



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LOS PARÁMETROS DE
CALIDAD Y COMPOSICIÓN QUÍMICA EN MIELES DE EUCALIPTO
(*Eucalyptus spp.*) DE LA REGIÓN ANDINA DEL ECUADOR

Autora

Dayana Joselyn Coello Macías

Año
2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LOS PARÁMETROS DE
CALIDAD Y COMPOSICIÓN QUÍMICA EN MIELES DE EUCALIPTO
(*Eucalyptus spp.*) DE LA REGIÓN ANDINA DEL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

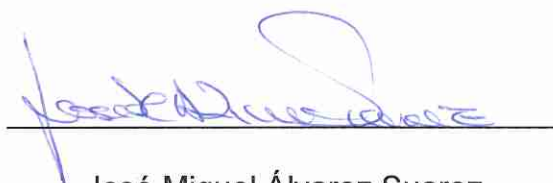
Profesor Guía
Ph.D. José Miguel Álvarez Suárez

Autora
Dayana Joselyn Coello Macías

Año
2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA


“Declaro haber dirigido el trabajo, Influencia del tratamiento térmico en los parámetros de calidad y composición química en mieles de Eucalipto (*Eucalyptus spp*) de la región Andina del Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Dayana Joselyn Coello Macías, en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



José Miguel Álvarez Suarez
Doctor en Alimentación y Salud
CC: 1756653372

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Influencia del tratamiento térmico en los parámetros de calidad y composición química en mieles de Eucalipto (*Eucalyptus spp*) de la región Andina del Ecuador, de Dayana Joselyn Coello Macías, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



Eduardo Tejera Puente
Doctor en Ciencias Farmacéuticas
CC: 1756501977

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente a la estudiante Dayana Joselyn Coello Macías para la realización de su trabajo experimental de titulación, Influencia del tratamiento térmico en los parámetros de calidad y composición química en mieles de Eucalipto (*Eucalyptus spp*) de la región Andina del Ecuador, en el semestre 202010 en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientado sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.



Irina Maribel Villacrés Granda
Master en Enfermedades Infecciosas
CC: 1716866064

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.



Dayana Joselyn Coello Macías

CC: 1804167557

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento al PhD José Miguel Álvarez, por su paciencia, dedicación y sobre todo por brindarme los conocimientos necesarios para que este tema de titulación sea posible.

A Genoveva Granda y Irina Villacrés quienes han sido uno de los pilares más importantes dentro del desarrollo de mi tesis, quienes estuvieron dispuestas a ayudarme a toda, gracias a sus conocimientos, consejos y sobre cariño.

Muchas gracias a todas las personas que estuvieron dándome ánimos a lo largo del desarrollo de mi tesis.

DEDICATORIA

A Dios, por ser esa luz y amor incondicional en todo momento en mi carrera, por darme la sabiduría necesaria a lo largo de cada momento. A mis padres David Coello y María Macías por ser mi guía, apoyo y amor durante todo este camino. A mis hermanos Monserrath y Bryan, que en momentos de adversidad han estado ayudándome y guiándome en cada momento. A mis amigos quienes con su amistad sincera siempre estuvieron presentes sacándome risas y sobretodo brindándome apoyo. A Ramón por ser esa persona única, amorosa y sobretodo incondicional.

RESUMEN

A lo largo del tiempo, la miel ha sido utilizada en varias aplicaciones medicinales, alimenticias y cosméticas. Sus propiedades biológicas, compuestos físico-químicos y actividad antioxidante, han ayudado a tratar infecciones e incluso a emplear la misma como alimento funcional. Sin embargo, no existen estudios completos donde se determine una temperatura adecuada para que la miel no pierda sus propiedades y a su vez tenga un aspecto agradable para el consumidor. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue determinar la influencia en el tratamiento térmico, parámetros de calidad y composición química, en mieles de eucalipto de la región andina del Ecuador. Se realizó un tratamiento térmico a las mieles a temperaturas de 45°C y 60°C, al igual que se analizaron parámetros físico-químicos tales como: color, humedad, cenizas, conductividad eléctrica, hidroximetilfulfural, actividad diastasas. Dentro de las propiedades biológicas se determinó: flavonoides, polifenoles, peróxido de hidrogeno y glucosa oxidasa. También se midió la capacidad antioxidante total de las mieles, misma que fue estudiada según su reducción de hierro (FRAP) y captación de radicales libres (DPPH). Los resultados del estudio permitieron determinar cuál es la temperatura adecuada para tratar a las mieles sin que se pierda ninguno de sus compuestos físico-químicos, propiedades biológicas y capacidad antioxidante. Entre los compuestos físico-químicos, el estudio evidencio que los principales parámetros que se ven afectados por la temperatura son; la humedad, el hidroximetilfulfural y la actividad diastasa. Mientras que en las propiedades biológicas la temperatura no afecta significativamente a las mieles. De esta forma se encontró una correlación positiva entre la composición química vs capacidad antioxidante vs la temperatura. El estudio permitió demostrar que la temperatura no afecta a las propiedades biológicas que tiene la miel.

ABSTRACT

In the course of time, honey has been used in several medicinal applications, food and cosmetics. Its biological properties, physicochemical compounds and antioxidant activity have help to treat infections and to be used as a functional edible. However, studies that determine an adequate honey temperature so that it does not lose its properties and have at the same time a pleasant appearance for the consumer, are nonexistent. That is the reason why the main goal of the present study was to determine the influence on thermal treatment in the parameters of quality and chemical composition in eucalyptus honeys from the Andean region of Ecuador. Specifically, the heat treatment was performed at temperatures of 45 ° C and 60 ° C, as well as determination of physical-chemical parameters such as: color, humidity, ash, electrical conductivity, hydroxymethylfulfural, and diastase activity. Among the biological properties that were determined are: flavonoids, polyphenols, hydrogen peroxide and glucose oxidase. The total antioxidant capacity of the honey that was studied according to its reduction and free radical uptake was also measured. The results of the study allowed us to determine the most appropriate temperature to submit honey without it losing any of its physical-chemical compounds, biological properties and antioxidant capacity. Among the physicochemical compounds, the study showed that the main parameters that are affected by temperature are humidity, hydroxymethylfulfural and diastase activity. Also finding that the biological properties of honey doesn't seem to be affected by temperature. Finding this way, a positive correlation between the chemical composition vs antioxidant capacity vs. temperature. It's worth emphasizing that the study showed that temperature does not affect the biological properties of honey.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 Planteamiento del problema..... | 3 |
| 1.3 Objetivo General..... | 4 |
| 1.4 Objetivos específicos..... | 5 |
| 1.5 Justificación del trabajo..... | 5 |
| 2. CAPÍTULO II. MARCO TEORICO..... | 6 |
| 2.1 Historia, definición de la miel..... | 6 |
| 2.2 Clasificación de la miel..... | 7 |
| 2.2.1 Según su Origen geográfico..... | 7 |
| 2.2.2 Según el método de extracción utilizado..... | 7 |
| 2.2.3 Según el origen botánico..... | 8 |
| 2.3 Propiedades físico-químicas de la miel..... | 9 |
| 2.3.1 Propiedades físicas..... | 9 |
| 2.3.2 Composición química..... | 14 |
| 2.3.3 Compuestos químicos..... | 17 |
| 2.3.4 Capacidad antioxidante..... | 20 |
| 2.4 Importancia y producción de miel en el Ecuador..... | 21 |
| 2.5 Temperatura y la miel..... | 24 |
| 3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS..... | 25 |
| 3.1 Diseño Experimental..... | 25 |
| 3.2 Población y muestra..... | 26 |
| 3.2.1 Preparación de las muestras..... | 26 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3 | Determinación de parámetros físico-químicos. | 27 |
| 3.3.1 | Color | 27 |
| 3.3.2 | Humedad | 27 |
| 3.3.3 | pH..... | 27 |
| 3.3.4 | Conductividad eléctrica..... | 27 |
| 3.3.5 | Actividad Diastasa en la miel..... | 28 |
| 3.3.6 | Contenido de Hidroximetilfulfural (HMF)..... | 28 |
| 3.3.7 | Contenido total de cenizas. | 29 |
| 3.4 | Determinación de compuestos químicos | 31 |
| 3.4.1 | Contenido total de flavonoides..... | 31 |
| 3.4.2 | Contenido total de fenoles totales..... | 31 |
| 3.4.3 | Contenido de Peróxido de Hidrogeno..... | 32 |
| 3.4.4 | Glucosa oxidasa | 32 |
| 3.5 | Actividad antioxidante en la miel..... | 33 |
| 3.5.1 | FRAP (Poder antioxidante reductor de hierro)..... | 33 |
| 3.5.2 | DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)..... | 33 |
| 3.6 | Análisis estadístico de resultados..... | 34 |
| 4. | CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 34 |
| 4.1 | Caracterización físico-química de mieles de eucalipto..... | 34 |
| 4.2 | Caracterización físico-química en mieles de eucalipto con tratamiento térmico | 40 |
| 4.3 | Determinación de composición química con tratamiento térmico..... | 44 |
| 4.4 | Determinación de la capacidad antioxidante con tratamiento térmico..... | 48 |
| | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 50 |

| | |
|--------------------------|----|
| 5.1 Conclusiones | 50 |
| 5.2 Recomendaciones..... | 50 |
| REFERENCIAS | 51 |

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes

La miel es producida por abejas principalmente del género *Apis mellifera*. Posee distintos beneficios y ha sido reconocida en la medicina a lo largo de la historia por diferentes culturas por sus propiedades curativas y como alimento (Bogdanov, 2014). Fue utilizada desde el siglo VII A. C. por griegos, egipcios y persas en aplicaciones tópicas para tratar quemaduras, heridas cutáneas, inflamaciones y eccemas (Álvarez-Suarez *et al* , 2010)

El proceso de producción natural de miel se basa en la recolección del néctar por parte de las abejas, quienes transforman, depositan, deshidratan y almacenan el néctar transformado en los panales para su maduración. La intervención del hombre en el proceso de explotación de los panales de la colmena se conoce como apicultura (Rescan, 2007). La miel requiere una manipulación adecuada para su uso a nivel comercial. Por su naturaleza, puede absorber del ambiente humedad, olores y retener polvo. Por ello, los apicultores deben manipular la miel en lugares iluminados y aireados, con una humedad relativa alrededor del 60% y un rango de temperatura de (27-30) °C para su posterior utilización y comercialización (Jones *et al* , 2004).

La miel puede presentarse en tres diferentes estados como es; miel sólida o cristalizada, miel líquida y miel cremada. El estado natural de la miel es la forma cristalizada, que se da por la precipitación de azúcares en el estado líquido. (Geldam, J. 2018). Por otro lado, para su comercialización, la miel pasa por diversos métodos como el calentamiento a una temperatura de 62°C obteniendo un estado líquido. La miel cremada es un tipo de miel procesada que permite el mantenimiento de las cualidades con el fin de que se evite derrames, es una de las formas más estables de la miel.

La composición química de la miel es variable y está relacionada a varios factores como el tipo de flores que se encuentran en distintas zonas geográficas y condiciones climáticas (Bogdanov, Haldimann, Luginbühl, & Gallmann, 2007). Se han realizado distintas investigaciones acerca de la composición química de la miel en diferentes partes del mundo, principalmente en zonas donde existe una mayor producción y comercialización de miel tanto polifloral como monofloral (Hroncova et al., 2015).

La miel está compuesta de aproximadamente 181 sustancias diferentes y se caracteriza por un alto contenido en azúcar, además contiene minerales, aminoácidos libres, proteínas, vitaminas y enzimas (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010). Dentro de los compuestos de miel están los polifenoles que se encuentra relacionado con las propiedades funcionales y apariencia siendo un compuesto importante para la calidad de la misma y el valor de la miel. Por ello, los polifenoles han sido estudiados recientemente por su gran potencial como marcadores químicos para la identificación botánica, así como sus propiedades biológicas y principalmente en sus propiedades antioxidantes (Rodríguez-Zevallos, Hayayumi-Valdivia, & Siche, 2018).

En Ecuador la miel ha sido utilizada de forma casera principalmente en la industria alimenticia. A nivel mundial la miel ha sido utilizada en industrias como es la gastronómica, siendo utilizada especialmente para la cocina, pastelería y como un aditivo para ciertas bebidas calientes (Juszczak *et al.*, 2016). En la industria farmacéutica se ha hecho uso de la miel para tratar enfermedades estomacales por tener enzimas, vitaminas y antioxidantes (Geldmann & González-Varo, 2018). En la industria terapéutica, la miel es empleada por su capacidad antimicrobiana, antioxidante y antiséptica ayudando a cicatrizar y prevenir infecciones en heridas. Finalmente es importante en la industria cosmetológica por ser astringente y suavizante. También se comercializa en bálsamos, cremas, aceites entre otros (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016).

Existen estudios que han detectado diferentes parámetros de calidad de la miel donde determinan que pueden estar adulterados o que han perdido su función de acuerdo a la temperatura (Tosi *et al.*, 2004). Por ello, estudios corroboran la información; (Turkmen *et al.*, 2006), (Chen *et al.*, 2012), (Kowalski, 2013), (Guo *et al.*, 2011).

Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales acerca de las propiedades biológicas que tiene la miel de Ecuador con relación a la temperatura.

1.2 Planteamiento del problema.

La miel de eucalipto se produce en Ecuador principalmente en la región andina. Al ser una zona fría con una diferencia de presión, favorece a la precipitación y a su cristalización (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016). En la actualidad en Ecuador existen pocos estudios sobre los parámetros de calidad de la miel con relación a la temperatura y a la región donde se encuentra. La falta de conocimiento del apicultor y consumidor sobre la temperatura adecuada que debe tener la miel provoca la pérdida o disminución de la eficacia de sus propiedades naturales. La disminución de la eficacia de los parámetros de calidad y composición química se ve afectado por el calentamiento. Los apicultores, para su comercialización y su presentación, someten a la miel a temperaturas en un rango de 50 a 80 °C en equipos como baño maría, estufa, entre otros (Potts *et al.*, 2010). La viscosidad, acidez y humedad se ven afectados, lo que hace que se vuelva menos ácida, ocasionando un sabor muy dulce. Sin embargo, la miel al ser calentada aumenta los parámetros físico-químicos como es el Hidroximetilfurfural (HMF) que a pesar de que se encuentra en pequeñas cantidades puede llegar a causar intoxicación. El Hidroximetilfurfural se debe encontrar con un máximo de 40 mg de HMF/ kg de miel con respecto a las normas de calidad de la miel (Dalmon *et al.*, 2019).

Por otro lado, la temperatura hace que pierda la eficacia en sus tratamientos naturales, capacidad antiinflamatoria, antimicrobiana, daño oxidativo y cristalización. El daño oxidativo es el proceso que provoca el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades y procesos patológicos como son; inflamaciones, problemas inmunitarios que involucran al hígado, páncreas, riñón y sistema nervioso, así como la derivación de algunos tipos de cáncer (estómago y piel) y sobre todo alteraciones en los vasos del sistema circulatorio (Kumul et al., 2015). Además, el calentamiento hace que la miel pierda ciertas propiedades relacionadas con la nutrición, siendo una desventaja para las distintas personas que consumen miel en su vida diaria (Bell-Wilson, 2007).

En la actualidad, existe una alta incidencia de enfermedades que se encuentran relacionadas específicamente al estrés oxidativo, al igual, que se encuentra relacionado con cambios en la dieta por los distintos tipos de edulcorantes que a su vez alteran el metabolismo. Por ello, es importante buscar formas alternativas de bajo costo y más asequibles que permitan aderezar esta situación ayudando a proporcionar una temperatura adecuada que ayude a la calidad de la miel. Los productos naturales son una gran alternativa para este problema. Dentro de los productos naturales, la miel de abeja ha sido utilizada desde tiempos remotos en el tratamiento de heridas, tanto sea por su poder antioxidante como por su capacidad antiinflamatoria, al igual como fuente alimenticia. En los últimos años se ha prestado atención al posible uso de la miel en las distintas industrias; cosmetológica, alimenticia y terapéutica.

1.3 Objetivo General.

Evaluar la influencia del tratamiento térmico en los parámetros de calidad y composición química en mieles de Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) de la región Andina de Ecuador

1.4 Objetivos específicos.

- Determinar la influencia del tratamiento térmico en los parámetros físico-químicos de mieles de eucalipto
- Determinar la influencia del tratamiento térmico en el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de mieles de eucalipto
- Establecer el mejor esquema de tratamiento térmico que no afecte los parámetros de calidad y actividad biológica de las mieles de eucalipto

1.5 Justificación del trabajo.

La producción y comercialización de la miel está aumentando, gracias a la diversidad floral que posee el Ecuador y a la gran cantidad de miel que existe dentro del territorio ecuatoriano y a su vez por el potencial melífero que lo hace único, de tal manera, esto permitiría generar un amplio conocimiento acerca de la miel de abeja y su proceso de tratamiento térmico hacia los apicultores, comercializadores y consumidores. Por otra parte, existen pocos estudios que certifican el origen floral, propiedades biológicas de la miel y su vez la temperatura, lo que permitiría que dicho producto posea un valor agregado.

Además, existen estudios realizados que han demostrado la eficacia de la miel, que ayuda a mejorar el estrés oxidativo, reducir la hiperglucemia, y a su vez teniendo acción antibacteriana e antiinflamatoria (Cortés *et al*, 2011; Oryan *et al.*, 2016). Por ello, es de importancia determinar su composición química y propiedades biológicas en relación a su origen floral con respecto a la temperatura que se somete dicha miel para que no se pierda ni incremente ninguno de sus compuestos bioquímicos y así no afecte a su posterior comercialización.

Este estudio pretende buscar una temperatura adecuada que se encuentre dentro de las normas de calidad y a si certificar las propiedades físico-químicas y propiedades biológicas de las principales mieles monoflorales del Ecuador (NMX-F-219, 1984). La identificación de estos parámetros permitirá recomendar estas mieles monoflorales como fuentes naturales de compuestos bioactivos, actividad antioxidante y como una alternativa de alimento funcional. Cabe recalcar que la miel no solo se utiliza en la industria farmacéutica o como medicina alternativa, sino también en las industrias de alimentos y cosméticos.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEORICO.

2.1 Historia, definición de la miel

La miel de abeja se define como una sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* que se da a partir del néctar de plantas o secreciones de partes vivas de la planta o excreciones de insectos chupadores, donde la abeja es la encargada de recolectar, transformar, combinar con diferentes sustancias, depositar, deshidratar y finalmente almacenar en colmenas para su maduración (Beye *et al.*, 1994)

Las abejas aparecieron en la tierra hace 60.000.000 años. Principalmente en Egipto, eran los sacerdotes quienes practicaban la apicultura, utilizando la miel para problemas como dolores gástricos y como un tipo de azúcar para sus bebidas (Ismail, 2016). A través de la historia existe un extenso número de referencias que han dejado constancia de la importancia y de los usos que se han dado a la miel, dando el valor como un producto indispensable y de primera necesidad para diversos problemas. Se ha utilizado además para hacer bebidas alcohólicas como cerveza y vino en lugares como África y algunos relacionados a la cultura maya (Elekonich & Roberts, 2005)

2.2 Clasificación de la miel

La miel se puede clasificar según la FAO/WHO (2001) por su origen geográfico, método de extracción y por su origen botánico.

2.2.1 Según su Origen geográfico

Con respecto al origen la miel se clasifica en miel de flores o miel de mielada

Tipo I. Miel de flores: Se refiere a la miel que procede directamente del néctar de las flores; siendo una miel levógira, teniendo un color incoloro a amarillo y pardo amarillento, este tipo de miel posee un contenido de azúcar invertido superior o igual a 70% lo que lo hace apto como edulcorante natural.

Tipo II. Miel de mielada. Se refiere a la miel que procede de plantas caducas, es decir, de sus hojas o exudaciones de plantas, especialmente de las coníferas. Su color varía de pardo claro a negro, siendo una miel dextrógira con un contenido de azúcar superior o igual a 60% un poco más ácida que las mieles de flores.

2.2.2 Según el método de extracción utilizado

Miel centrifugada: Este tipo de miel se obtiene por centrifugación de los panales no incubados.

Miel de presión: Producto que se obtiene por compresión de los panales no incubados.

Miel sobrecalentada: Se obtiene a partir del calentamiento de la miel a una temperatura superior a 45°C para su extracción.

2.2.3 Según el origen botánico

De acuerdo a la FAO/WHO (2001), se puede denominar a la miel por su origen botánico mediante distintos ensayos como el melisopalinológico o de polen, tipificando la miel y de acuerdo a la flora melífera usada por la abeja para obtención de néctar y polen.

Miel monofloral: Se refiere a la miel que tiene en total granos de polen un 45% que corresponde a la misma especie vegetal, denominada a la especie dominante con respecto a fracción polínica.

Miel Bifloral: Su composición se encuentra en el polen de dos especies de plantas con un 50% de polen.

Miel Polifloral: Se refiere a aquella cuya composición se va a encontrar en granos de polen de 3 o más especies vegetal con un porcentaje total de 45% de polen.

Los tres tipos de clasificación mencionados anteriormente varían conforme a las especies vegetales indicados en la tabla 1: endémicas, nativas, no nativas o mixtas (Codex Alimentarius Commission FAO/OMS, 2001)

Tabla 1.
Clasificación de especies vegetales según su origen, método de extracción y origen botánico

| Clase | Tipo monofloral | Tipo Bifloral | Tipo Polifloral |
|--------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Endémica | Monofloral endémica | Biflora endémica | Polifloral endémica |
| Nativa | Monofloral nativa | Bifloral nativa | Polifloral nativa |
| No nativa | Monofloral no nativa | Bifloral no nativa | Polifloral no nativa |
| Mixta | - | Bifloral mixta | Polifloral mixta |

2.3 Propiedades físico-químicas de la miel

La miel es extraída de los panales como una dispersión acuosa que a lo largo del tiempo se va transformando en un miel cristalizada, obteniendo iones inorgánicos, sacáridos y otros minerales asociados a compuestos orgánicos de solución y a su vez a macromoléculas que están relacionadas coloidalmente como proteínas y polisacáridos, esporas de hongos y levaduras, partículas mayores y granos de polen (Ball, 2007)

2.3.1 Propiedades físicas

Cada especie de planta productora de néctar está compuesta de propiedades físicas. Dependiendo de la recolección de la abeja en cada panal, le corresponde a una miel distinta tanto en lo que concierne aroma, color siendo distintas por diferentes factores como puede ser el tipo de suelo y el volumen de la secreción de néctar y a su vez por las diferencias en su composición química que se encuentra del néctar original (Moniruzzaman, Khalil, Sulaiman, & Gan, 2013)

- **Color**

Es una propiedad óptica de la miel, siendo el resultado de los diferentes grados de absorción de luz en diferentes longitudes de onda (Boussaid *et al.*, 2018). Por otro lado, según Lozano *et al.* (1994), citado por BOETTCHER (1998), el color de la miel se encuentra relacionado específicamente con la parte floral y se debe a la naturaleza química que tiene el néctar en cuanto a sus componentes menores como son los minerales (hierro, cobre y manganeso), dextrinas y material nitrogenado. Sin embargo, Neira (1997) adiciona que el color depende también del contenido de agua durante el proceso de producción de la miel.

El color de la miel radica de la formación de una serie de compuestos pardos como se puede observar en la tabla 2 que a partir del valor mPfund y la absorbancia se puede determinar el color de la miel en diferentes escalas como se observa en la figura 1 y figura 2. Todo el proceso se da cuando la materia orgánica de la miel reacciona con las sales minerales. Por ello, mientras más sales minerales tengan una miel, más compuestos pardos se formaran y más oscura será la miel (Pozo k *et al.*, 2004)

Tabla 2 .
Comparación entre el color de miel, mmPFund y absorbancia

| Miel | mmPFUND | Absorbancia |
|-------------------|----------|-------------|
| Blanco agua | 0-8 | 0,104-0,125 |
| Extra blanco | 8-16,5 | 0,125-0,148 |
| Blanco | 16,5-3,4 | 0,148-0,195 |
| Ámbar extra claro | 34-50 | 0,195-0,238 |
| Ámbar Claro | 50-85 | 0,238-0,333 |
| Ámbar | 85-114 | 0,333-0,411 |
| Oscuro | ➤ 114 | 0,411 o mas |

Tomado de (Alvarez Suárez, 2017, pp. 21-26)



Figura .1 Escala de color de miel liquida

Tomada de (Álvarez Suárez, 2017, pp. 21-26)



Figura 2. Escala de color para miel cristalizada

Tomada de (Álvarez Suárez, 2017, pp. 21-26)

- Sabor y aroma

El sabor es producto diferentes componentes que actúan en conjunto, lo que a su vez está relacionado con el aroma. Algunas sustancias que dan a la miel el aroma dependen de la planta donde se haya extraído el néctar (El Sohaimy, Masry, & Shehata, 2015). Según POZAS (2000), el sabor y el aroma se encuentran definido por el origen floral de la miel, es decir, que de acuerdo a la especie botánica que la abeja tenga para extraer el néctar, será la calidad de la miel a cosechar y a su vez comercializar.

CRANE (1990), define que el aroma de la miel se encuentra dado por sustancias volátiles y que la miel contiene diferentes compuestos, como alcoholes, cetonas, aldehídos y esterres como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3.
Compuestos que definen el aroma

| Alcoholes | Cetonas y Aldehídos | Ésteres |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Benzil alcohol | Formaldehidos | Metilantranilato |
| 2-feniletanol | Propionaldehidos | Metil y etil formato |
| Metanol y etanol | Dimetilcetona | Etil y propil acetato |

Adaptado de (Crane, 1990)

Con lo que respecta al sabor, los ácidos orgánicos en las mieles como se puede observar en la tabla 4, son el grupo que da la característica de sabor de dulce a amargo, mientras más cantidad de ácidos orgánicos tenga la miel se encontrara más acida. Principalmente el ácido glucónico, que es producido por la acción de la glucoxidasa sobre la glucosa lo cual genera el distintivo del sabor (CRANE, 1990).

Tabla 4.
Ácidos orgánicos de la miel

| Ácidos orgánicos de la miel |
|-----------------------------|
| Acético |
| Butírico |
| Cítrico |
| Fórmico |
| Fumárico |
| Glucónico |
| Láctico |
| Maleico |
| Málico |
| Oxálico |
| Piroglutámico |

Adaptado (Crane, 1990)

- **Textura**

La textura se refiere al estado y al tipo de cristalización que tiene la miel, por lo cual, la miel se puede cristalizar de forma natural o a lo largo del proceso de obtención y almacenamiento donde se puede formar aglomeraciones de cristales por su precipitación (Khalil et al., 2012)

La cristalización es un fenómeno natural, de tendencia específicamente física, que se produce en la mayor parte de las mieles tras un periodo más o menos largo en el que intervienen diversos factores. Uno de estos patrones es la saturación de la glucosa o en otros azúcares como melicitosa y algunos polisacáridos que tienen baja solubilidad (Solis-Silva et al., 2018)

Por otro lado, CRANE en 1990, define que la textura depende del proceso de almacenamiento de la miel a temperaturas más bajas que de la colmena, por lo cual algunos azúcares tienden a cristalizar. Por ello, la miel tiende a granular si el contenido de glucosa es alto y también por la razón entre la glucosa y el contenido de agua.

- **Humedad**

La humedad es un parámetro físico que mide el porcentaje de agua que tiene una determinada miel, es una de las características más importantes ya que tiene una gran influencia en la calidad de almacenamiento de la misma (Nordin *et al.*, 2018). Por lo tanto, la presencia de agua es uno de los factores que determinan la conservación, ya que cuando el porcentaje es alto se incrementa el riesgo de fermentación por las levaduras que se encuentran naturalmente presentes en la miel.

- **Conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica se encuentra relacionada con las sales minerales, proteínas, ácidos orgánicos y otros compuestos como polioles o azúcares, es un parámetro que puede determinar el origen de la miel si es mielada o floral (Codex Alimentarius Commission FAO/OMS, 2001). Se ha determinado que la conductividad eléctrica está también relacionada al porcentaje de cenizas, por lo cual, en cada uno de los dos parámetros pueden arrojar valores de la cantidad de sales minerales que tiene la miel. (Sanz, 1994, pp. 143-158)

2.3.2 Composición química

La composición química de la miel está influenciado por diferentes factores como: La fuente floral, las condiciones climáticas, tipos de suelo, temperatura, humedad entre otros factores que se ven afectados por la cosecha y comercialización de la misma (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017)

- **Carbohidratos:**

Los azúcares son los responsables de otorgar el sabor dulce a la miel, la resistencia al crecimiento microbiano y de la formación de hidroximetilfulfural (HMF). Lo que se refiere a GOMEZ (1996), quien define que los carbohidratos además de otorgar el sabor dulce, este no es igual para todas las mieles y que no tienen la misma composición y difiere en varios factores, origen floral, almacenamiento, distribución entre otros.

La cantidad de azúcar presente en la miel varía en 80-83% siendo una fuente de energía para las personas. Los azúcares según el Codex Alimentario (2001) son los responsables de varias propiedades como viscosidad, higroscopicidad, granulación y además se encuentra en conjunto con compuestos minerales nitrogenados y ciertos ácidos.

La miel está compuesta de diferentes azúcares, especialmente fructosa y glucosa, además de sacarosa, maltosa, melicitosa y otros oligosacáridos. (García *et al.*, 1986). Por otro lado, White y Doner (1980), determinaron que la miel tiene un porcentaje de 95 a 99,9% de azúcares y que también se puede clasificar por tamaño y complejidad de las moléculas. Uno de los compuestos principales

son dextrosa (glucosa) y levulosa (fructosa) de composición simple o monosacáridos con un 85% de sólidos de la miel.

- **Ácidos:**

La acidez de la miel proviene de la transformación de la glucosa y se determina por la cantidad de ácido que tiene la miel que el resultado se expresa como (mili-equivalentes por kilo de miel) (Gómez, 1996).

Las características de sabor de la miel se encuentran relacionadas por la acidez, es por ello, que el pH aproximado que debe tener la miel es de 3,9 con un rango de 3,4 a 6 (Crane, 1990).

Los ácidos que tiene la miel suman menos del 0,5% de los sólidos y forma parte de la estabilidad de la miel contra los microorganismos es decir su capacidad antimicrobiana.

La miel está compuesta por varios ácidos, principalmente el ácido gluconico que se produce por la acción de la glucoxidasa sobre la glucosa, los principales ácidos que tiene la miel son orgánicos volátiles como el ácido acético, ácido fórmico y el ácido valérico, mientras que los no volátiles son el ácido gluconico, ácido málico y el ácido cítrico (Thawley, 1969).

- **Actividad Diastasa**

La diastasa es una enzima que se encuentre entre las más importantes desde el punto alimenticio, a su vez que juegan una parte importante en la transformación de la miel. Existen varias enzimas que conceden un carácter de antiséptico a la miel, una de ellas es la catalasa que transforma la glucosa en ácido gluconico liberando agua oxigenada o peróxido de hidrogeno (Gómez, 1996).

La diastasa es una enzima de origen vegetal y su función se basa en catalizar la hidrólisis, primero del almidón en dextrina e inmediatamente en azúcar o glucosa como se puede observar en la figura 3.

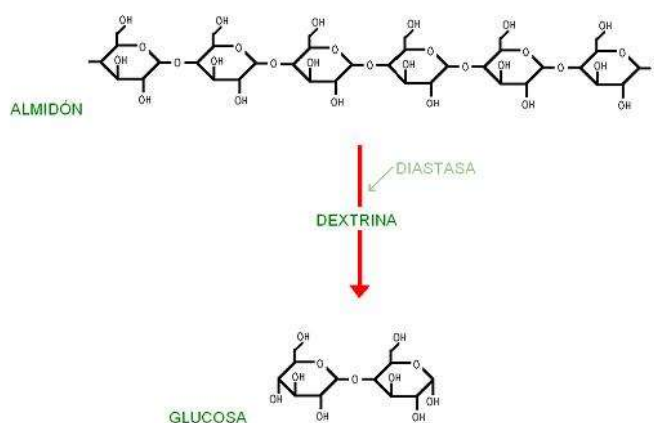


Figura 3. Actividad diastasa forma estructural
Adaptado de (Serrano,2017)

Varios autores coinciden que la enzima diastasa es sensible al calentamiento de la miel, sufre degradación con el tiempo de almacenaje y varía entre los diversos tipos de mieles de acuerdo al: estado fisiológico de la colonia, la abundancia de néctar y su contenido de azúcar, la edad de las abejas y el consumo de polen, siendo un indicador que la miel ha sido sobrecalentada (SERRANO *et al.* 2007).

- Hidroximetilfurfural (HMF)

Este compuesto se forma como consecuencia en acción al calor sobre la glucosa y fructosa, el proceso involucra la pérdida de dos moléculas de agua desde la fructosa (Sainz, 1999). El contenido de HMF y la actividad diastásica determinan el grado de frescura de la miel, al igual, se ha demostrado que a temperatura ambiente el contenido de HMF aumenta exponencialmente con el transcurso del

tiempo teniendo una variación en zonas frías o cálidas (Bosch et al., 1992).

Se ha determinado que se si se almacena la miel a elevadas temperaturas surge un proceso de calentamiento, ello da a que los azúcares contenidos en la miel, especialmente la fructosa pasen por el proceso de transformación a HMF. Por otro lado, la humedad y acidez de la miel son factores que afectan con respecto a la velocidad de formación de HMF, siendo proporcional al contenido de humedad y con el contenido inicial de HMF.

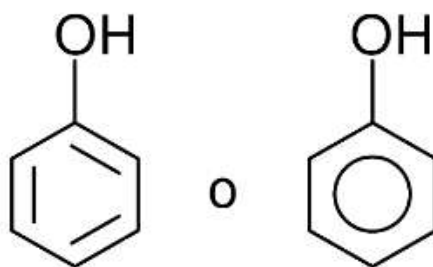
2.3.3 Compuestos químicos

Entre los compuestos bioactivos están principalmente los compuestos fenólicos que constituyen uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios de las plantas, su proceso se basa en la biosintetización donde se protege contra el estrés biótico, abiótico y daño ocasionado por radicales libres, por lo cual se transfieren la miel a través del néctar. Los compuestos se clasifican en dos familias: flavonoides y ácidos fenólicos (Erejuwa, Sulaiman, & Ab Wahab, 2012)

- Fenoles

Los fenoles son compuestos fenólicos que corresponden directamente a la familia de compuestos bioactivos encontrados en forma natural y siendo parte de la actividad antioxidante de la miel. Su estructura química contiene al menos un grupo fenol, esto quiere decir un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilos lo que permitirá que sea un compuesto que se una a otras con el fin de otorgar la capacidad antioxidante y los compuestos bioactivos como

se puede observar en la figura 4 (Mahmoudi, Khali, Benkhaled, Benamirouche, & Baiti, 2016, p.1). Desde el punto de vista estructural es un grupo variado que contiene varias moléculas simples como es el caso de los ácidos fenólicos hasta los polímeros complejos como es la lignina (Cabrera et al., 2017)



*Figura 4.*Eestructura de polifenoles

Los compuestos fenólicos han sido utilizado a lo largo del tiempo como antioxidantes, por otro lado, no se ha descrito el mecanismo de acción pero hay afirmaciones y resultados que muestran tiene una cantidad elevada de derivados naturales y a su vez de formas de oxidación (Subedi et al., 2014, pp.1-2).

-Flavonoides

Los flavonoides, son un compuesto que forma parte de un grupo específico de los polifenoles distribuidos de forma natural en la naturaleza. Actualmente, se han registrado alrededor de 9000 tipos de flavonoides. Varios estudios, recalcaron que la actividad biológica de los compuestos como son los flavonoides actúan como parte de antidiabéticos, anticancerosos, antivirales, antiinflamatorios, antibacterianos, siendo necesario para futuras investigaciones los grupos de polifenoles (Wan & Jiang, 2018, pp.3-4) .

Los flavonoides son compuestos que poseen un bajo peso molecular. Están conformados por un esqueleto de 15 carbonos, y formado por dos anillos de fenilos que se encuentran conectados por un anillo heterocíclico de pirano como se puede observar en la figura 5 (Li *et al.*, 2017; Bi, 2017, p. 3).

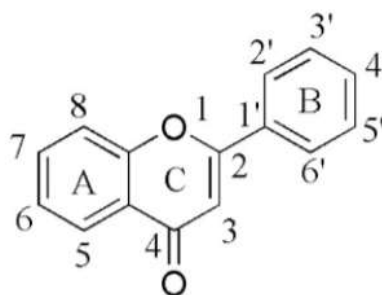


Figura 5. Estructura de flavonoides

Por otro lado, la actividad antioxidante de los flavonoides se encuentra asociado a la presencia de grupos como son los hidroxifenólicos siendo independiente en la estructura químicas y sus potenciales propiedades (Mahmoudi *et al.*, 2016, p. 6) .

- **Peróxido de hidrogeno**

El peróxido de hidrogeno conocido como agua oxigenada es un compuesto químico que tiene diferentes características. Es un líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrogeno como el agua, a su vez, conocido por ser un poderoso oxidante. El peróxido de hidrogeno también es utilizado por sus propiedades antimicrobianas y antisépticas teniendo la miel altas cantidad de peróxido de hidrogeno al igual que de la enzima glucosa oxidasa que es la encargada de convertir la glucosa en peróxido de hidrogeno (Kwakman & Zaat, 2012)

- **Glucosa oxidasa**

La glucosa oxidasa es una enzima que la abeja adiciona al néctar para transformar la sacarosa a glucosa y fructosa y un paso importante para la transformación del néctar a miel, esta enzima se origina en la glándula hipofaríngea de la abeja. Por lo tanto, se ha encontrado que la glucosa oxidasa actúa sobre la glucosa en presencia de oxígeno, produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrogeno, siendo uno de responsables de la inhibición o actividad antibiótica que se atribuye a la miel hace mucho tiempo. (García *et al.*, 1986)

2.3.4 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los alimentos se define como la medición analítica donde se determina la concentración de radicales libres o reducción de hierro (Ferreira *et al.*, 2009). En ciertos alimentos de origen vegetal, se atribuye esta capacidad a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente a los flavonoides mencionados anteriormente.

Los radicales libres son la parte química que se da por electrones desapareados, lo cual confiere inestabilidad en ciertas células. Estos compuestos van a reaccionar de forma covalente con ciertos tipos de macromoléculas, una de ellas son las proteínas que forman electrófilos que es un reactivo química atraído hacia zonas ricas de electrones, por otra parte, las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno que son (RNS Y ROS) son los que poseen una capacidad de originar reacciones en cadena de tipo redox (oxido- reducción), provocando una oxidación en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Jaramillo & Valdivia, 2016, pp 15-142)

A su vez , el estrés oxidativo, se da por una producción elevada de radicales libres y determina ciertos daños en el organismo o a su vez es la encargada de sintetizar el ATP (Alothman *et al.*, 2009)

La actividad antioxidante es considerada como una de los principales mecanismos fisiopatológicos que se encuentran relacionados con la aparición de enfermedades, siendo crónicas no trasmisibles alguna de ellas (Eckhard *et al.*, 2010).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos que se encuentran tanto en plantas como en mieles se da por distintos procesos, uno de ellos es la donación de hidrogeno y a su vez la captación de radicales libres Álvarez- Suarez, 2017, pp.83-86; Cortés, Vigil & Montenegro 2011, pp 303-317)

2.4 Importancia y producción de miel en el Ecuador

En Ecuador la producción de miel se encuentra en varias regiones desde los Andes Ecuatorianos hasta la costa ecuatoriana y su fuente de floración principal es el *Eucaliptus globulos*, aunque se refiere en cambiar de sitio al apiario siguiendo la zona geográfica, el 10% de producción de miel se da en la costa y amazonia del país (Pesantez, 2000).

Según el MAGAP, para el 2016 la producción anual por colmena rodea los 35kg, con un promedio de 25 colmenas por apicultor, en general se cosecha de 3 a 4 veces por año y la producción máxima por colmena anualmente es de 90kg.

Las especies de mayor interés apícola son: *Megachilidae*, conocida por construir sus nidos con trozos de hojas (principalmente alfalfa) y ser fuertes polinizadoras. *Apis dorata*, abeja de gran tamaño que no admite ser mantenida en colmenas y construye un solo panal muy grande. *Apis florea*, construye un solo panal pequeño y tampoco permite ser mantenida en colmena. *Apis cerana*, Construye varios panales paralelos y protegidos de la intemperie, además si permite ser mantenida en manejos productivos. *Apis mellifera*, contruye también panales paralelos protegidos y permite ser manejada con facilidad (Espinoza Toledo et al., 2018)

La miel de eucalipto siendo una de las más importantes en Ecuador, se produce cuando las abejas liban a las flores de eucalipto, su coloración ambarina oscila entre los 7 y 60 mm Pfund (Galetti, 2000), su flor es muy receptiva a distintas morfologías de polen, más del 80% entre 41 tipos distintos de polen (Ciappini & Vitelleschi, 2013) .

La miel es ampliamente conocida por sus propiedades expectorantes, antisépticas, antiinflamatorias, y antioxidantes, mismos compuestos a los que se les atribuye una benéfica promoción a la salud por retardar e incluso neutralizar los perjudiciales efectos de los radicales libres y el estrés oxidativo, causantes de un sinnúmero de enfermedades crónicas como el cáncer y patologías cardiovasculares, en otras palabras, protegiendo al organismo humano ante el daño celular.

En investigaciones realizadas, esta miel muestra ser la de mayor capacidad antioxidante en ensayos DPPH, ABTS/ABAP, ensayo 2-desoxi-D-ribosa, y ensayo del anión superóxido. Además, mostró poseer una cantidad beneficiosa de diversos compuestos fenólicos como los ácidos: clorogénico, siríngico, coumárico, y la apigenina, así como también la miel con mejor

conductividad eléctrica y de mayor cantidad de polifenoles y flavonoides totales. (Muñoz , y otros, 2014) (Galetti, 2000)

El proceso de producción de miel, se basa en la colmena ya que se necesita principalmente de una temperatura interna de colmena de 34 a 36°C para el desarrollo de sus crías, junto con una humedad del 65 a 75%.

Para su cosecha se empieza por armar la logística de los panales, esto implica adaptar a cada colector con el equipo de protección necesario y herramientas cruciales para el manejo de las colmenas o panales, como: ahumador, pinzas, espátula y cepillo. Seguido esto, se coloca un toldo en el sitio de recolección y se emplea los ahumadores. Con el objetivo de manejar de menor manera a las abejas, se procede después a revisar colmena por colmena, luego, de cada panal se retira el opérculo o la cera acumulada que protege los sitios de acumulación de miel, donde después se pasa los mismos a una centrifuga que recolecta y homogeniza la miel extraída de cada panal, por lo general se realiza por tres minutos. Se centrifuga en ambos sentidos para poder recolectar la miel de cada cara del panal, la velocidad de la centrifuga depende de la densidad de la miel. Por último se retira la miel de la centrifuga y se almacena para ser llevada a un proceso de purificación o filtración que elimina los restos de cera. Los filtros industriales suelen ser de acero inoxidable con filtros o coladores del mismo material, luego el producto pasa al control de calidad y de nutrientes.

Los parámetros de calidad se revisan para su futura distribución. Se cuida que la humedad no pase de 20% por temas de fermentación. La cantidad de azúcares esté cerca de 80^a Brix, el PH que se debe encontrar entre: 3,4 – 6,16, y por último se mide la disolución de los azúcares con un medidor de conductividad eléctrica, la cual debe tener menos de 0,8mmol. Después se pasa al proceso de envasado el cual se realiza de manera individual por

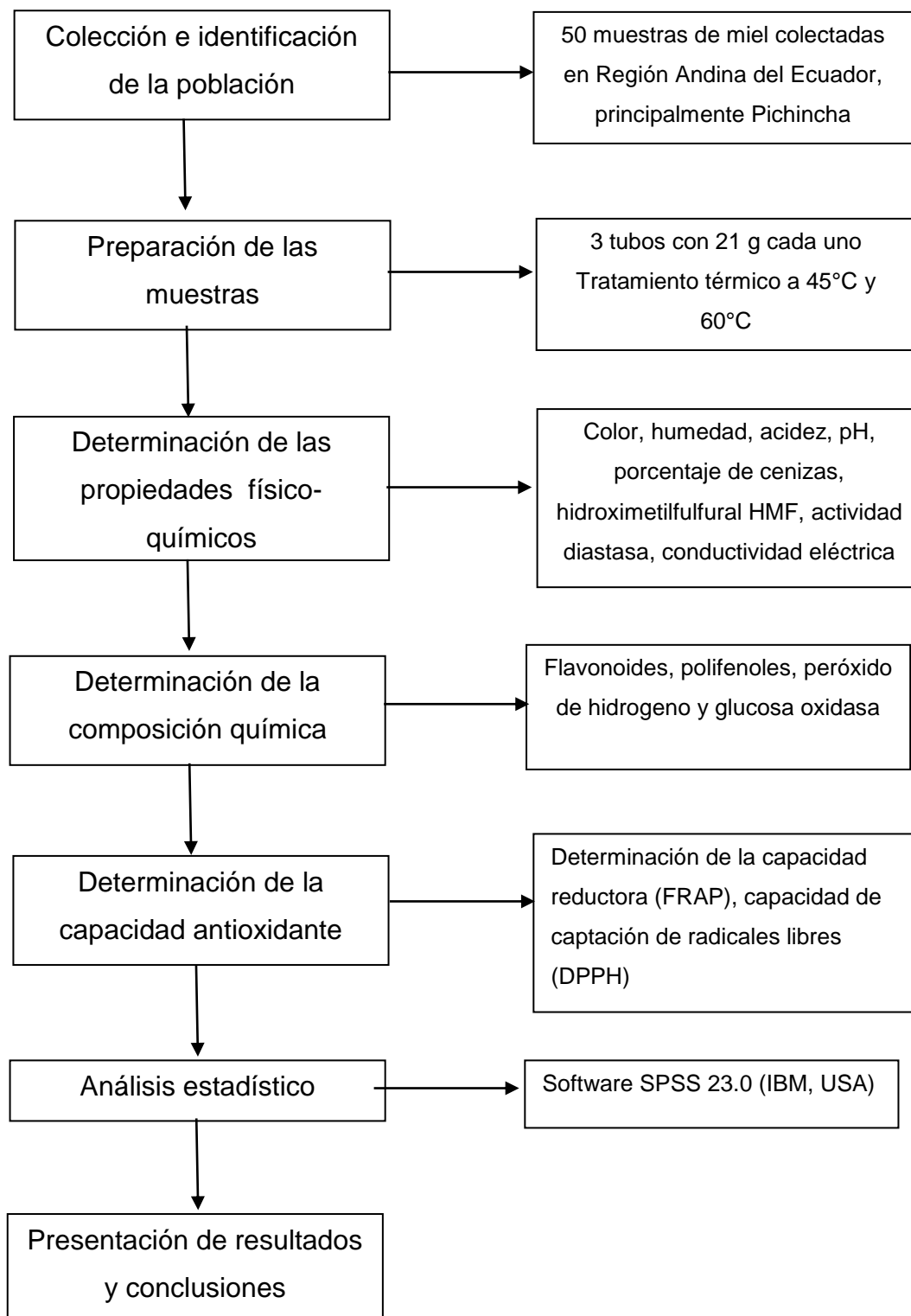
frasco, para luego pasar a la pasteurización, la cual elimina cualquier contaminante y asegura una larga vida al producto, y por último se pasa al etiquetado y comercializado (Gualotuña Guachamín, 2015)

2.5 Temperatura y la miel

El tratamiento térmico por el que pasa varios tipos de mieles en escala industrial puede afectar los nutrientes por un aumento de 60°C de temperatura a la miel. El proceso se basa en que los azúcares se van a solidificar y resulta un problema al momento del envase. Es por ello que grandes industrias llevan al proceso de pasteurización a la miel, donde puede alcanzar los 70 a 80°C (Bhat *et al.*, 2013). Es preferible utilizar una miel sin que haya pasado por un proceso de calentamiento, a pesar de que se encuentren sus valores dentro de los rangos establecidos por el Codex Alimentarius o su vez ocupar equipos menos invasivos y a menor temperatura para obtener una adecuada licuefacción de la miel (Greenleaf & Kremen, 2006).

3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Diseño Experimental



3.2 Población y muestra

Las mieles utilizadas para la investigación fueron recolectadas directamente de los apicultores de la Provincia de Pichincha, siendo los representantes del 50% dentro de la región Andina del Ecuador. Los cantones de donde se obtuvieron las muestras fueron: Quito (Tumbaco, Pintag, Amaguaña y Chillogallo), Mejía (Machachi) y Cayambe (Cangahua). Se escogieron un total de 10 apicultores, con respecto al número de apiarios que fueron no menor a 20, lo cual, representa el 50% del total de colmenas de miel en la provincia. Posteriormente, se tomaron tres muestras al azar de cada apiario. Las muestras de miel se colectaron en frascos estériles y se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad

3.2.1 Preparación de las muestras

Se utilizó muestras de miel que no habían sido sometidas a tratamientos térmicos. Por lo cual, se pesó 21 gramos de cada miel los cuales se dividieron en tres tubos cónicos de 15 mL cada uno. Dos tubos fueron sometidos a tratamiento térmico entre 45°C y 60°C respectivamente en baño María (WNB 14 ,USA). Se determinó el tiempo del proceso de licuefacción de estado cristalino a estado líquido para los posteriores análisis.

A su vez, se realizó una miel artificial (1.5 g de sacarosa, 7.5 g de maltosa, 40.5 g de fructosa y 33.5 g glucosa en 17 mL de Agua) para eliminar cualquier interferencia que pueda haber en diferentes compuestos químicos y parámetros físico-químicos (Cooper *et al.*, 2002)

3.3 Determinación de parámetros físico-químicos.

3.3.1 Color

Para la determinación del color se utilizó el protocolo descrito por Delmor et al., (2010, pp 145-152). Se pesaron 0,1 gramos de miel en 1 mL de agua destilada, posteriormente se colocó en una cubeta de plástico y se esperó 10 minutos. Finalmente, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (VV mini-1240, Brasil) a una longitud de onda de 635 nm. La absorbancia obtenida se determinó de acuerdo a la escala de *Pfund* que es utilizada para la clasificación del color según el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission FAO/OMS, 2001) . Los resultados se expresaron en mm *Pfund*.

3.3.2 Humedad

El contenido de humedad se determinó según la Norma mexicana de Miel F-036 (2000, p. 5). Se realizó la medición del índice de refracción de la miel a 20°C. Se pesaron 0.1 g de miel y se colocaron directamente en el lente del refractómetro (ATAGO, USA). El análisis de contenido de humedad se expresó en porcentaje de humedad que tiene la miel.

3.3.3 pH.

La determinación de pH en la miel se realizó siguiendo el protocolo descrito por la Norma Mexicana F-036 (2000). En un vaso de precipitación de 50 mL se pesaron 2.5 g de muestra de miel y se diluyeron en 18.75 mL de agua destilada. El pH se determinó empleando un potenciómetro (Fisher Scientific, USA). Los resultados se expresaron a partir de la escala de pH si se encontraba en medio ácido o básico.

3.3.4 Conductividad eléctrica

Para la determinación de la conductividad eléctrica en las mieles, se realizó a partir de la metodología descrita por Sanz y Sanz (1994). Se diluyeron 2.5 g de muestra de miel en 25 mL de agua destilada. Posteriormente se midió la conductividad eléctrica mediante un conductímetro (Fisher scientific, USA). Los resultados para conductividad eléctrica se expresaron en unidades de mS/ cm.

3.3.5 Actividad Diastasa en la miel

Para la determinación de la actividad diastasa, se utilizó el protocolo descrito por la Norma mexicana de Miel F-036 (2000). Antes de comenzar a determinar el índice de diastasa, se determinó la dilución de almidón soluble (Fisher Scientific) que va a ser necesaria para poder normalizar la cantidad necesaria de almidón que va a reacción con la solución de Yodo 0.0007 N con el fin de obtener una absorbancia entre 0.760 ± 0.02 . Al obtener la dilución normal, las muestras de miel fueron pesadas a 0.1 g en 1 mL de buffer acetato, 4 mL de agua destilada y 0.6 mL de solución de cloruro de sodio (Fisher Scientific) y se aforaron a 10 mL con agua destilada. Posteriormente, dos tubos de ensayo fueron calentados por 10 minutos en baño maría a 40°C; uno de los tubos contenía 2 mL de solución de miel y en el otro tubo 1 mL de solución de almidón. Pasado el tiempo determinado, se unieron los dos tubos para que se realice la reacción necesaria, tomando en cuenta que se mantuvieron en baño maría a 40°C. Luego, cada 5 minutos se tomaron alícuotas de 50 μ L que fueron añadidas en microtubos de 1.5 mL con la solución de yodo 0.0007 N hasta que la absorbancia llegue a 0.235 nm en una longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro (Shimadzu, USA). Los resultados para la actividad diastasa fueron expresados en Índice de diastasa (°Gothe).

3.3.6 Contenido de Hidroximetilfulfural (HMF)

El contenido de Hidroximetilfulfural se determinó por la metodología descrita en la Norma mexicana de Miel F-036 (2000). Las muestras de miel fueron pesadas

2.5 g y diluidas en 2.5 mL de agua destilada, aforando a un volumen final de 5 mL de agua destilada. Luego, se añadió 0.05 mL de la solución de Carrez I que se detalla en la tabla 5, posteriormente se homogenizo la solución. Después se añadió 0.05 mL de la solución del Carrez II que se detalla en la tabla 5, se aforo a un volumen de 5 mL de agua destilada. Luego, se filtró las soluciones con papel filtro y se descartó 1 mL del filtrado. A continuación, se adiciono 1 mL de agua destilada en uno de los tubos que contenían la muestra y a su vez 1 mL de la solución de referencia de bisulfito de sodio siendo la referencia. Se procedió a homogenizar y se determinó la absorbancia en 284 y 336 nm en celdas de cuarzo. Se diluyó la muestra con agua destilada y la solución de referencia con una solución al 0,1 % cuando dio una absorbancia mayor a 0,6. Los resultados se expresaron en la siguiente formula:

$$\frac{mg\ HMF}{kg\ de\ miel} = (\Delta 284 - \Delta 336\ Muestra - referencia) * \frac{14.97 * 5}{Peso\ en\ gramos * 10}$$

Tabla 5.
Preparación de soluciones de Carrez

| Solución | Preparación |
|------------------|--|
| Carrez I | Se pesó 1.5 g de ferrocianuro de potasio trihidratado ((K ₄ Fe (CN) ₆ . 3 H ₂ O) en 10 mL de agua destilada |
| Carrez II | Se pesó 3 g de acetato de zinc dihidratado ((Zn (AcO) ₂ . 2 H ₂ O) en 10 mL de agua destilada. |

3.3.7 Contenido total de cenizas.

El contenido de cenizas se realizó mediante el procedimiento descrito en la Norma mexicana de Miel F-0.36 (2000). Los crisoles fueron pesados previo a colocar las muestras respectivas. Posteriormente, se pesaron 2.5 g de miel de eucalipto. Las muestras fueron calcinadas en una plancha de calentamiento

hasta que se haya evaporado la mayor cantidad de líquido presente. Finalmente, las muestras calcinadas se colocaron en la mufla (Acequilabs, Colombia) durante 4 horas a una temperatura de 500°C. Se colocaron en un desecador por una hora y luego fueron pesadas donde se realizó el cálculo correspondiente de acuerdo a los pesos tomados a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{c - b}{a - b} * 100$$

$$a = \text{crisol} + \text{muestra}$$

$$b = \text{crisol}$$

$$c = \text{crisol} + \text{cenizas}$$

Después de las ecuaciones mencionadas anteriormente el resultado se expresó en % de ceniza.

3.3.8. Aminoácidos libres

Para la determinación de aminoácidos libres se utilizó el método de Ninhidrina-Cadmio (Flores *et al.*, 2014). Se realizó la curva de calibrado como primer estándar partiendo de la disolución madre de L-leucina (Sigma Aldrich) con la concentración de 60 mg/ L en agua destilada. Se utilizó Prolina (Sigma Aldrich) con la concentración de (10-50 mg/mL) como un segundo estándar. Se realizaron las curvas estándar con diferentes concentraciones seriadas de L-leucina (2-42 mg/L) con un R² de 0.97 y de Prolina con las concentraciones de (10-50 mg/ mL) con un R² de 0.98. Para el análisis de las muestras se pesaron 0.1 gramos en 20 mL de agua destilada, se colocó 1 mL de muestra o patrón con 2 mL del reactivo de Ninhidrina, 80 mL de etanol 99% con 10 mL de ácido acético y con 1 mL de CdCl₂. Se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro (Shimadzu, Usa) a 507 nm. A su vez se realizó un blanco donde se sustituyó la muestra por agua destilada. Finalmente, los resultados fueron expresados en equivalentes de Leucina/Prolina por 100 g de miel.

3.4 Determinación de compuestos químicos

3.4.1 Contenido total de flavonoides

Para la determinación de contenido total de flavonoides se utilizó la técnica descrita por Dewanto *et al* (2002, pp. 3010- 3014). Previamente se realizó una curva estándar de catequina en concentraciones de (0.02-0.154 mM) con un R^2 de 0.99. Se pesaron 0.1g en 1 mL de agua destilada. Luego, se tomaron 20 μ L de muestra y se colocó en una placa de microtitulación junto con 100 μ L de agua destilada y 6 μ L de la solución de NaNO_2 (Sigma Aldrich) al 5% y se incubo durante 6 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió 12 μ L de la solución de AlCl_3 y se incubo durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 40 μ L de NaOH 1M y 22 μ L de agua destilada. En último lugar, se midió la absorbancia de esta solución a 510 nm contra un blanco que posee agua destilada en vez de miel. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina por 100 gramos de miel (mg Catequina/100 g miel).

3.4.2 Contenido total de fenoles totales

Los fenoles totales se determinación según la técnica utilizada por Slinkard y Singleton (1977, pp. 49-55). Previamente, se realizó una curva estándar de Ácido Gálico (Lobachemie) con concentraciones de 0.1875 a 1 mM con un R^2 de 0.99. Las soluciones de miel se prepararon con 0.1 g de miel en 5 mL de agua destilada. En microtubos de 1.5 mL se colocaron 100 μ L de la muestra, en otro tubo se colocó el blanco de agua destilada y en otro el estándar junto al reactivo Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich) que fueron 500 μ L. Se esperó 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para que se realice la reacción. Después, se añadió 400 μ L de Carbonato de Sodio y se incubo por 2 horas. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (Shimadzu, Usa) a 760 nm contra un blanco de agua destilada en vez de miel. Los resultados fueron expresados como equivalentes de Ácido Gálico por 100 gramos de miel.

3.4.3 Contenido de Peróxido de Hidrogeno

La determinación del peróxido de hidrogeno se llevó a cabo por el método modificado FOX-1 por Li *et al* (2017, pp. 225- 231). Previamente se realizó la curva estándar con las concentraciones de peróxido de hidrogeno al 30% (0-5 nmol H₂O₂). con un R² de 0.98. Se utilizaron las siguientes soluciones: Solución 1 (Sulfato ferroso de amonio 25 mM con Ácido sulfúrico 0,25 M), solución 2 (62,5 µM xileno y x150 mM sorbitol) y la solución de trabajo FOX-1 (solución 1 mas solución 2 en una proporción 1:100). La concentración que se utilizo fue de 100 mg/mL. Para la reacción se realizó en una mezcla de 133,33 µM de la solución de trabajo FOX-1 con 66 µL de muestra de miel en una placa de microtitulación. Posteriormente, las soluciones fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se leyó a 580 nm en lector de placas (Bio- Tek, USA) con su respectivo blanco que es agua destilada en vez de la muestra. Los resultados se expresaron en milimol de peróxido de hidrogeno (mM de H₂O₂).

3.4.4 Glucosa oxidasa

La determinación de Glucosa oxidasa en la miel, se realizó a partir de Glucose oxidase activity assay Kit de Sigma- Aldrich. Previamente se realizó la curva estándar con concentraciones de (0- 5 nmol de H₂O₂). Las muestras de miel fueron pesadas 0.1 g de miel 1 mL de agua destilada. Se descongeló el GOX Assay Buffer, posteriormente, se puso en alícuotas el GOx Developer, Fluorescent peroxidase y GOx Substrate. Para cada muestra se añadió cada uno de los reactivos por triplicado en una placa de microtitulación. Se incubó cada placa a 37°C sacándola cada 3 minutos y midiendo en el espectrofotómetro

(Shimadzu, Usa) a 570 nm hasta obtener un valor de actividad de glucosa oxidasa. Los valores reportados de actividad GOx fueron en nmol/ mL.

3.5 Actividad antioxidante en la miel

3.5.1 FRAP (Poder antioxidante reductor de hierro).

Se determinó la capacidad de captación de radicales libres utilizando el método de FRAP (*ferric reducing/antioxidant power*); procedimiento previamente descrito por Benzie y Strain (1999, pp.15-36). Previamente se realizó una curva estándar a partir de una solución madre de Trolox 5 Mm (0,313 g de Trolox (Sigma- Aldrich) que fueron disueltos en 25 mL de etanol absoluto). Se realizó una curva estándar con concentraciones desde 5 mM a 50 μ M respectivamente. Se procedió a realizar en una placa de microtitulación donde se colocaron 20 μ L de la muestra/estándar/blanco y 180 μ L de la solución FRAP que se puso (diez partes de solución de acetato de sodio trihidratado 300 mM, una parte de la solución TPTZ 10 mM y finalmente una parte de la solución de cloruro férrico 20 Mm). Para la medición se hizo a través del lector de placas (Biotek/Synergy) y los resultados fueron expresados en μ mol de trolox por g de miel.

3.5.2 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).

A partir del método descrito por (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997), se determinó la capacidad de captación de radicales libres. Previamente, se realizó una curva estándar de Trolox con concentraciones desde 5 a 500 μ M. Para las muestras, se colocaron en una placa de microtitulación en 80 μ L de DPPH 0,2 Mm (Alpha Aesar), 10 μ L de la muestra y 110 μ L de agua destilada. Para preparar el blanco se colocaron 80 μ L del reactivo DPPH 0,2 mM (Alpha Aesar), 10 μ L de etanol absoluto y 110 μ L de agua destilada con el fin de tener una proporción adecuada para el valor final y la obtención del porcentaje de DPPH.

Se incubó la placa por 15 minutos a temperatura ambiente en completamente oscuridad, y se midió su absorbancia en el lector de placas (Biotek/Synergy) a 517 nm.

Para la obtención de resultados se utilizó la siguiente ecuación:

$$DPPH \text{ scavenging activity } (\%) = \left(1 - \frac{Abs \text{ muestra} - Blanco \ 2}{Blanco \ 1}\right) * 100$$

De esta manera los resultados obtenidos fueron expresados en μmol de Trolox por g de miel.

3.6 Análisis estadístico de resultados

Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics para Windows versión 20.0. Se realizó un análisis multivariado (MANOVA) para las propiedades fisicoquímicas, la composición química y la temperatura a que fue sometida la miel. La correlación de Bonferroni se usó en ambos casos para el análisis post hoc ajustando para la comparación de grupos múltiples. Las correlaciones entre las variables se calcularon utilizando el coeficiente de Pearson. En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Caracterización físico-química de mieles de eucalipto

Para el control en la caracterización físico-química se realizaron todos los parámetros que se encuentran dentro de lo establecido por el Codex Alimentarius como se observar en la tabla 6. Estos parámetros son determinados con el fin de identificar si la miel de eucalipto se encuentra

adulterada o si se ha agregado algún ingrediente, sí su materia orgánica, aroma o sabor se ha cambiado o sí los valores obtenidos se encuentran dentro de lo establecido tanto en la media como en la desviación estándar por el Codex Alimentarius (CODEX STAND, 1999).

Tabla 6.
Parámetros físico-químicos de mieles de eucalipto

| Parámetros físico-químicos | Miel de Eucalipto Control |
|--|----------------------------------|
| Azúcares totales (g/ 100 g de miel) | 75.30 ± 6.89 |
| Color (mm Pfund) | 63.34 ± 26.99 |
| Humedad (%) | 20.25 ± 2,327 |
| Hidroximetilfulfural (HMF) (mg de HMF/ kg de miel) | 6.835 ± 8.51 |
| Conductividad eléctrica (mS/cm) | 0.56 ± 0.324 |
| Ph | 3.87 ± 0.48 |
| Cenizas (%) | 0.48 ± 2.10 |
| Solidos insolubles (g/ g de miel) | 0.014 ± 0.008 |
| Índice de Diastasa (°Gothe) | 27.90 ± 16.58 |

Nota: Los valores representados son diferentes para un $P < 0.05$

Los resultados que se obtuvieron de los azúcares totales en mieles de eucalipto se encuentra en una media de 75.30 g en 100 g de miel, por lo tanto, se encuentran dentro del rango del establecido por el Codex Alimentarius donde no debe ser menor de 60 g en 100 g de miel como se puede observar en

la tabla 8. El Sohaimy *et al* (2015), señalaron que la miel está compuesta principalmente de carbohidratos que constituyen aproximadamente el 95% de su materia seca, siendo una mezcla de azúcares lo cual hace que la miel sea de digestión inmediata y a su vez que aporte nutrientes al cuerpo. Por otro lado, los datos obtenidos son consistentes de acuerdo a Nordin, Sainik *et al* en el 2018, que obtuvieron un valor similar de 70.20 g en 100 g de miel, siendo este componente importante dentro de las principales características sensoriales y fisicoquímicas que se encuentran relacionados con el sabor, viscosidad entre otros. Sin embargo, Santos-Buelga & González-Paramás (2017), obtuvo un resultado mayor al rango del Codex Alimentarius señalando que la cantidad de azúcares se encuentran relacionados con el origen floral de la miel y a su vez por la cosecha y manipulación de la misma.

La miel de eucalipto, con respecto al color, califica en un ámbar extra claro teniendo un valor de 63.34 *mmPfund* por lo que se encuentra dentro de los valores del Codex Alimentarius que son entre (34-70 *mmPfund*) y a su vez reportado por (Delmoro *et al.*, 2010) y (Boussaid *et al.*, 2018). Asimismo, Labropoulos & Anestis (2012), afirman que el color de la miel depende de los pigmentos derivados de especies vegetales tales como los carotenos, polifenoles y flavonoides. Tomando en cuenta, que la miel de eucalipto en monofloral debe tener ese color característico. A pesar de que existe una gama de colores, las predominantes en las mieles son en tonos castaños o ámbar (Alvarez-Suarez *et al.*, 2014). Sin embargo, (Flores *et al.*, 2008) mencionaron en su estudio que los valores reportados anteriormente son menores en comparación a mieles de eucalipto de Iberia clasificadas como ámbar claro ya que esto depende del origen floral, temperatura y manipulación de la miel. Aunque en Israel se obtuvo valores similares en mieles de eucalipto debido a las condiciones climáticas (Dag *et al.*, 2006)

La humedad en la miel es uno de los parámetros que se encuentra relacionado directamente con la calidad de la misma, ya sea por las condiciones ambientales, manipulación durante la etapa de cosecha o el almacenamiento (Ball, 2007). Por ello, el contenido de humedad en mieles de eucalipto obtuvo un valor de 20.25%, siendo, valores similares que fueron comparados con las normas de calidad conforme al Codex Alimentarius que no debe sobrepasar el rango de 15 a 22%, ya que al sobrepasar podría verse afectada por el proceso de fermentación por presencia de microorganismos (Khalil *et al.*, 2012). García-Tenesaca *et al.*, (2018) Obtuvieron un resultado de 16.42% de humedad por lo cual mencionó que el proceso de almacenamiento y envasado puede incrementar la humedad.

El parámetro hidroximetilfulfural (HMF) se refiere a un compuesto que se encuentra de forma natural en la miel, siendo un factor clave para la determinación de la frescura de la miel (Khalil *et al.*, 2012). De acuerdo a Solis-Silva *et al.*, (2018), afirmaron que el HMF se forma rápidamente en un medio ácido y a altas temperaturas lo que se relaciona con el calor a la que la miel es sometida, grado de envejecimiento o a las condiciones de almacenamientos. Por otro lado, la norma calidad de la miel conforme al Codex Alimentarius tiene un rango establecido que debe ser mayor a 40 mg/ kg y en regiones tropicales no debe ser más de 80 mg/kg principalmente en mieles de *Apis mellifera* (Codex Alimentarius Commission FAO/OMS, 2001). Por lo cual, con los resultados obtenidos que son de 6.83 mg de HMF/100 g de miel, se puede determinar que la miel no ha sido adulterada y no ha pasado por una mala manufactura.

El índice de diastasa es un parámetro que determina al igual que el HMF la frescura de la miel. Ulloa *et al.*, (2010) mencionan que el índice de diastasa pierde su actividad al ser expuesta a altas temperaturas o cuando la miel ha sido almacenada por largos periodos de tiempo. Según Ordóñez *et al.*, (2005),

determinaron que las mieles de mielada siempre van a tener un índice superior a las del origen floral, por ello el Codex Alimentarius determina un valor superior a 8 unidades. Por lo cual, los resultados obtenidos que son 27.90 °Gothe, corroboran que la miel de eucalipto en su temperatura ambiente cumple con las normas de calidad conforme al Codex Alimentarius.

La conductividad eléctrica es un parámetro físico que analiza cuantas sales minerales, proteínas y ácidos orgánicos tiene la miel, a su vez es un indicador de las características del suelo. Por lo cual, los resultados obtenidos que son 0.56 mS/ cm , corroboran que la miel se encuentra dentro del rango establecido por el Codex Alimentarius. El Codex Alimentarius, con respecto a la conductividad eléctrica, determina que éste valor debe ser menor a 0,8 mS/cm. Además, se ha encontrado que algunas mieles monoflorales como son las de fresa, lima, brezo, castaña, árbol de té se encuentran con valores mayores a las del Codex Alimentarius, siendo excepciones que se dan dentro de la Unión Europea. Sin embargo, (Bentabol *et al.*, 2011; Dag *et al.*, 2006) ha demostrado que mieles de aguacate tienen valores superiores a 0.8 mS/cm, mientras que las mieles de eucalipto se encuentra en valores similares a las mieles de España. Cabe mencionar, que Da Rosa, (1973) explica que la conductividad eléctrica se encuentra relacionada con el contenido de cenizas, por lo cual mientras allá una conductividad más alta abra más contenido de cenizas. Por otro lado, García-Tenesaca *et al.*, (2018) aporoto que obtuvieron un porcentaje de cenizas alto en la miel de aguacate y en la miel de eucalipto un porcentaje dentro del rango normal.

El Sohaimy *et al.*, (2015) ha confirmado que el pH es un parámetro importante ya que ayuda a determinar la frescura, textura, estabilidad y calidad de la misma. El rango de pH obtenido en las muestras de miel es acida teniendo una media de 3.87. Dag *et al.*, (2006); Terrab & Heredia, (2004), obtuvieron que la miel de aguacate tiene un pH más acido superando a las mieles de eucalipto

en el rango de 3.96-5-23. Sin embargo, la norma de calidad de la miel no ha establecido un rango de pH, pero se ha encontrado valores similares en mieles de eucalipto que se encuentran dentro del rango de las muestras estudiadas (Gethin *et al.*, 2008). A pesar, de encontrarse dentro de los rangos de pH, éste puede cambiar cuando existe una mayor humedad, lo cual se encuentra relacionado con el aumento de la producción de ácido glucónico y con la presencia de los compuestos fenólicos y ácidos fenólicos (Londoño & De, 2012).

Los sólidos insolubles es un parámetro que detecta el grado de impurezas en la miel, al igual que afecta a las propiedades físicas del producto como la textura y estabilidad de la misma. Los resultados obtenidos con una media de 0.014 g/g de miel, determina que se encuentran dentro del rango del Codex Alimentarius por lo cual, las muestras de miel se encuentran en una buena calidad y sin impurezas. Córdova-Córdova *et al.*, (2013), obtuvo resultados similares de 4 tipo de muestras en diferentes regiones, mientras que en mieles de eucalipto tuvo valores superiores de 0.1%.

Se realizó un análisis de clústers o análisis de conglomerados (figura 6), donde se puede observar que existen dos grupos grandes de conglomerados. El primer grupo está relacionado con sólidos insoluble, hidroximetilfulfural, actividad diastasa, color y conductividad eléctrica. Mientras que el otro grupo se encuentra acidez, humedad y azúcares, concluyendo que en la agrupación los sólidos insolubles influyen más sobre los otros parámetros físico-químicos en mieles no tratadas.

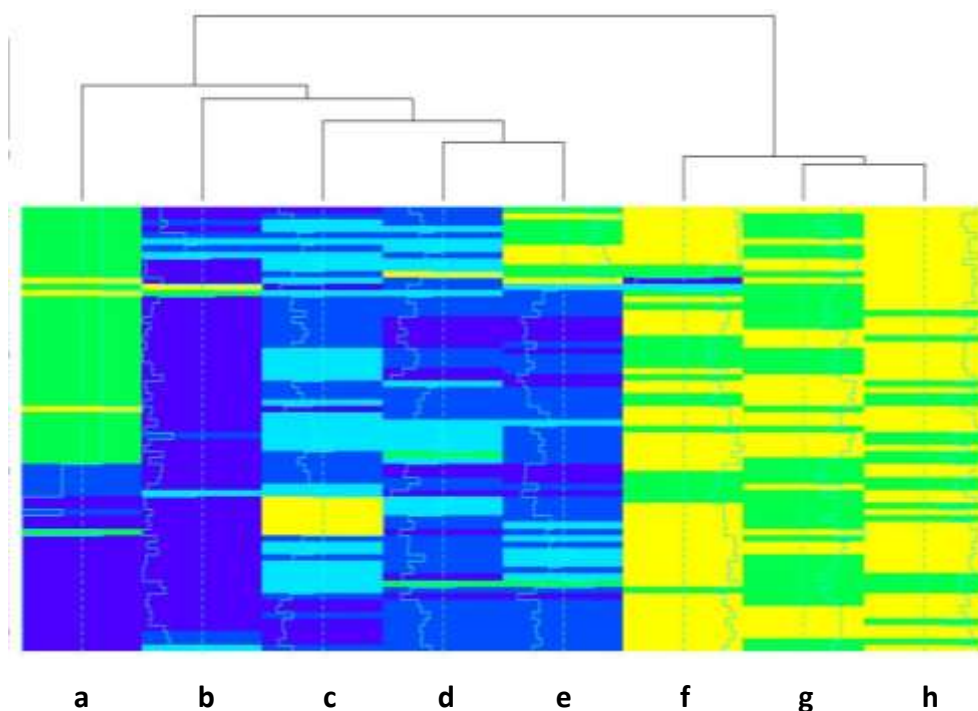


Figura 6. Representación gráfica del análisis de conglomerados

4.2 Caracterización físico-química en mieles de eucalipto con tratamiento térmico

Para el tratamiento térmico de las mieles de eucalipto a 45°C Y 60°C se tomó el tiempo como se puede observar en la tabla 7 con respecto a la media y desviación estándar de la misma

Tabla 7

Tiempo de tratamiento térmico de las mieles de eucalipto

| Tiempo tratamiento térmico | Temperatura 45°C | Temperatura 60°C |
|----------------------------|------------------|------------------|
| Tiempo (horas) | 23.75 ± 10.51 | 3 |

Nota: Los valores representados se encuentran como media y desviación estándar

Representación gráfica del análisis de conglomerados (figura 6): a solidos insolubles, b hidroximetilfulfural, c actividad diastasa, d color, e conductividad, f acidez, g humedad, h azucares

A su vez, con lo que relaciona la caracterización físico-química se tomó en cuenta los parámetros principales que se encuentran afectados con el calor, siendo la humedad, hidroximetilfulfural (HMF) y índice de diastasa según lo reportado por el Codex Alimentarius como se puede observar en la tabla 8 (Codex Alimentarius Commission FAO/OMS, 2001).

Tabla 8.
Parámetros físico-químicos con tratamiento térmico

| Parámetros físico-químicos | Temperatura | | |
|---|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | Control | 45°C | 60°C |
| Humedad | 20.25± 2.33 | 18.77± 3.11 | 18.53 ± 2.27 |
| Hidroximetilfulfural HMF (mg de HMF/ Kg de miel) | 6.84 ± 8.51 ^a | 15.12 ± 13.96 ^b | 9.56 ± 8.55 |
| Índice de Diastasa (°Gothe) | 27.9 ± 16.57 ^a | 15.23 ± 10.29 ^b | 17.31 ± 11.5 ^c |

Nota: Los valores representados en letras son significativamente diferentes para un P- valor < 0.05

Para corroborar una correcta extracción de miel, confirmar aceptables condiciones ambientales, y asegurar su calidad, el contenido de agua según el “Codex Alimentarius de la miel” producidas en regiones tropicales no debe superar el 20%, ya que la contaminación es directamente proporcional a la humedad presente en las muestras (Da Silva *et al.*, 2016)

En la (Tabla 8) se puede observar que la muestra control se encuentra justamente en 20%, valor que se tomó como aceptable, uno de los factores por el cual pudo tener ese porcentaje pudo haber sido el manejo, almacenamiento y condiciones ambientales previas a la experimentación (Delmoro *et al.*, 2010). A pesar de que no existe información sobre la humedad y la temperatura en la

miel, Souza *et al.*, (2006) deduce que la temperatura afecta a la humedad ya que si se encuentra en altas temperaturas la miel, la humedad puede incrementar o disminuir dependiendo del equipo que se esté ocupando y como se almacena la miel, por lo cual se vería afectado para la distribución y comercio de la miel.

Se aprecia además en la (Tabla 8) que los tratamientos a 45° y 60°C tuvieron una disminución no significativa en el porcentaje de humedad entre 18.77 y 18.53 respectivamente, lo que indica que disminuyó la humedad, tomando en cuenta el tiempo en que se dejó que la miel pase de estado sólido a líquido y la viscosidad que son factores principales con respecto a la temperaturas (Gómez-Díaz *et al.*, 2009).

El 5-hidroximetil-2-furfural según (Kowalski, 2013), varía significativamente cuando se somete a diferentes temperaturas entre 60°C y 90°C y a tiempos distintos que pueden llegar a más de 40h, además que la etapa de almacenamiento influye también en la medición del deterioro de las muestras. El autor sugiere además que el contenido HMF aumenta aceleradamente mientras las temperaturas sean más altas, de manera que existe una relación directa del grado de calor y el envejecimiento de las muestras, con el contenido de HMF.

Las medias con respecto al HMF fueron de 15.12 para 45°C y 9.56 para 60°C como se puede observar en la Tabla 8 poseen un valor aceptable dentro de lo establecido por el Codex Alimentarius, así mismo que debe ser menor a 40mg/kg. Se muestra además un aumento significativo en el contenido de HMF sometido al tratamiento de 45°, mientras que en el tratamiento de 60°C no fue significativo, al contrastar los resultados con trabajos previos, se puede

determinar que la temperatura y el tiempo al que fueron sometidas las muestras es crucial, ya que en el trabajo realizado por (Visquet Fas, 2015) se obtuvieron valores de hasta 500 mg/kg cuando se sometió a la miel a temperaturas de hasta 85° con periodos de hasta 70h. Por lo que se puede determinar que el tratamiento de 60°C no fue significativo debido al corto periodo de tiempo al que fue sometido en comparación con el tratamiento de 45°C, donde las características físicas no se vieron afectadas con los tratamientos realizados por lo cual la temperatura a 45 y 60°C son recomendables para tratar las mieles en caso de que se quiera un estado líquido de la misma miel. Por otro lado, existe posibilidades de el HMF se vuelva toxico siempre y cuando las mieles estén tratadas a temperaturas mayores de 60°C por largos periodos de tiempo.

Se conoce ampliamente que las enzimas como la diastasa y su actividad se ven influenciadas y son generalmente muy sensibles a efectos como el calor y en el caso de las mieles, el envejecimiento. Al ser la diastasa la enzima más estable, es escogida para medir la frescura y el envejecimiento de la miel (Tosi ., 2004)

En la (Tabla 10) se puede notar lo mencionado en previos trabajos, donde todas las muestras empleadas superaron el valor de 8° en la escala de Gothe para el parámetro de actividad diastasa, lo que sugiere que la miel es de alto índice enzimático, y de frescura aceptable. Refiriéndose a los tratamientos, se puede ratificar lo mencionado por (Tosi *et al.*, 2007) & (Visquet Fas, 2015) ya que al aplicar ambos tratamientos térmicos, la actividad enzimática se reduce a la mitad cuando se somete a altas temperaturas, sin embargo se puede acotar que el tiempo al que las muestras se ven sometidas es de suma importancia, ya que a 60°C el tiempo de exposición fue reducido a más de la mitad, lo que resultó en una actividad más reducida en el caso del tratamiento de 45°C, al resultado obtenido se puede agregar también, la relación directamente

proporcional entre el contenido acuoso y la actividad enzimática, donde (Visquet Fas, 2015) evaluó seis mieles provenientes de diferentes fuentes, donde se obtuvieron valores iniciales mayores a 40 en la escala de Gothe para las mieles con altos índices acuosos.

4.3 Determinación de composición química con tratamiento térmico

Para evaluar la variación de la composición química con tratamiento térmico, se tomó en cuenta estudios posteriores como (Chen et al., 2012; Šarić et al., 2012) que han verificado que la miel cuando está expuesta a temperaturas que superan los 55°C, puede cambiar su composición química afectando no tan significativamente a los valores de concentración de polifenoles, flavonoides, peróxido de hidrogeno y glucosa oxidasa como se puede observar en la tabla 9.

Tabla 9.
Composición química con tratamiento térmico

| Composición química | Temperatura | | |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | Control | 45°C | 60°C |
| Contenido total de Polifenoles (mg GAE/100 g de miel) | 79.70 ± 27.72 ^a | 44.77 ± 13.75 ^b | 43.54 ± 12.72 ^c |
| Contenido total de Flavonoides (mg CE /100 g de miel) | M: 2.28 Min:0.15 Max:19.14 | M: 2.88 Min:0.152 Max:58.63 | M: 3.26 Min:0.76 Max:38.96 |
| Peróxido de | 4.34 ± | 4.20 ± | 3.83 ± |

| | | | |
|---|--------------------|--------------------|-------------------|
| hidrogeno H2O2 (mM H2O2) | 1.10 ^a | 0.79 ^b | 0.59 ^c |
| Glucosa oxidasa (mU/ml) | 23.26 ± | 25.75 ± | 23.85 ± |
| | 15.76 ^a | 12.09 ^b | 6.51 ^c |

Nota: Los valores representados son significativamente diferentes para un $P < 0.05$ con la media y desviación estándar excepto flavonoides representados con mediana, mínima y máxima

Entre la composición química se determinó el contenido total de polifenoles. Los resultados muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas de control, 45°C y 60°C, donde en Polifenoles el control de 79.70 mg GAE /100 g de miel es más alto que en las temperaturas de 45°C y 60°C que son 44.77 y 43.54 respectivamente. El contenido de flavonoides no cumplió una distribución normal estadísticamente, por lo cual los resultados se representaron por mediana, mínimo y máximo siendo las temperaturas de 45°C y 60°C que incrementan con la mediana de 2.88 y 3.26 mg de CE/ 100 g de miel de acuerdo al control que se obtuvo un valor de la mediana de 2.28 mg de CE/ 100 g de miel acuerdo a las otras temperaturas. Los resultados obtenidos son consistentes con el estudio reportado por (Pontis *et al.*, 2014) que obtuvieron valores similares con respecto a fenoles totales que fueron entre 50.23 mg GAE/ 100 g de miel, a pesar de sometieron a la miel a calor por más tiempo determinaron que las temperaturas entre 45°C y 70°C no afecta a la composición química ni a los compuestos químicos, siempre y cuando la miel sea sometida a calor durante un periodo máximo de 150 horas. Por lo tanto, como Shencke *et al* (2016, pp.385-395) menciona, que estos compuestos son los responsables en el poder antioxidante y mientras más valores mayores tenga, debe tener mayor poder antioxidante la miel.

Los resultados obtenidos en el estudio se encuentran dentro del rango de la norma de calidad, deduciendo que la temperatura no afecta significativamente la composición de la miel. Por otro lado, (T. M. S. Silva *et al.*, 2013) determinó

que la temperatura disminuye la concentración de polifenoles debido al tiempo y por el proceso de obtención y almacenamiento. El tiempo es un factor importante al cual la miel fue sometida por lo cual mientras más tiempo se deja en temperaturas altas existen alteraciones mínimas en los compuestos de la miel. Con respecto al contenido de flavonoides cuando la temperatura incrementa los valores aumentan, a pesar de que los valores obtenidos se encuentran dentro de las normas de calidad como se puede observar en la tabla 9. Esto concuerda con (Šarić et al., 2012) y sus colaboradores, que al someter la miel a temperaturas altas comienza a incrementar los flavonoides, siendo importante el tiempo en el cual se dejó la miel a una cierta temperatura. Es importante también el equipo en el que someten a la miel a la temperatura, por ejemplo el microondas hace que la miel se sobrecaliente en segundos lo cual hace que se pierda la calidad por completo a diferencia de la miel sometida a calor por baño maría (Kowalski, 2013). Por ello, Ngoi *et al.*, (2016) determinaron que al dejar la miel en baño maría por más de 100 horas a 55°C incrementa exponencialmente los valores de flavonoides, siendo el baño maría un equipo no tan invasivo como es la estufa o microondas.

El contenido de peróxido de hidrogeno determina la capacidad antimicrobiana que posee una muestra de miel, sin embargo, se ve afectada por varios factores, como: el origen floral, la salud de las abejas productoras, la temperatura así como las enzimas como la catalasa, misma que se origina del polen floral y posee la capacidad para hidrolizar al H_2O_2 , derivándolo en; agua y oxígeno, y causando además una auto oxidación en polifenoles que inactivan al peróxido (Al-Ghamdi *et al.*, 2017)

En trabajos previos, se ha mencionado ampliamente el factor de origen floral como factor mayoritario en la actividad y cantidad de H_2O_2 , aunque no se desprecia a la temperatura como un factor influyente en la cantidad de H_2O_2 , (Chen, Campbell, Blair, & Carter, 2012) en su experimentación, recomiendan

reducir la temperatura de mieles comercializadas, para evitar pérdida en niveles de H₂O₂, resultado soportado con lo obtenido, donde en la (Tabla 9) se puede evidenciar la pérdida en la cantidad de peróxido de hidrogeno al ser tratada a 45° y 60°, así como también cabe recalcar al tiempo como factor influyente en la cantidad de peróxido perdido, ya que en el tratamiento 60°, el tiempo de exposición fue acortado de 3 horas mientras que a la mitad en comparación con el tratamiento de 45°C tubo una media de , y a pesar del corto tiempo, se logró una pérdida del 11,75% en 3h, lo que lleva a pensar que temperaturas altas de pasteurización para el tratamiento de mieles comerciales o de uso médico, incluso a cortos periodos de tiempo, pueden traer consigo grandes pérdidas en la cantidad total de peróxido de hidrogeno (Mandal & Mandal, 2011).

Cabe recalcar que para determinar la actividad anti microbiana de la miel se comprueba principalmente el efecto y la presencia de enzimas que posee el compuesto de peróxido de hidrógeno, principalmente se determina la actividad de la glucosa oxidasa, misma que viene de las abejas y es responsable de la formación del ácido orgánico más abundante en la miel, el ácido glucónico. (Gutierrez, 2016). Además que experimentos previos sugieren que el aumento en la temperatura logra disminuir la cantidad y presencia de la enzimas en general según (Sandholm *et al*, 1988)

En la tabla 9 se puede ver un incremento significativo para el tratamiento de 45°, a esto se puede argumentar que el tiempo de exposición a la temperatura mencionada fue de alrededor de 23 h, más del doble del tiempo al que fueron expuestas las muestras en el tratamiento e 60°C. Cabe recalcar que los tratamientos dados a las muestras mostraron una diferencia significativa, lo que sugiere que la actividad de glucosa oxidasa se ve afectado cuando se somete a temperaturas más altas, y su a su vez la actividad antimicrobiana disminuye.

4.4 Determinación de la capacidad antioxidante con tratamiento térmico

Se conoce que los compuestos fenólicos son uno de los principales responsables de la actividad antioxidante de la miel, por lo cual estos compuestos han presentado efectos preventivos contra ciertas enfermedades tales como cáncer, desordenes inflamatorios o cardiovasculares y envejecimiento (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

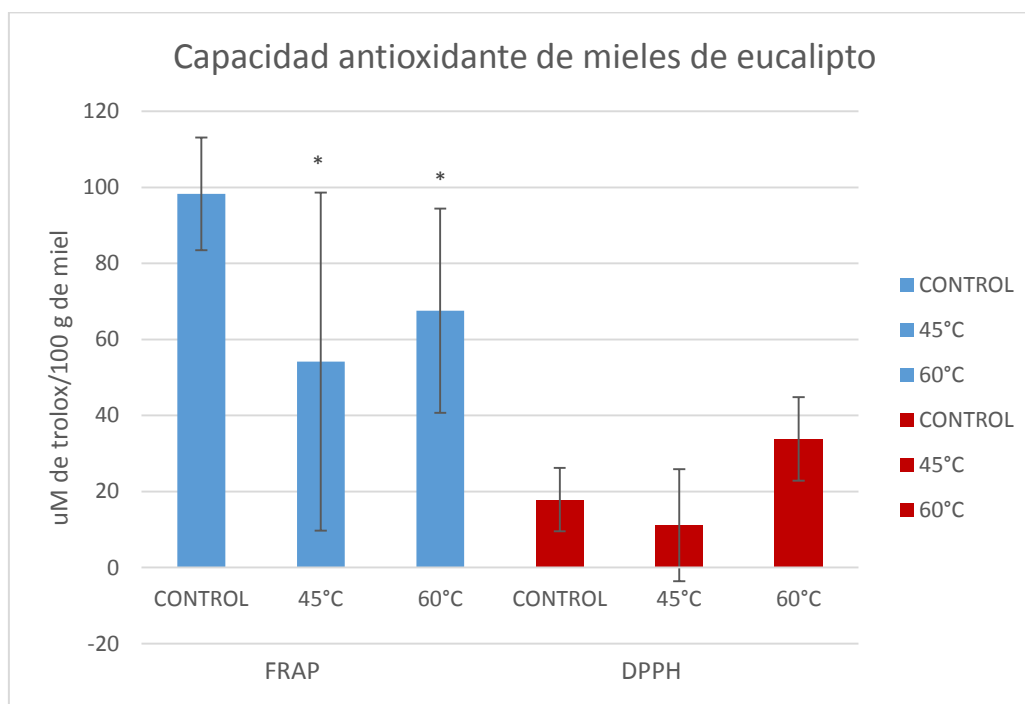


Figura 7. Capacidad antioxidante con tratamiento térmico en mieles de eucalipto

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar, en donde * p-valor es <0,05.

Previa experimentación aportada por (Khalil *et al.*, 2012), indicaron que los componentes fenólicos presentes en la miel, son los actores principales encargados de bloquear las alteraciones negativas producidas en el genoma de las células, mismas que son producidas por los radicales libres, es decir, que estos componentes naturales son responsables de la actividad antioxidante capaz de minorar y combatir el riesgo de enfermedades ligadas con Alzheimer, cáncer, el envejecimiento, desordenes cardiovasculares, etc.

Se conoce que la temperatura tiene un efecto adverso en la actividad antioxidante y contenido de otros componentes como: los fenoles, taninos y

flavonoides. Lo cual dos tratamientos a 45 y 60°C a través de nuestros métodos muestran que los valores se encuentran dentro del rango establecido por el Codex Alimentarius siendo las temperaturas de 45°C y 60°C ideales para el calentamiento de la miel (Codex Alimentarius Commission FAO/OMS, 2001) Como se puede observar en la (figura 7) las barras azules muestran el efecto significativo de la miel de eucalipto para lograr reducir el ion férrico (Fe^{+3}) al ferroso (Fe^{+2}) a ambas temperaturas. Por lo cual, la actividad antioxidante disminuye por las reacciones de sus radicales libres con respecto a la temperatura (Yamaguchi, y otros, 2001). Sin embargo (Oliveira, Amaro, Pinho, & Ferreira, 2010) mencionan que las antocianinas al verse afectadas por altas temperaturas, derivan de si compuestos que exhiben propiedades antioxidantes, además que esta puede estar afectada por la temperatura de almacenamiento, la cual se da después del tratamiento de temperatura mencionado, aunque también se puede rescatar que la temperatura de almacenamiento o congelamiento, preserva la actividad antioxidante de la miel de eucalipto. (Howard *et al.*, 2010)

Las barras de color rojo muestran la capacidad de los componentes en la miel para atrapar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), en la cual puede verse una disminución no significativa cuando se trata la muestra a 45°C siendo una temperatura que se encuentra cerca de la temperatura ambiente y un aumento de la actividad a los 60° mayor al control, lo que indicada que los compuestos antioxidantes presentes en la muestra desprendieron componentes poseedores de actividad antioxidante, y de esta manera puede contrastarse con lo indicado por (Howard, Castrodale , Brownmiller, & Mauromoustakos, 2010) . Por otro lado, el tiempo en el que las muestras de miel se mantuvieron en baño María pueden interferir en los datos ya que cada muestra en 45°C se retiró hasta que llegue al estado líquido, mientras que las de 60°C al paso de 3 horas todas llegaron a estado líquido. Esto muestra que los radicales libres al estar presentes a calor, pueden incrementar o disminuir componentes, a pesar de que se encuentre los valores dentro del rango

establecido, es necesario someter a la miel a temperaturas mayores a 45°C en baño María por un determinado tiempo entre (10-25 h) según afirma (Brand-Willian *et al.*, 1995)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El presente estudio permitió afirmar que existe una estrecha relación entre los parámetros físico-químicos y la temperatura donde la temperatura afecta en pequeña escala sobre los parámetros físico-químicos.

El estudio estableció que existe una relación entre los compuestos químicos vs capacidad antioxidante con respecto a la temperatura donde la temperatura afecta en menor cantidad a los distintos compuestos químicos y capacidad antioxidante.

Se pudo verificar que las mieles de eucalipto producidas en Ecuador cumplen con los parámetros de calidad a pesar de que fueron tratadas a temperaturas de 45°C y 60°C, siendo el mejor esquema de tratamiento térmico en las mieles de eucalipto.

La temperatura en la miel puede llegar afectar drásticamente siempre y cuando sea a temperaturas mayores de las establecidas en la investigación.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar un estudio más amplio, de diferentes tipos de miel y sus tratamientos térmicos, al igual que realizar el respectivo análisis de composición química y poder antioxidante para determinar en que se ve afectada la miel en condiciones de temperaturas mayores a 65°C.

Así mismo, se recomienda realizar pruebas de tratamientos térmicos en diferentes equipos con el fin de brindar a la comunidad información que ayude en casa y para investigación sobre en cuanto tiempo o cual es el equipo ideal para someter la miel a temperaturas altas sin que pierda sus propiedades físico-químicas y biológicas.

REFERENCIAS

- Al-Ghamdi, A., Mohammed, S. E. A., Ansari, M. J., & Adgaba, N. (2017). Comparison of physicochemical properties and effects of heating regimes on stored *Apis mellifera* and *Apis florea* honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Recuperado el 28 de septiembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.002>
- Allothman, M., Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. Recuperado el 28 de septiembre del 2019 de :<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
- Alvarez-Suarez, J., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*. Recuperado el 3 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.3390/foods3030420>
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23. Recuperado del 6 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- Ball, D. W. (2007). The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*. Recuperado el 23 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1021/ed084p1643>
- Bell-Wilson, J. A. (2007). Food Function Junction. *IDEA Fitness Journal*. Recuperado el 18 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.1039/c5fo00270b>.Please
- Bentabol Manzanares, A., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2011). Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*. Recuperado el 14 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.003>
- Benzie, I., & Strain, J. (1999). Ferric reducing (antioxidant) power as a measure

- of antioxidant capacity: the FRAP assay. *Methods Enzymol*, 299, 15–36.
- Beye, M., Moritz, R. E. A., & Epplen, C. (1994). *Apis mellifera. Naturwissenschaften*.
- Bhat, T. K., Kannan, A., Singh, B., & Sharma, O. P. (2013). *Value Addition of Feed and Fodder by Alleviating the Antinutritional Effects of Tannins*. 2(September), 189–206. Recuperado el 13 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0066-6>
- Bogdanov, S. (2014). Honey Composition. In *The Honey Book*. Recuperado el 15 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., & Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: Environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269–275. Recuperado el 19 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101407>
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615. Recuperado el 6 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0240>
- Boussaid, A., Chouaibi, M., Rezig, L., Hellal, R., Donsi, F., Ferrari, G., & Hamdi, S. (2018). Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arabian Journal of Chemistry*. Recuperado el 15 de enero del 2019: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.011>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. Recuperado el 13 de noviembre del 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cabrera, M., Perez, M., Gallez, L., Andrada, A., & Balbarrey, G. (2017). Color, capacidad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides en mieles de la Región del Chaco Húmedo, Argentina. *Phyton*.
- Chen, C., Campbell, L. T., Blair, S. E., & Carter, D. A. (2012). The effect of

- standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. *Frontiers in Microbiology*, 3(JUL), 1–8. Recuperado el 5 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00265>
- Codex Alimentarius Commission FAO/OMS. (2001). Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods. *Codex Alimentarius Commission FAOOMS*.
- CODEX STAND, 212-1999. (1999). Codex Alimentarius Comission. The Draft Revised Codex Standard for Honey. *Codex Standard for Honey, CX/S 00/3*(Appendix 1), 1–34.
- Cooper, R. A., Molan, P. C., & Harding, K. G. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*. Recuperado el 19 de enero del 2019 de: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01761.x>
- Córdova-Córdova, C., Ramirez-Arriaga, E., Martínez-Hernández, E., Zaldívar-Cruz, J., Córdova Córdova, C., Ramírez Arriaga, E., ... Zaldívar Cruz, J. (2013). Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera* L.) de cuatro regiones del estado de Tabasco, México, mediante técnicas melisopolinológicas. *Universidad y Ciencia*. Recuperado el 12 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.19136/era.a29n2.51>
- Da Rosa, G. (1973). Color and electrical conductivity of honeys produced by *Apis mellifera* in Uruguay Color y conductividad eléctrica de las mieles producidas por *Apis mellifera* en Uruguay. *Laboratorio Tecnológico Del Uruguay*.
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*. Recuperado el 3 de septiembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dag, A., Afik, O., Yeselson, Y., Schaffer, A., & Shafir, S. (2006). Physical, chemical and palynological characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) honey in Israel. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(4), 387–394.

- Dalmon, A., Peruzzi, M., Le Conte, Y., Alaux, C., & Pioz, M. (2019). Temperature-driven changes in viral loads in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 160(November 2018), 87–94. Recuperado el 3 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.12.005>
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., & Pranzetti, V. (2010). EL COLOR EN LOS ALIMENTOS: *Invenio*, 13(25), 145–152.
- Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4303–4309. Recuperado el 9 de septiembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
- Eckhard, U., Schönauer, E., Nüss, D., & Brandstetter, H. (2010). Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nature Structural and Molecular Biology*. Recuperado el 17 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2127>
- El Sohaimy, S. A., Masry, S. H. D., & Shehata, M. G. (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Sciences*. Recuperado el 15 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.015>
- Elekonich, M. M., & Roberts, S. P. (2005). Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. Recuperado el 3 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.04.014>
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: A novel antioxidant. *Molecules*.
- Espinoza Toledo, C., Vázquez Ovando, A., Torres de los Santos, R., López García, A., Albores Flores, V., & Grajales-Conesa, J. (2018). Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. *Revista de Biología Tropical*. Recuperado el 2 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32181>
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., & Estevinho, L. M. (2009).

- Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. Recuperado el 9 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.028>
- Flores, G., Salinas, Y., Espinoza, B., & Feria, C. (2008). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(2), 121–129.
- Flores, M. S. R., Escuredo Pérez, O., & Coello, M. C. S. (2014). Characterization of eucalyptus globulus honeys produced in the eurosiberian area of the Iberian Peninsula. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2177–2191. Recuperado el 15 de enero del 2019 de: <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.790050>
- García-Tenesaca, M., Navarrete, E. S., Iturralde, G. A., Villacrés Granda, I. M., Tejera, E., Beltrán-Ayala, P., ... Alvarez-Suarez, J. M. (2018). 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). Recuperado el 23 de julio del 2019 de: <https://doi.org/10.3390/ijms19010045>
- Geldmann, J., & González-Varo, J. P. (2018). Conserving honey bees does not help wildlife. *Science*, 359(6374), 392–393. Recuperado el 4 de julio del 2019 de: <https://doi.org/10.1126/science.aar2269>
- Gethin, G. T., Cowman, S., & Conroy, R. M. (2008). The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International Wound Journal*. Recuperado el 3 de agosto del 2019 de: <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00424.x>
- Gómez-Díaz, D., Navaza, J. M., & Quintáns-Riveiro, L. C. (2009). Effect of temperature on the viscosity of honey. *International Journal of Food Properties*. Recuperado el 5 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1080/10942910701813925>
- Greenleaf, S. S., & Kremen, C. (2006). Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America.

- Gualotuña Guachamín, S. E. (2015). Estudio comercial nacional e internacional de miel en panal. *Yura Relaciones Internacionales*.
- Guo, W., Liu, Y., Zhu, X., & Wang, S. (2011). Temperature-dependent dielectric properties of honey associated with dielectric heating. *Journal of Food Engineering*. Recuperado el 1 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.016>
- Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Dosekocil, I., Tyl, J., Kamler, M., ... Rada, V. (2015). Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–17. Recuperado del 4 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707>
- Ismail, W. I. W. (2016). A review on beekeeping in Malaysia: History, importance and future directions. *Journal of Sustainability Science and Management*.
- Jones, J. C., Myerscough, M. R., Graham, S., & Oldroyd, B. P. (2004). Honey bee nest thermoregulation: Diversity promotes stability. *Science*. Recuperado el 3 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1126/science.1096340>
- Juszczak, L., Gałkowska, D., Ostrowska, M., & Socha, R. (2016). Antioxidant activity of honey supplemented with bee products. *Natural Product Research*, *30*(12), 1436–1439. Recuperado el 6 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1057582>
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., ... Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. *Molecules*. Recuperado el 1 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.3390/molecules170911199>
- Kowalski, S. (2013). Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. *Food Chemistry*, *141*(2), 1378–1382. Recuperado el 6 de agosto del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.025>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey.

IUBMB Life.

- Labropoulos, A., & Anestis, S. (2012). Honey. In *Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*. Recuperado el 2 de agosto del 2019 de: <https://doi.org/10.1201/b12065>
- Li, D., Wang, M., Cheng, N., Xue, X., Wu, L., & Cao, W. (2017). A modified FOX-1 method for Micro-determination of hydrogen peroxide in honey samples. *Food Chemistry*, 237, 225–231. Recuperado el 20 de enero del 2020 de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.065>
- Londoño, J., & De, P. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad Serie Lasallista Investigación y Ciencia*.
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Recuperado el 15 de enero del 2020 de: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2013). Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Recuperado el 15 de agosto del 2019 de: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-43>
- Ngoi, V., Ibrahim, N., Mohd Niza, N. F. S., Mohd Rodi, M. M., Zakaria, A. J., Ismail, Z., & Mohd, K. S. (2016). Effect of Processing Treatment on Antioxidant, Physicochemical and Enzymatic Properties of Honey (*Trigona* spp). *Malaysian Journal of Analytical Science*.
- Nordin, A., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Saim, A. Bin, & Idrus, R. B. H. (2018). Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*. Recuperado el 3 de agosto del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>
- Ordóñez, M., Beatriz, Y., Gonzalez, E., & Escobedo, M. (2005). Physicochemical quality of honey from honeybees *Apis mellifera* produced in the State of Yucatan during different stages of the

- production process and blossoms. *Técnica Pecuaria En México*.
- Pesantez, R. (2000). La calidad. *Rev. Colomb. Ortop. Traumatol*.
- Pontis, J. A., da Costa, L. A. M. A., da Silva, S. J. R., & Flach, A. (2014). Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Science and Technology*. Recuperado el 13 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000015>
- Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Dean, R., Marris, G., Brown, M. A., Jones, R., ... Settele, J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*. Recuperado el 9 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>
- Pozo K., J., Manquian T., N., Neira C., M., & Mansilla T., R. (2004). Evaluación de un método de análisis de residuos de sulfamidas, en miel, por cromatografía líquida de alto rendimiento. *Agro Sur*. Recuperado el 28 de octubre del 2019 de: <https://doi.org/10.4206/agrosur.2004.v32n2-10>
- Rescan. (2007). *Bathurst Inlet Port and Road Project: Draft Environmental Impact Statement. Volume 5B, Appendix D-4. Surficial Geology, Soils, and Ecosystem Mapping*. 2502–2506.
- Rodríguez-Zevallos, A., Hayayumi-Valdivia, M., & Siche, R. (2018). Optimización de polifenoles y aceptabilidad de caramelos de goma con extracto de jengibre (*Zingiber officinale* R.) y miel con diseño de mezclas. *Brazilian Journal of Food Technology*. Recuperado el 14 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.13217>
- Sandholm, M., Ali-Vehmas, T., Kaartinen, L., & Junnila, M. (1988). Glucose Oxidase (GOD) as a Source of Hydrogen Peroxide for the Lactoperoxidase (LPO) System in Milk: Antibacterial Effect of the GOD-LPO System against Mastitis Pathogens. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. Recuperado el 3 de septiembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00506.x>
- Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2017). Chemical composition of honey. In *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Recuperado el 9 de enero del 2020 de: <https://doi.org/10.1007/978-3->

319-59689-1_3

- Šarić, G., Marković, K., Major, N., Krpan, M., Uršulin-Trstenjak, N., Hruškar, M., & Vahčić, N. (2012). Changes of antioxidant activity and phenolic content in acacia and multifloral honey during storage. *Food Technology and Biotechnology*.
- Silva, T. M. S., dos Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., da Silva, E. M. S., da Silva, G. S., de Novais, J. S., ... Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*. Recuperado el 15 de agosto del 2019 de : <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.08.010>
- Solis-Silva, R., Hernández-Fuentes, A. D., Jimenez-Alvarado, R., Aguirre-Alvarez, G., Barrera-Jiménez, J. A., & Campos-Montiel, R. G. (2018). Efecto del tratamiento térmico en la cristalización, actividad antioxidante e hidroximetilfurfural de una miel multifloral recién colectada. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., ... Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia*.
- Terrab, A., & Heredia, F. J. (2004). Characterisation of avocado (*Persea americana* Mill) honeys by their physicochemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Recuperado el 23 de noviembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1888>
- Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H., & Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *LWT - Food Science and Technology*. Recuperado el 3 de diciembre del 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.005>
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95(4), 653–657. Recuperado el 5 de noviembre del 2019

de: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.004>

Ulloa, A., Mondragón Cortez, P. M., Rogelio, Q. F. B., Rodríguez, R., Juan, Q. F. B., Reséndiz Vázquez, A., ... Ulloa, R. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Fuente*. Recuperado el 2 de agosto del 2019 de: https://doi.org/10.1007/978-3-642-35125-9_6

