifera*) que fue introducida por los conquistadores durante el siglo XVI. Curiosamente, mientras que los apicultores de los países templados mantienen una sola especie de abejas de la miel (*A. mellifera*), la meliponicultura usa cientos de especies de abejas sin aguijón. Por esta razón, no es posible establecer prácticas de manejo comunes para trabajar de manera uniforme todas las especies de abejas sin aguijón. Ciertas especies prefieren mantener las crías y almacenar la miel de una manera completamente diferente que otras especies. Estas diferencias requieren diversidad en tipos de colmenas y metodologías de mantenimiento de las abejas sin aguijón. Se puede decir que cada meliponicultor debe adaptar sus prácticas de producción a las especies de abejas que maneja y al clima de la región. En

consecuencia, a diferencia de la apicultura, en la meliponicultura hay mucho menos uniformidad en los métodos de crianza de estas especies.

La comparación de la biología reproductiva y el comportamiento entre *A. mellifera* (abejas con aguijón) y Meliponas (abejas sin aguijón) ayuda a resaltar algunas diferencias entre estas dos familias de abejas. Ambas familias se reproducen por formación de enjambres para formar nuevas colonias. La mayoría de los lectores están familiarizados con un enjambre *A. mellifera* o las abejas de la miel en la cual la abeja reina madre dejará su colonia original con más de tres cuartos de la población de la colmena, estas abejas se desligan de su colonia original y se valen por su propia cuenta para encontrar una cavidad para comenzar una nueva colonia. A diferencia de las abejas de la miel, las Meliponas antes de formar un nuevo enjambre, las obreras de la colonia madre deben encontrar una cavidad adecuada, suministrarla con el polen y miel provenientes de la colonia madre, y comenzar a construir lo que formará parte la cámara de cría para la nueva colonia (Figura 3). Una vez que esta preparación se ha completado, a diferencia de las abejas de la miel, una nueva reina virgen sale de la colonia madre y viaja a la nueva ubicación, con aproximadamente la mitad de las abejas de la colonia madre. Si la primera reina fracasa posteriores reinas pueden viajar hasta que una sea exitosa. Es bastante habitual para una colmena de Meliponas tener múltiples reinas. Además de esto existe una asociación entre la colonia madre e hija que puede durar varios meses, suministrando polen o néctar que la nueva colmena necesite y dura hasta que el último individuo del enjambre original muera.



**Figura 3. Cámara de cría y ánforas de miel de *Melipona beecheii*.**

### ***Miel***

La miel es un producto natural alimenticio de alto valor nutritivo que ha sido utilizado en la medicina tradicional de todo el mundo por sus propiedades curativas, antibacterianas y antiinflamatorias. Diversos estudios indican que la miel posee propiedades quimiopreventivas e inmunorreguladoras, así como fuente potencial para servir como antioxidante natural alimenticio (Fauzi, 2011). La miel es una compleja mezcla de carbohidratos y de compuestos mínimos producidos en la naturaleza. Se produce en casi todos los países del mundo y se considera un importante alimento energético; sin embargo, no se puede considerar como un alimento completo para los estándares nutricionales humanos, sino que constituye más bien un suplemento dietético potencial (Rodríguez, 2004). Biológicamente se define como miel a la sustancia producida por las abejas y otros insectos sociales, a partir del néctar o melazas que ellas recolectan sobre plantas vivas y que transforman o elaboran mediante evaporación de agua y acción de enzimas, segregadas por ellas, quedando almacenada en los alveolos o celdillas de los panales (Ulloa, 2010).

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

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

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

o de excreciones de insectos succionadores de plantas sobre partes vivas de las plantas, las cuales son recolectadas, transformadas mediante la combinación con sustancias específicas de las abejas, depositadas, deshidratadas, almacenadas, y dejadas en el panal hasta su maduración" (Codex Stan 2001). Puede observarse la ligera variación al final de la definición, donde se incluye la deposición y la deshidratación. Este proceso en la búsqueda de expresiones completas y detalladas para simplemente definir un producto milenario, puede indicar la rigurosidad de las comisiones que participan en las discusiones de la norma de miel de abejas (Tabla 1).

**Tabla 1. Estándares sugeridos para mieles de abejas sin aguijón, comparados con el Codex alimentario Oficial para mieles de *Apis mellifera* (Vitet *al.*, 2004).**

<b>Composición de Miel</b>	<b>Estándares</b>			
	<b><i>Apis mellifera</i></b>	<b><i>Melipona</i></b>	<b><i>Scaptotrigona</i></b>	<b><i>Trigona</i></b>
<i>Contenido de agua (g/100g)</i>	máx. 20,0	máx. 30,0	máx. 30,0	máx. 30,0
<i>Azúcares reducidos (g/100g)</i>	mín. 65,0	mín. 50,0	mín. 50,0	mín. 50,0
<i>Sacarosa (g/100g)</i>	máx. 5,0	máx. 6,0	máx. 2,0	máx. 6,0
<i>Acidez (meq/100g)</i>	máx 40,0	máx. 70,0	máx. 85,0	máx. 75,0
<i>Cenizas (g/100g)</i>	máx. 0,5	máx. 0,5	máx. 0,5	máx. 0,5
<i>HMF (mg/kg)</i>	máx. 40,0	máx. 40,0	máx. 40,0	máx. 40,0
<i>Actividad de la Diastasa (DN)</i>	min. 8,0	mín. 3,0	mín. 3,0	mín. 7,0

En referencia a la definición en la norma regional europea para miel Conjunto FAO/OMS (1969) puede observarse que se mantiene la importancia de los insectos

succionadores, cuyas excreciones azucaradas son utilizadas por las abejas para producir miel de mielada en lugar de miel de néctar, pero se elimina la expresión de abeja obrera.

### **Composición Química de la Miel**

Hasta ahora, los reportes químicos de la miel se concentran a la de *A. mellifera*. La composición química de la miel es dependiente en gran medida de los tipos de flores utilizadas por las abejas, así como también, por las condiciones regionales y climáticas. La cotización de una miel en el mercado internacional está determinada en gran parte en base a su color, sabor y densidad. Una amplia gama de constituyentes menores están presentes en la miel, muchos de los cuales se sabe presentan propiedades antioxidantes. Estudios iniciales sobre la composición fisicoquímica de la miel de abejas sin aguijón son reportados para las especies de la sub-tribu Trigonini (*Tetragonisca angustula*, *Plebeiadroranay Cephalotrigonacapitata*) y Meliponini

(*Meliponaquadrifasciata* y *M. scutellaris*) (Marchini *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998; Almeida, 2002; Oliveira *et al.*, 2005).

Aunque hay una gran variedad de especies de abejas sin aguijón, sólo ha sido estudiada la miel de pocas de ellas, a diferencia de las mieles producidas por la abeja europea o abeja melífera que se ha estudiado mucho más. Aun así, es fácil notar la diferencia entre una miel de abeja melífera y una de abeja sin aguijón, ya que esta última tiene normalmente mayor acidez y cantidad de agua, menos diastasa (una enzima de origen vegetal) y un contenido de azúcares diferente. Todo eso hace que las mieles de las abejas sin aguijón sean más líquidas y tengan un sabor diferente,

normalmente más ácido, en comparación con la miel de abejas melíferas. La fermentación propia de las mieles de abejas sin aguijón es una cualidad positiva que incrementa su capacidad antioxidante, lo cual puede ser parte de su potencial medicinal.

### ***Características Físicas de la Miel***

Los colores de la miel pueden variar desde casi transparente hasta miel casi negra, lo cual es debido a pequeñas cantidades de pigmentos (carotenoides, clorofila y xantofila) que establecen la diferencia entre una miel clara y otra oscura (Suescún y Vit, 2008). El color oscuro no significa que la miel sea de calidad inferior, por el contrario, se sabe que cuanto más oscura es la miel más rica es en fosfato de calcio y en hierro y, en consecuencia, es la más indicada para satisfacer las necesidades de los organismos en crecimiento, de los individuos anémicos y de los intelectuales sometidos a esfuerzos mentales. La miel de color claro es más rica en vitaminas A. Las mieles oscuras son más ricas en vitaminas B1 y C (Zandalema, 2008).

El aroma debe ser característico del origen floral del cual provenga la miel, libre de aromas extraños (Zandalema, 2008). Vit (2008) menciona que las mieles de *Meliponas* suelen tener un olor más floral que las mieles de *A. mellifera*, como si modificaran menos el néctar.

El sabor es una característica muy importante de la miel, sin embargo, es la más difícil de describir. Actualmente, es imposible describir el sabor de la miel, pero se espera que pronto se desarrolle instrumentación que lo pueda llevar a cabo. El sabor de las mieles de color claro es más fino que el de las mieles de color oscuro, que lo

tienen más intenso (Zandalema, 2008; Suescún y Vit, 2008). Grajales-Conesa *et al.* (2011) indican que especies de *Meliponas* como *M. quadrifasciata*, son atraídas por los aromas florales de una amplia variedad de plantas como el caso de los cítricos, lo que indicaría el sabor característico de la miel de esta especie.

### ***Actividad Antioxidante de la miel (AAT)***

Los polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos participan en la actividad antioxidante de la miel, junto con una variedad de compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas), carotenoides y vitamina C, que son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante (Gutiérrez *et al.*, 2008; Vitet *al.*, 2008). Franke *et al.* (1998) estudiaron 19 mieles uniflorales con el método de DPPH y obtuvieron valores de AAT (10<sup>-5</sup> µeq) comprendidos entre 21,3 y 432,0. Estos autores indican que la composición química (contenido de azúcares individuales, cenizas, nitrógeno, contenido de metales) de la miel de abeja puede variar según la especie floral que se utiliza como fuente del néctar. Además de esto, dichos autores sugieren que las propiedades antioxidantes de la miel están relacionadas con su color y contenido de humedad, ya que muchos de los pigmentos que contiene (tales como carotenoides y flavonoides) presentan actividad antioxidante y el contenido de agua de la miel puede determinar el grado de acumulación de compuestos antioxidantes solubles en agua. Estos factores pueden ser los responsables de las variaciones en AAT encontrados dentro de cada grupo botánico (Vitet *al.*, 2008). Muchos compuestos fenólicos reportados poseen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere su actividad antioxidante. Las células vivas poseen una capacidad limitada

para anular la actividad de los radicales libres, la ingestión de antioxidantes puede ayudar a la protección de las células y por tanto su función fisiológica. Estos antioxidantes son generalmente obtenidos a partir de la alimentación que incluya vitaminas C y E,  $\beta$ -caroteno y una amplia variedad de compuestos fenólicos y flavonoides.

### ***Proteínas, aminoácidos y enzimas***

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo, que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacenamiento (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas), etc. Son macromoléculas formadas por cadenas de unidades estructurales, los aminoácidos. Estos aminoácidos se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo  $\alpha$ -amino (imino), con pérdida de agua. La secuencia de aminoácidos que componen una proteína constituye su estructura primaria, de vital importancia desde el punto de vista nutricional. A pesar de su diversidad funcional (enzimática, de transporte y almacén, mecánica, motilidad, protección, reguladora, etc.) un 25% es proteína estructural y hemoglobina (Gutiérrez *et al.*, 2008).

La miel contiene en torno al 0,5% de componentes proteicos, principalmente en forma de enzimas y aminoácidos libres. Su origen puede estar tanto en la abeja (enzimas) como en el material vegetal (aminoácidos libres y otras proteínas). Algunos

estudios basados en análisis de la composición u origen de las proteínas en la miel mencionan que, al menos diecinueve bandas de proteínas se han detectado por tinción de plata SDS-PAGE en mieles de plantas de diferente origen (Marshall y Williams, 1987). La miel contiene proteínas en mínimas cantidades y diversas enzimas que son componentes importantes tales como  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, amilasa y glucosa oxidasa.

La calidad de la miel en cuanto a la presencia de aminoácidos y la cantidad total de aminoácidos libres está comprendida entre 10 y 200 mg/100g. Solamente el aminoácido prolina representa un 50% de estos compuestos. Este aminoácido se usa como índice de calidad referido a la maduración de la miel y de posibles adulteraciones, de esta forma si la miel ha sido recogida inmadura o si las abejas han sido alimentadas con azúcar comercial, el contenido en prolina será anormalmente bajo (White *et al.*, 1978).

### **Polifenoles**

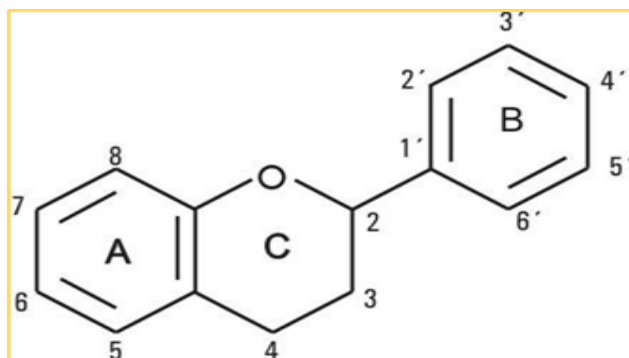
Los Polifenoles son compuestos antioxidantes, que destacan por luchar contra los radicales libres en nuestro organismo. Estos son agentes oxidantes que causan el desgaste de nuestras células y se producen a consecuencia de nuestro metabolismo. Así, son los responsables de provocarnos envejecimiento e incluso enfermedades graves en algunos casos. (Guisado *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que los polifenoles dietéticos juegan un papel importante en la salud humana. Se ha reportado que la ingesta elevada de verduras, frutas, cereales

integrales y algunas bebidas (té, jugos, vinos) que son ricos en polifenoles previenen o retrasan una serie de muchas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica y muchas enfermedades degenerativas. Muchas de las actividades biológicas de los compuestos fenólicos se atribuyen a su capacidad antioxidante (Guisado *et al.*, 2007). En mieles, también se han utilizado como marcadores del origen botánico, ya que se han encontrado considerables diferencias entre mieles monoflorales, tanto en los tipos de polifenoles que aparecen, como en la concentración de éstos (Bogdanovet *al.*, 2004).

### **Flavonoides**

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



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

Al ser parte fundamental de la biología vegetal, los flavonoides responden a la luz controlando los niveles de las auxinas (hormonas vegetales) reguladoras del crecimiento, además intervienen en la diferenciación de las plantas y potencian la polinización al conferir coloración. Por ende, se encuentran en numerosos frutos, plantas y semillas logrando más de 5.000 flavonoides distintos. La abeja obtiene estos compuestos del néctar y los propóleos.

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

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

### ***Radicales libres***

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

## Operacionalización del Evento de Estudio.

La operacionalización permite identificar aquellos aspectos perceptibles de un evento que hacen posible describir la presencia o intensidad de éste (Hurtado, 2012). Estos aspectos son los indicios (en otros contextos denominados indicadores) que pueden agruparse de manera que conforman conceptos más específicos que el evento, pero que forman parte de él, y de esta manera construir el instrumento para la recolección de datos. De acuerdo a lo antes mencionado, a continuación, se presenta en la Tabla 2 la Operacionalización del evento de estudio, realizado en este trabajo de investigación.

**Tabla 2. Operacionalización del evento de estudio.**

<i>Evento de estudio</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Tipo de variable</i>
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 <i>et al.</i> , 2008).	-Fenoles -Flavonoides -Proteínas	Dependiente

**Tabla 2.Operacionalización del evento de estudio (Continuación)**

<i>Evento de estudio</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Tipo de variable</i>
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 (Guisado <i>et al.</i> , 2007)	Los polifenoles, flavonoides y proteínas participan en la actividad antioxidante de la miel, junto con una variedad de compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas), carotenoides y vitamina C, que son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante (Vitet <i>et al.</i> , 2008).	-Radical Hidroxilo - Radical ABTs - AOA	Dependiente

## **CAPÍTULO III.**

### **MARCO METODOLÓGICO.**

#### **Tipo de investigación**

La presente investigación fue de tipo analítica ya que el grado de elaboración fue analizar las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de las mieles de pote de *Meliponini* a través de ciertos parámetros bioquímicos y su capacidad antioxidante (Hurtado, 2010).

#### **Diseño de Investigación**

Las estrategias que se implementan para recolectar los datos de un proceso de investigación constituyen el diseño (Hurtado, 2010). En tal sentido, esta investigación fue de laboratorio, puesto que el análisis de las muestras recolectadas se realizó en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. Respecto al tiempo de recolección de los datos, este estudio es de tipo retrospectivo, debido a que las muestras fueron recolectadas antes del periodo de desarrollo de la investigación; y longitudinal, puesto que los datos se recolectaron a través del tiempo en puntos o periodos especificados.

## Población y Muestra

La población estudiada en el presente trabajo de investigación es finita, integrada por 12 muestras de miel (aprox. 4 g c/u), recolectadas en diferentes ciudades de la zona sur de Ecuador, desde el 08 de diciembre de 2014 hasta el 10 de marzo de 2015 (Figura 5, Tabla 3).



Figura 5. Distribución geográfica de las muestras de miel de *Meliponini* analizadas (Elaborado por el autor).

**Tabla 3. Descripción de las muestras de miel usadas en el presente**

<i>Nº</i>	<i>Contacto</i>	<i>Fecha de recepción</i>	<i>Provincia</i>	<i>Nombre común</i>
85	Victorsuarez	12/02/15	Guayas	Abeja
90	David Briones	13/02/15	Guayas	Abeja
91	Oscar Robles	11/12/15	Loja	Catana
96	Marlenis Valencia	29/02/15	Los Rios	Walis
97	Vicente Aguilar	29/02/15	El Oro	Abejas aceite de eucalipto
98	Voltaire Medina	29/02/15	El Oro	Cananambo
99	Silvio Loayza	29/02/15	Santa Elena	Catiana
100	Fernando Malavé	29/02/15	Santa Elena	Abeja
102	Vendedor Ambulante	29/02/15	Santa Elena	Abeja
103	Manuel Sánchez	29/02/15	El Oro	Abeja (miel roja)
104	Teresa Flores	10/03/15	Cochabamba	Abeja
105	Carolina Yanchipan	10/03/15	Guayas	Abeja

## **Unidad de Investigación**

La unidad de investigación está conformada por 12 muestras de mieles de abejas *Meliponini*, pertenecientes a la zona suroeste de Ecuador, enviadas al Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Universidad de los Andes.

## **Selección del Tamaño Muestral**

De un total de 40 muestras recolectadas y enviadas por algunos integrantes del proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”, fueron seleccionadas 12 muestras las cuales pertenecen a la zona suroeste de Ecuador.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **Metodología de la investigación**

### ***Preparación de los extractos de miel***

Se pesaron exactamente ( $0,10 \pm 0,01$ ) g de miel, en cada tubo eppendorf, donde seguidamente se le agregó 1 mL de etanol 95% (v/v), luego fueron situados en un homogeneizador de vidrio (Thomas No. A3528, USA), hasta encontrarse perfectamente homogeneizados, posteriormente fueron centrifugados en una centrífuga BHG Optima II a 3000 rpm por 10 min, y por último, se procedió a trasvasar los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios, los cuales fueron usados para los ensayos bioquímicos.

### ***Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos***

El contenido total de polifenoles fue determinado por espectrofotometría a 765 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Fueron mezclados 100  $\mu$ L de muestra con 500  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 con agua, y se le agregaron 400  $\mu$ L de carbonato de sodio 7,5% (p/v). Fue registrada la absorbancia después de 10 min de reacción a 37°C, usando como blanco una muestra preparada con agua destilada. La concentración total de polifenoles fue determinada usando una curva de calibración usando una solución de 0,1 g/L de ácido gálico como estándar (0, 0,25, 0,05 y 0,1 g/L).

### ***Determinación del contenido de flavonoides: Método colorimétrico del cloruro de aluminio.***

El método colorimétrico del cloruro de aluminio fue modificado del procedimiento reportado por Woisky y Salatino (1998). La Quercetina se utilizó como estándar para construir una curva de calibración. Diez miligramos de Quercetina fueron disueltos en etanol al 80% (v/v), posteriormente diluidos hasta concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu$ g/mL. Las soluciones estándar diluidas (0,5 mL) fueron mezcladas por separado con 1,5 mL de etanol al 95% (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1 mL de acetato de potasio 1M y 2,8 mL de agua destilada. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, fue medida la absorbancia de la mezcla de reacción a 415 nm. La cantidad de cloruro de aluminio fue sustituida por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5 mL de extractos etanólicos de las muestras en estudio se dejaron reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides.

### ***Determinación de la concentración de proteínas***

La determinación de la concentración de proteínas consistió en una técnica colorimétrica basada en el método de Lowry *et al.*, (1951). Primero se realizó una curva de calibración usando Albumina Bovina (BSA) como estándar [8 mg de BSA en 10 mL de H<sub>2</sub>O MQ]. A la solución de BSA se le midió la densidad óptica a 279 nm y se le determinó la concentración por medio de la fórmula:

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

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

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

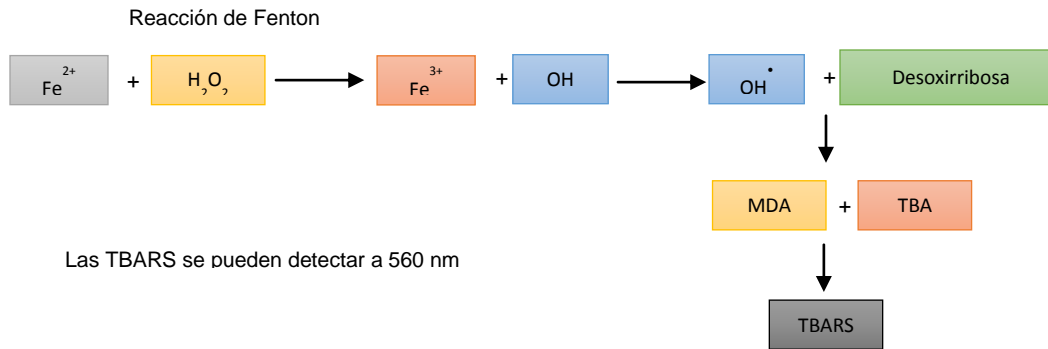
<b>V<sub>BSA</sub> (μL)</b>	<b>V<sub>Agua</sub>(μL)</b>	<b>V<sub>Sol C</sub> (μL)</b>
0	500	1500
50	450	1500
100	400	1500
200	300	1500
300	200	1500

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 H<sub>2</sub>O MilliQ, 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.

### ***Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo***

Se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell *et al.* (1987) el cual se muestra en el Esquema 1. En este método el radical hidroxilo se generó por medio de la reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso oxida al peróxido de hidrógeno para formar la especie OH<sup>•</sup>. En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa se fragmentó hasta Malondialdehído (MDA) que forma un complejo con el ácido tiobarbitúrico conocido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), detectable a 532 nm. Para llevar a cabo la reacción fueron agregados los siguientes reactivos 0,1 mL de desoxirribosa 28 mM, 0,5 mL de buffer fosfato (pH 7,4) 40 mM, 0,1 mL de FeCl<sub>3</sub> mM, 0,1 mL de EDTA 1,04 mM, 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, 0,1 de ácido ascórbico 1 mM, y 0,2 mL de cada extracto etanólico. Esta mezcla fue incubada por 1 h a 37°C. Entonces, se agregaron 0,5 mL de TBA 1% (p/v) en 0,05 M de NaOH y 0,5 mL de ácidotricloroacético 2,8% (v/v) y se dejó reaccionar por 10 min a 100°C. Fue registrada la absorbancia a 532 mM.



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

Las soluciones 4 y 9 se prepararon inmediatamente antes de su uso. El buffer fosfato de sodio y el benzoato de sodio se almacenaron en el refrigerador (0-4 °C) y el ácido úrico en el congelador (-20 a -30 °C). Cada muestra (A1) tuvo su propio control (A0, muestra blanco) en la cual la mezcla Fe-EDTA y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se agregaron después del ácido acético 20%. Para cada serie de análisis se preparó un control negativo (K1 y K0), por triplicado conteniendo los mismos reactivos que A1 o A0, excepto que la muestra antioxidante fue reemplazada con buffer fosfato. Los estándares contenían 1 mM de ácido úrico (UA1 y UA0) y fueron usados en la calibración. Para el análisis se pipetearon en los tubos los volúmenes (en microlitros) especificados en la Tabla 5.

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

	A1	A0	K1	K0	UA1	UA0
<i>Muestra</i>	10	10	-	-	-	-
<i>Ácido úrico</i>	-	-	-	-	10	10
<i>Buffer</i>	490	490	500	500	490	490
<i>Benzoato de Sodio</i>	500	500	500	500	500	500
<i>Ácido acético</i>	-	1000	-	1000	-	1000
<i>Fe-EDTA</i>	200	200	200	200	200	200
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	200	200	200	200	200	200
<i>Incubar por 60 min a 37°C</i>						
<i>Ácido Acético</i>	1000	-	1000	-	1000	-
<i>TBA</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000

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:

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

**K**= absorbancia del control (K1-K0), **A**= absorbancia de la muestra (A1-A0), **UA**= absorbancia de la solución de ácido úrico (UA1-UA0), **CUA**= es la concentración de ácido úrico (en mM).

### ***Método del Cation Radical ABTS<sup>•+</sup>: Ensayo de Decoloración en Solución***

#### ***Etanólica***

Se usó el método desarrollado por Reet *al.* (1999). En este método el ABTS se diluyó en agua a una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) 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 la solución de ABTS<sup>•+</sup> se diluyó con etanol hasta una absorbancia de 0,70 (±0,02) a 734 nm a 30°C, lo cual se logró mezclando aproximadamente 40 µL de la solución de ABTS y 960 µL de etanol al 20% (v/v). Se tomaron 10 µL de las soluciones stock de antioxidantes fenólicos preparados en etanol y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro con 1,0 mL de la solución de ABTS<sup>•+</sup>. 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  $\mu\text{M}$ , en buffer PBS 5 mM (pH 7,4) (el cual fue usado como antioxidantes en plasma y para el patrón). Se calculó el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical ABTS) a 734 nm después de 6 min de reacción, luego se realizó una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), y se reportó el valor de actividad antioxidante total (AAT) de las muestras problemas en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de AAT para una muestra dada sería el equivalente en concentración de Trolox que produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones se llevaron a cabo tres veces, para cada una de las muestras y soluciones estándar.

## **Diseño de Análisis**

La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. En la presente investigación se empleó el diseño de análisis estadístico obtenido de las pruebas bioquímicas de determinación del contenido de flavonoides, concentración de grupos fenólicos, concentración de proteínas, estudio de la capacidad antioxidante sobre el Radical Hidroxilo, Método de la Actividad Antioxidante (AOA) y Método del ABTS. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado aplicando los test o pruebas paramétricas, para el análisis de distribución normal o diferencias significativas entre los grupos de muestra. Se empleó el sistema cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas, empleándose el análisis de la varianza por medio de la prueba ANOVA *post hoc* Scheffé.

## Análisis de Varianza con un factor (ANOVA)

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

### Pruebas Post-Hoc

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

## CAPÍTULO IV.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### Resultados

Las 12 muestras de mieles analizadas en este trabajo de investigación fueron seleccionadas de un total de 40 muestras recolectadas y enviadas en colaboración con el proyecto Prometeo “Valorización de mieles de pote producidas por *Meliponini* de Ecuador”. Las muestras escogidas pertenecen a la zona suroeste de Ecuador, regiones 5 y 7 específicamente. Estas muestras fueron analizadas en el laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” en Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de los Andes, donde se les determinó la concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas; y también se logró determinar la actividad antioxidante de acuerdo a tres métodos (efecto sobre el radical hidroxilo, ABTS y AOA). Las determinaciones antes mencionadas fueron comparadas por medio de métodos estadísticos para observar la relación entre la concentración de sus componentes con la actividad antioxidante presente en la muestra.

#### ***Caracterización Química de las Mieles en Estudio***

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la concentración de flavonoides, polifenoles y proteínas de cada una de las muestras de miel usadas en este estudio. En cuanto a la concentración de flavonoides los rangos de los mismos se encontraron entre 71,2 y 112,0 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, presentándose un amplio rango de valores de concentración de flavonoides para las diferentes muestras

en estudio. A su vez, algunos valores estadísticamente similares entre algunas mieles de la misma provincia como las muestras 79 y 80 con concentración media de 90,6 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel; así como también existe similitud entre algunas mieles de diferentes provincias como las muestras 99 y 102 con concentración media de 112 y 113 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel (Tabla 6).

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

N°	Flavonoides (mg equivalentes de quercetina/100 g de miel)	Polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel)	Proteínas (mg equivalentes de proteína/100 g de miel)
<b>GUAYAS</b>			
85	81,5 ± 0,3b	392,0 ± 1,3b	97,8 ± 4,9 <sup>a</sup>
90	87,6 ± 0,7c	536,0 ± 0,7e	98,1 ± 3,5 <sup>a</sup>
105	90,6 ± 0,2d	511,6 ± 7,9e	374,0 ± 20,2c
<b>LOJA</b>			
91	100,6 ± 0,9f	927,5 ± 9,5h	210,1 ± 5,9b
<b>LOS RIOS</b>			
96	90,6 ± 1,3d	353,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	217,5 ± 4,3b
<b>EL ORO</b>			
97	87,6 ± 0,4c	471,1 ± 1,7c	336,9 ± 6,7c
98	92,7 ± 0,2e	531,3 ± 3,9e	418,4 ± 12,8d
103	146,5 ± 0,1h	512,3 ± 1,3e	286,9 ± 7,0b
<b>SANTA ELENA</b>			
99	112,0 ± 1,3g	520,7 ± 3,5e	333,2 ± 11,1c
100	71,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	693,9 ± 2,3f	324,0 ± 15,7c
102	113,0 ± 0,4g	711,7 ± 2,0g	261,0 ± 9,1b
<b>COCHABAMBA</b>			
104	82,7 ± 0,1b	474,4 ± 2,8c	247,1 ± 7,7b

De igual forma, el contenido total de polifenoles de las muestras en estudio fue determinado por espectrometría usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, empleando una curva de calibración de ácido gálico como estándar. Los resultados de la determinación de la concentración de polifenoles se presentan en la Tabla 6, donde se puede observar que los valores de concentración de polifenoles se encontraron entre 392,0 y 771,7 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, siendo la muestra 85 (Guayas) la que presentó el menor valor de concentración de polifenoles, y la muestra 102 de miel (Santa Elena) la del mayor contenido de polifenoles. En líneas generales, se presenta un amplio rango de valores de concentración de polifenoles entre las mieles en estudio, encontrándose valores estadísticamente iguales entre muestras de miel de la misma provincia (muestras 90 y 105, de Guayas, con una concentración media de 536,0y 511,36 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, respectivamente); así como las muestras 98 y 103 de la provincia El Oro, con concentraciones de polifenoles de 531,3 y 512,3mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, respectivamente (Tabla 6).

En cuanto al cálculo de la concentración de proteínas se utilizó el Método de Lowry *et al.* (1951), usando una solución de albúmina bovina como estándar. Los resultados de la concentración de proteínas se presentan en la Tabla 6, siendo la muestra 85 (Guayas) la que presentó el menor valor de concentración de proteínas (97,8 mg de proteína/100 g de miel) de la misma forma que en el caso de los polifenoles; mientras que la muestra de miel 98 (El Oro) mostró el mayor valor de concentración de proteínas (418,4 mg de proteína/100 g de miel); siendo estadísticamente iguales las muestras 85 y 90 de la provincia (Guayas) y las muestras 99 y 100 correspondientes a la provincia Santa Elena (Tabla 6).

### ***Actividad antioxidante de las mieles en estudio***

Una vez realizada la caracterización química de las muestras en estudio, se procedió a determinar la actividad antioxidante de las mismas por medio de 3 métodos. Los resultados se representan en la Tabla 7. En primer lugar, el método del AOA tiene como objetivo analizar la actividad antioxidante de una muestra usando como patrón de comparación el ácido úrico, el cual es un potente antioxidante no enzimático. El valor obtenido se conoce como Actividad Antioxidante (AOA) y se expresa en mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel. Los valores de AOA para las mieles en estudio fueron muy cercanos, desde 1,08 y 1,11 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, siendo las muestras 85, 91, 100 y 105 las que presentan el valor más bajo, mientras que las muestras 96, 97, 98 y 99 fueron las que presentaron el mayor valor de AOA (1,11 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel) (Tabla 7). Se encontró correlación lineal positiva entre el contenido de flavonoides ( $R^2=0,723$ ), concentración de proteínas ( $R^2=0,907$ ) y polifenoles ( $R^2=0,971$ ) con la actividad antioxidante medida por el método del AOA. Por último, todas las muestras de miel usadas en este ensayo presentaron valores de AOA superiores a las reportadas para la quercetina, melatonina y ácido lipoico, los cuales son antioxidantes comerciales y purificados usados como comparación en este trabajo (Tabla 7).

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

Nº	AOA (mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel)	Radical Hidroxilo (% de inhibición)	ABTs (µM equivalentes de Trolox/100 g de miel)
<b>GUAYAS</b>			
85	1,08 ± 0,00c	96,67 ± 0,18d	155,9 ± 1,1e
90	1,09 ± 0,00d	99,75 ± 0,01e	128,0 ± 4,3d
105	1,08 ± 0,00c	97,77 ± 0,06d	128,0 ± 2,8d
<b>LOJA</b>			
91	1,08 ± 0,00c	98,43 ± 0,02e	121,7 ± 3,1d
<b>LOS RIOS</b>			
96	1,11 ± 0,00f	97,64 ± 0,15d	89,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>EL ORO</b>			
97	1,11 ± 0,00f	98,85 ± 0,02e	110,1 ± 1,7c
98	1,11 ± 0,00f	98,36 ± 0,02e	126,5 ± 0,6d
103	1,09 ± 0,00d	98,35 ± 0,03e	152,5 ± 2,0e
<b>SANTA ELENA</b>			
99	1,11 ± 0,00f	99,44 ± 0,03e	110,7 ± 0,9c
100	1,08 ± 0,00c	98,00 ± 0,01e	176,8 ± 1,6f
102	1,10 ± 0,00e	98,47 ± 0,04e	98,8 ± 0,3b
<b>COCHABAMBA</b>			
104	1,10 ± 0,00e	93,5 ± 0,51c	110,9 ± 1,8c
<b>Antioxidantes Comerciales (preparados a 1 Mm)</b>			
Quercetina	0,86±0,03b	53,0±1,10b	100,6±1,70c
Melatonina	0,83±0,02b	53,9±1,07b	97,6±5,10b
Ácido Lipoico	0,71±0,07a	27,9±0,98 <sup>a</sup>	124,7±3,10d

En cuanto al efecto de las muestras sobre el radical hidroxilo, los valores de porcentaje de inhibición de la formación del radical hidroxilo variaron entre 93,5 y 99,77 % de inhibición, siendo la muestra 90 la que presentó mayor porcentaje de inhibición

con 99,77% y la muestra 104 la que reportó el menor % de inhibición con 93,5%. En líneas generales, los porcentajes de inhibición de la formación del radical hidroxilo observados tienden a ser similares entre las provincias, a excepción de las muestras 85, 96 y 105. Al igual que en el caso del AOA, se encontró correlación positiva entre la concentración de proteínas ( $R^2=1,000$ ) el contenido de polifenoles ( $R^2=0,767$ ) y el contenido de flavonoides ( $R^2=0,723$ ) con la capacidad de inhibición del radical hidroxilo (Tabla 8). Al comparar la capacidad de inhibición de las muestras de miel con la de antioxidantes comerciales, se observa que todas las muestras de miel presentaron % de inhibición superiores a los reportados para los antioxidantes comerciales usados en este estudio (Tabla 7).

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

Parámetro	Proteínas	Flavonoides	Polifenoles	AOA	RH	CAT
Proteínas	1	0,723	0,767	0,907	0,883	<b>0,857</b>
Flavonoides		1	0,971	0,689	0,840	0,924
Polifenoles			1	0,696	0,865	<b>0,955</b>
AOA				1	0,832	0,816
RH					1	0,935
CAT						1

Para finalizar, se determinó la actividad antioxidante por medio del método del catión radical ABTS, con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante total (CAT) usando como patrón de comparación el Trolox, en la que se evaluó la capacidad

antioxidante de una muestra de miel al secuestrar el catión radical ABTS, evidenciándose a través de la disminución en el desarrollo de color. Los valores de CAT variaron desde 89,8 hasta 176,8  $\mu\text{M}$  equivalente de Trolox/100 g de miel, siendo la muestra de miel 102 la que presentó el menor valor, y la muestra 100 la del mayor valor de CAT (Tabla 7). Existe mucha variación en los valores de CAT de las muestras de miel estudiadas, observándose diferentes valores en todas las mieles. En este caso se encontró correlación positiva entre la concentración de proteínas ( $R^2=0,857$ ), la concentración de flavonoides ( $R^2=0,924$ ) y la concentración de polifenoles ( $R^2=0,955$ ) con los valores de CAT (Tabla 8). Por otra parte, los valores de CAT de la mayoría de las muestras de miel fueron superiores a los reportados para los antioxidantes comerciales usados como patrón de comparación en este estudio (Tabla 7).

www.bdigital.ula.ve

## **Discusión.**

### ***Caracterización química***

Los análisis químicos de muestras de miel de abejas sin aguijón han tomado gran importancia, principalmente la determinación de su contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas, debido a que estos compuestos presentan actividad biológica, entre las que se puede mencionar una fuerte capacidad antioxidante, que juega un rol importante en la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Aljadiet *al.*, 2004).

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la concentración de flavonoides, proteínas y polifenoles de las muestras de miel usadas en este trabajo. Se reportaron valores de concentración de polifenoles que variaron entre 392,0 y 771,7 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, mientras que la concentración de flavonoides se encontró entre 71,2 y 146,5 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel para las muestras de mieles de *Meliponini* de Ecuador (Tabla 6). Al comparar estos resultados con la bibliografía se encontró que los valores obtenidos son más altos que los reportados por Vattuone *et al.* (2007), quienes determinaron compuestos fenólicos totales y flavonoides de mieles de *Tetragonisca angustula fiebrigii* y *Plebeia wittmanni* obtenidas de colmenas silvestres ubicadas en distintas regiones de Argentina, donde el contenido total de compuestos fenólicos varió entre 41,8-44,0 y 28,3-32,1 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel; el de flavonoides entre 1,2-2,0 y 0,8-1,4 expresados como mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, respectivamente. Los resultados de concentración de polifenoles y flavonoides de las mieles evaluadas en este estudio también son mucho mayores a los reportados por Oddo *et al.* (2008) quienes evaluaron las mieles de *Trigona carbonaria* de Australia, encontrando concentraciones de flavonoides de  $10,02 \pm 1,59$  mg de equivalentes de quercetina/100 g de miel, y de polifenoles de  $55,74 \pm 6,11$  mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de miel. De igual manera se encontró que los valores de flavonoides y polifenoles obtenidos en esta investigación son mayores que los reportados por Rodríguez *et al.* (2009) en mieles producidas por diez especies de abejas sin aguijón (*Melipona crinita*, *M. eburnea*, *M. grandis*, *M. illota*, *Nannotrigona melanocera*, *Partamona epiphytophila*, *Ptilotrigona lurida*, *Scaptotrigona polystica*, *Scauralatitarsis*, y *Tetragonisca angustula*)

del Perú, donde la concentración de flavonoides varió de 2,6 a 31,0 mg equivalentes de quercetina/100 g miel, y los polifenoles de 99,7 a 464,9 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel.

En relación a la concentración de proteínas, es importante mencionar que las investigaciones sobre este tema de mieles de abejas sin aguijón son muy escasas, lo que dificulta un poco comparar los resultados obtenidos con los de otras investigaciones. En este estudio, los valores de concentración de proteínas variaron entre 210,1 - 418,4 mg de proteína/100 g de miel (Tabla 6). Al comparar estos resultados, se encontró que son inferiores que los reportados por Rodríguez *et al.* (2009) en mieles producidas por diez especies de abejas sin aguijón del Perú, donde la concentración de proteínas se encontró entre 750 a 2860 mg/100g de miel.

### ***Actividad antioxidante y su correlación con parámetros químicos***

Es importante mencionar, que son pocos los trabajos realizados anteriormente, que guarden relación con el estudio de la capacidad antioxidante en mieles de abejas sin aguijón mediante los tres métodos utilizados en esta investigación, conocidos como AOA, porcentaje de inhibición del Radical Hidroxilo y ABTS. Los resultados de la actividad antioxidante en las mieles estudiadas, se encuentran en la Tabla 7. Los valores de AOA para las mieles en estudio fueron muy cercanos, desde 1,08 y 1,11 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, siendo las muestras 85, 91, 100 y 105 las que presentan el valor más bajo, mientras que la muestra 96, 97, 98 y 99 fueron las que presentaron el mayor valor de AOA (1,11 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel).

. Al comparar estos resultados con la bibliografía se encontró que son mayores a los reportados por Rodríguez *et al.* (2007), quienes estudiaron la capacidad antioxidante de mieles venezolanas de tres géneros *Apis mellifera* L., *Melipona favosa* Fabricius y *Tetragonisca angustula* Latreille, donde los valores que reportaron fueron de 0,64 - 0,74 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel para *Apis*, 0,72 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel para *Melipona* y 0,67 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel para *Tetragonisca*.

En cuanto al efecto de las muestras sobre el radical hidroxilo, los valores de porcentaje de inhibición de la formación del radical hidroxilo variaron entre 93,5 y 99,77 % de inhibición, siendo la muestra 90 la que presentó mayor porcentaje de inhibición con 99,77% y la muestra 104 la que reportó el menor % de inhibición con 93,5%. Estos valores también son mayores que los reportados por Rodríguez *et al.* (2007), cuyos porcentajes de inhibición variaron entre las especies estudiadas con diferencias mínimas, en el caso de la miel de *Apis* entre 62,73 a 77,77% de inhibición, 74,48% inhibición para *Melipona* y 71,36% de inhibición para *Tetragonisca*.

El último método utilizado en este trabajo para evaluar la actividad antioxidante de las muestras de miel, es el que se basa en la decoloración del catión radical ABTS<sup>+</sup>, en el cual se evalúa como una muestra con un posible antioxidante disminuye el radical formado, reportándose el valor resultante como CAT. Los valores de CAT variaron de 89,8 a 177,8  $\mu$ M equivalente de Trolox/100 g de miel, los cuales se encuentran por debajo de los reportados por Oddo y *et al.* (2008) para mieles australianas donde el valor de CAT se encontró entre 50,95 y 233,96  $\mu$ M equivalentes de Trolox/ 100g miel. De igual forma los valores de CAT de esta investigación son menores que los

reportados por Rodríguez *et al.* (2009) en mieles peruanas, donde los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante fueron de 93,8 a 569,6  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox/ 100 g de miel.

En la Tabla 8 se presentan los resultados de la correlación existente entre la actividad antioxidante medida por los 3 métodos usados en este trabajo y la concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas. En la mayoría de los casos se evidenciaron correlaciones positivas ( $R^2 > 0,500$ ) con cada uno de los parámetros en estudio (polifenoles, flavonoides y proteínas). En el caso de los resultados obtenidos por Muños y Copaja (2007), en una investigación realizada en mieles producidas en diversas zonas de Chile, se encontró correlación insignificante entre el contenido de flavonoides con el potencial antioxidante de Trolox, de igual forma que con el contenido de compuestos fenólicos ( $R^2 \geq 0,003$ ). Esto probablemente sobreviene porque la muestra de miel utilizada para el ensayo utilizado en esa investigación fue entera y no fraccionada. (Muños y Copaja, 2007). Cerca de 20 proteínas noenzimáticas se han identificado en la miel, muchas de las cuales son comunes a distintas mieles. Las proteínas se encuentran en muy pequeñas cantidades (0,38% aproximadamente), en donde se han identificado algunas enzimas como la invertasa, la amilasa y la glucosidasa. De los aminoácidos, la prolina es el más abundante de todos, le siguen la lisina, el ácido glutámico y el ácido aspártico (Ulloa y *et al.*, 2010). Por otra parte, las enzimas son añadidas principalmente por las abejas, aunque algunas pocas proceden de las plantas. Las abejas añaden enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel y estas son en gran parte las responsables de la complejidad composicional de la miel. El proceso involucrado en la conversión de los tres azúcares

básicos del néctar a por lo menos 25 azúcares adicionales de gran complejidad es difícil de entender. La enzima más importante de la miel es la  $\alpha$ -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 *et al.*, 2010).

Al observar los valores de las propiedades químicas de las muestras analizadas (Tabla 6) se evidencia que existen muestras de mieles con valores estadísticamente similares provenientes de la misma región, como es el caso de las muestras 99 y 102 provenientes de Santa Elena, las cuales presentan valores similares de concentración de flavonoides (112 y 113 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel, respectivamente) (Tabla 6). De igual forma ocurre con las concentraciones de polifenoles, valores estadísticamente iguales entre muestras de miel de la misma provincia como en el caso de las muestras 90 y 105 (Guayas) con una concentración media de 536,0mg y 511,36 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel. De igual manera en la provincia el Oro las muestras 98 y 103 coinciden estadísticamente con un valor de 531,3 y 512,3mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel (Tabla 6). Este fenómeno es evidente tanto para las determinaciones químicas, como para los valores de actividad antioxidante medida por los 3 métodos usados en este trabajo (Tablas 6 y 7).

Por otra parte, se puede evidenciar que hay muestras que presentan valores estadísticamente similares y no pertenecen a la misma provincia, como es el caso de las muestras 85 y 104 pertenecientes a las provincias Guayas y Cochabamba respectivamente, las cuales presentan una concentración de flavonoides

estadísticamente igual (82,7mg equivalentes de quercetina/100 g de miel); al igual que las muestras 105 de la provincia Guayas y la 96 de la provincia Los Ríos (90,6 mg equivalentes de quercetina/100 g de miel) (Tabla 6). De manera similar se reflejan mismos valores para muestras de diferentes provincias en cada método analizado, evidenciando así que en la mayoría de los resultados se puede observar una relación de valores semejantes en relación a su composición química (Tabla 8 y 7).

La composición química de la miel varía según su origen floral, además, influyen muchos factores externos como el suelo, el clima, es decir las condiciones ambientales (Rodríguez, 2012). Lo que quiere decir que al haber abejas que comparten las mismas condiciones ambientales, o que, al momento de extraer el néctar de las flores u otras partes de la planta, seleccionan el mismo tipo de vegetación, podría ocasionar que sus propiedades nutricionales sean similares o no.

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

Existe solo un reporte en la literatura en el que se ha llevado a cabo un estudio detallado de las mieles de meliponini de Ecuador, el realizado por Guerrini *et al.* (2009) en el que estudiaron las propiedades fisicoquímicas, químicas y funcionales de mieles de la zona oeste del Amazonas Ecuatoriano, comparando los resultados con dos mieles multiflorales de *A. mellifera*. Para evaluar la actividad antioxidante se llevaron a

cabo los ensayos de DPPH y  $\beta$ -carotene, mostrando valores de actividad antioxidante superiores a los medidos para *A. mellifera* ( $88,1 \pm 11,1$  % inhibición de DPPH;  $70,8 \pm 8,90$  5 inhibición de  $\beta$ -caroteno). Además, evaluaron la actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram negativas, reportando valores de MIC (10–50  $\mu\text{g/ml}$ ) siempre inferiores a los de las mieles de *A. mellifera*.

Según los resultados presentados en este trabajo, las mieles de abejas sin aguijón de las provincias 5 y 7 de Ecuador poseen concentraciones de flavonoides y polifenoles superiores a las reportadas para las mieles de otras abejas sin aguijón de diferentes orígenes geográficos. Las concentraciones de proteínas fueron inferiores a las reportadas para otras mieles de abejas sin aguijón. Las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas incidieron directamente en la capacidad antioxidante de dichas muestras, observándose una fuerte correlación positiva entre los parámetros fisicoquímicos y la actividad antioxidante. Este trabajo constituye unas de las primeras evaluaciones formal y estadística de la actividad antioxidante y composición química de mieles de las regiones 5 y 7 de Ecuador, contribuyendo con el proyecto internacional de Valorización de mieles de pote de Ecuador, incrementando el conocimiento acerca de las propiedades biológicas de las mieles de pote que permitan establecer los estándares de calidad de dichas mieles, y evidenciando que las mieles de abejas sin aguijón posee cantidades relevantes de polifenoles y flavonoides, así como de actividad antioxidante, sugiriéndola como una excelente fuente natural de antioxidantes.

## **CAPÍTULO V.**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

#### **Conclusiones**

1. La concentración de flavonoides se encontró entre 71,2 a 112,0mg equivalentes de quercetina/100 g de miel; la concentración de polifenoles varió entre 392,0 a 711,7 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, y la de proteínas se presentó en el rango entre 97,8 a 418,4 mg de proteína/100 g de miel. Se evidenciaron muestras estadísticamente similares provenientes de la misma región, así como de regiones diferentes, posiblemente debido diferentes condiciones geográficas, climatológicas y del tipo de planta usada para tomar el polen por parte de la abeja. Las concentraciones de flavonoides y polifenoles presentadas en este trabajo fueron superiores a varias de las encontradas en la literatura.
2. En cuanto a la actividad antioxidante, los valores de AOA estuvieron en el rango entre 1,08 a 1,11 mM equivalente de ácido úrico/100 g de miel, la inhibición del radical hidroxilo entre 96,67 a 98,85% de inhibición, y la CAT entre 89,8 a 155,9  $\mu$ M equivalente de Trolox/100 g de miel. Para los tres métodos utilizados, los

valores fueron superiores a los encontrados para la melatonina, quercetina y ácido lipoico.

3. Se encontró correlación positiva entre la actividad antioxidante y las concentraciones de polifenoles, flavonoides y proteínas con los tres métodos utilizados en este estudio (AOA, RH Y CAT).
4. Este es uno de los primeros trabajos en los que se hace un estudio detallado de las propiedades antioxidantes y composición fisicoquímica de muestras de mieles producidas por abejas sin aguijón del sureste de Ecuador, lo que contribuye en el proceso de conocimiento de dichas mieles, así como en la valorización de las mismas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Recomendaciones

1. Es necesario repetir el estudio con una mayor cantidad de muestras provenientes de una mayor cantidad de regiones del sureste de Ecuador, para contar con una población más representativa del área, y poder establecer correlaciones entre el origen geográfico y la actividad antioxidante.
2. Medir la actividad enzimática de aquellas enzimas presentes en la miel que puedan contribuir con la actividad antioxidante, y determinar el perfil proteico de dichas muestras.
3. Investigar acerca del tipo de polifenoles y flavonoides presentes en estas muestras para comparar con otras en los que dicha correlación es positiva.
4. El alto índice de correlación observada entre compuestos fenólicos y flavonoides totales es un aporte positivo de la metodología empleada para su determinación, sin embargo se recomienda medir estos parámetros usando otras metodologías para así verificar que la correlación es independiente del procedimiento usado para determinarlos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Almeida da Silva, Sarmiento IA, da Silva TM., Camara CM, Queiroz M, Magnan M, Santos de Novais, Bastos J, SoledadeLE, Oliveira LE, De Souza AL, De Souza AG. (2013) Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. Food Chemistry; 14: 3552-3558

Aljadi AM, Kamaruddin MY. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chemistry 2004; 85: 513–518.

Amaya L. (2013). Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. San Salvador, el Salvador, centro América.

Anklam E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chem.; 63(4):549–62.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. y Gallmann, P. (2004). Honey for nutrition and health: a review. American Journal of the College of Nutrition, 27, 677-689

Callebaut J. (2001). Estudio de las abejas sin aguijón y sus prácticas de manejo por la población local en el sur occidente de Loja. 50 p.

Camargo JMF, Pedro SR. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. Apidologie 23: 509-522.

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

FAO / OMS. (1969). "Norma Regional Europea recomendada para la miel". Codex Alimentarius. Commission CAC / RS12. Labores de la Conferencia CCI. "Desarrollo del comercio apícola.

Ferrufino, U., Vit, P. (2013). Pot-honey of six species of Meliponini from Amboró National Park in Bolivia. En: P. Vit, S.R.M. Pedro, D.W. Roubik (Eds.), Pot-honey. A legacy of stingless bees (pp. 409-416), New York, USA: Springer.

Fuenmayor, C.A., Zuloaga-Domínguez, C.M., Díaz-Moreno, A. C., Quicazán, M.C. (2012). 'Miel de angelita': Nutritional composition and physicochemical properties of *Tetragonisca angustula* honey. *Interciencia* 37(2): 142-147.

García-Tenesaca M, Navarrete E, Iturralde G, Villacrés Granda I, Tejera E, Beltrán-Ayala P, Giampieri F, Battino M, Alvarez-Suarez J. (2017). "Influence of Botanical Origin and Chemical Composition on the Protective Effect against Oxidative Damage and the Capacity to Reduce In Vitro Bacterial Biofilms of Monofloral Honeys from the Andean Region of Ecuador" *Journal of molecular science*. 19-45.

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. (2002) "Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21): 5870–5877.

González-Acereto JA. (2012) *Cría y manejo de abejas nativas sin aguijón en México*, Mexico: Planeta Impresores

Guisado R. (2007) Guisado B., Bordes González, García Morales MC, Fernández T.,  
Universidad de Granada Oxidación y producción de radicales libres.

Guerrini A, Bruni R, Maietti S, Poli F, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, Scalvenzi L,  
Sacchetti G. (2009). Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and  
functional profile of an ancient health product. Food Chemistry 114(4): 1413-1420.

Gutiérrez MG, Enriquez E, Lusco L, Rodríguez-Malaver A, Persano L, Vit P. (2009)  
Caracterización de mieles de Meliponabeecheii y MeliponaSolani de Guatemala.  
Rev. Fac Farm. 50(1): 2-6.

Gutiérrez, M.G., Rodríguez-Malavaer, A., Vit, P. (2008). Miel de abejas: una fuente de  
antioxidantes. FuerzaFarmacéutica, 12 (1), 39 – 44.

Halliwell, B., Gutteridge, J. y Aruoma, O. (1987). The deoxyribose method: a simple  
test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals.  
Anal of Biochemistry 165: 215–219.

Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. y Cosic, V. (2001). Method  
for measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of Clinical  
Pathology 54: 356-61.

Kumul (2015) Potencial antioxidante de la miel de Meliponabeecheii y su relación con la  
salud. Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto Tecnológico de  
Mérida, Mérida. México.

- ChieruzziLöwenstein MC. (1989) Etnomeliponicultura y análisis químico de las mieles de cinco especies de abejas sin aguijón (Meliponinae). Tesis para Licenciatura de Biología. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica de Ecuador: Quito, Ecuador. 192 pp.
- Latreille, (1809) (Hymenoptera, Apidae), con notas sobre su biología y distribución. *Revista Peruana De Entomología*, 43(1), 31-45.
- León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A. V., San Andrés, M. P. (2013). Vitamin C and sugar levels as simple markers for discriminating Spanish honey sources. *Journal of Food Science*, 76, 356-361.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. y Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Manrique, A.J. (1995). (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay (Venezuela). Evaluación de prácticas de manejo de abejas sobre la producción de miel y cera. *Zootecnia Tropical (Venezuela)*. v. 13(2) p. 215-223.
- Marshall T, Williams KM. (1987) Electrophoresis of honey: Characterization of trace proteins from complex biological matrix by silver staining. *Analytical Biochemistry*; 167, 301–303.
- Michener C. D. (1974) *The social behavior of the bees; a comparative study* (Cambridge. Mass. Harvard University Press)
- Michener C.D. (2000) *the bees of the world* The Johns Hopkins University Press, Baltimore & London, 913 pp.

- Molan P. (1992) Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. In: Honey and healing. Munn, P; Jones, R (eds) Cardiff, UK: International Bee Research Association (IBRA)
- Moure J.S. (1971) Descrição de uma nova especie de *Tetragona* do Brasil Central Boletim Universidade Federal do Paraná, Zool. 4:47-50
- Muñoz y Copaja (2007) contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago – Chile.
- Muradian M. Arsel L. Pellegrini F. Adaman B. Aguilar B. Agarwal E. Corbera D. Ezzine de Blas J. Farley G. Froger E. Garcia-Frapolli. (2012) Payments for ecosystem services and the fatal attraction of win-win solutions. First published: 26 November
- Núñez, A. (2011) Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. Rev Cubana Salud Pública. 37 (supl.): 644-60.
- Oddo LP, Heard TA, Rodríguez-Malaver A, Pérez RA, Fernández-Muiño M, Sancho MT, Sesta G, Lusco L, Vit P. (2008) Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. J Med Food. 11(4):789-94. doi: 10.1089/jmf.2007.0724.
- Quezada-Euán J. J. G., W. May-Itzá, J.A. González-Acereto. (2001). Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development. BeeWorld, 82 (4), 160—167.
- Ramos (2005) Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera, Meliponini)

Rasmussen C. (2004). Abejas en el sur de Ecuador, Lyona: a journal of ecology and application, 7 (2): 29—35

Re, R., Pellegrini, N., Protoggnte, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical in Biology and Medicine* 26: 1231-1237.

Capacidad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros Apis, Melipona y Tetragonisca, evaluada por tres métodos. *RevInstNacHig "Rafael Rangel"* 2007; 38 (2): 13-7.

Rodríguez, A., Rasmussen, C., Gutiérrez, M., Gil, F., Nieves, B. y Vit P (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *NPC*, 4: 1221-1226.

Roubik D. (1989). *Ecology and natural history of the tropical bees* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Roubik, D. (1997) *Pollination of cultivated plants in the tropics*. FAO Agricultural Services Bulletin 118:1-6.

Sabino, C. (2007). *El proceso de investigación*. Caracas: Panapo. Schwarz H.F. (1948) Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere *Bulletin of the American Museum of Natural History* 90:1-546

Singleton, VL., Orthofer, R. y Lamuela-Raventos, RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152—178.

- Ulloa, Mondragón P, Rodríguez R, Reséndiz, J. Vázquez. (2010) La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente* Año 2, No. 4, septiembre.
- Vattuone, M.A., Quiroga, E.N., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., et al. (2007) Compuestos fenólicos totales, flavonoides, prolina y capacidad captadora de radicales libres de mieles de *Tetragonisca angustula* Fiebrigi y de *Plebeia wittmanni*, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6 (5), 299-300.
- Villanueva G. R., D. W. Roubiky W. Colli Ucán. (2005). Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatan peninsula. *BeeWorld*, 86 (2): 35 – 41
- Vit, P. (2005). *Melissopalynology, Venezuela* (205 pp.) Mérida, Venezuela: APIBA-CDCHT, Universidad de Los Andes.
- Vit P, Medina M, Enriquez ME. (2004) Quality standards for medicinal uses of *Meliponinae* honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *BeeWorld*, 85(1): 2-5.
- Vit, P., Mejías, A., Rial, L., Ruiaz, J., Peña, S., Gonzales, A.C., Rodriguez, A., Arraez, M., Guitierrez, C., Zambrano, A., y Ortrud, M. (2013). Knowing the *Melipona favosa* honey from Paraguaná Peninsula, Falcon state, Venezuela. *INHRR*, 43, (1).
- Vit P. (2008) Valorización de la miel de abejas sin aguijón (*Meliponini*). *Vit/RevFacFarm*; 50(2): 20-28.
- Vit P. (2012) conociendo la miel de melipona favosa en la península de paraguaná, estado falcón, Venezuela. *Revista del instituto nacional de higiene rafaél rangel versión impresa issn 0798-0477 inhrr vol.43 no.1 caracas.*

Vit, P., O. Vargas, L. zTriny, and F. Valle. (2015) "Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from el oro province in Ecuador". Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol. 27, no. 6, Apr., pp. 502-6,

Vit, P., S. Bertha, P. Silvia, J. Ruíz, F. Maza, P.- María, and P.- Elizabeth.(2016)  
"Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by melipona and scaptotrigona stingless bees from pariagrande, Amazonas state, Venezuela".  
Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol. 28, no. 2, pp. 78-84.

Wade (1993). QuimicaOrganica, vol 1. 7a Edicion.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)