



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, DETERMINACIÓN DE LA  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CAPACIDAD ANTIMICROBIANA  
DE LA MIEL MONOFLORAL DE NABO

Autora

Eileen Sofía Navarrete Pallo

Año  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, DETERMINACIÓN DE LA  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LA MIEL  
MONOFLORAL DE NABO

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 Alvarez Suarez

Autora

Eileen Sofía Navarrete Pallo

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Caracterización físico-química, Determinación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la miel monofloral de Nabo, a través de reuniones periódicas con el estudiante Eileen Sofía Navarrete Pallo, en el semestre 2018-1, 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 Alvarez Suarez  
Doctor en Alimentación y Salud  
CC: 1756653372

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Caracterización físico-química, Determinación de la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la miel monofloral de Nabo, de Eileen Sofía Navarrete Pallo, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Eduardo Tejera Puente

Doctor en Ciencias Farmacéuticas especialidad bioquímica.

CC: 1756501977

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi (nuestra) 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.”

---

Eileen Sofía Navarrete Pallo

CC: 0104172457

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al PhD. José Miguel Alvarez ya que sin su apoyo este proyecto no podría haber sido posible. Por su paciencia, sus enseñanzas impartidas durante y después de la realización de este proyecto. A mis amigas y hermanas Adriana, Lisseth y Patricia quienes han sido mi apoyo moral incondicional. A mis compañeros Daniela, Karina y Lizhet por su gran amistad y apoyo en clases y en el laboratorio.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres Darwin y Alicia quienes con mucho esfuerzo y sacrificio han logrado brindarme la oportunidad de estudiar y que, junto a mi hermano Andrés y mi esposo Yandry han sido mi mayor soporte y mi guía durante estos años de carrera. Juntos hemos logrado superar la distancia y hemos cumplido con los objetivos planteados con mucho amor y perseverancia. Los Amo.

## ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	4
1.3. Objetivo General.....	5
1.4. Objetivos específicos .....	5
1.5. Justificación del trabajo .....	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 Generalidades miel de abeja .....	7
2.1.2 Origen Polínico .....	8
2.3.4. Proteínas y aminoácidos.....	12
2.3.5. Vitaminas y minerales.....	12
2.3.6. Compuestos fenólicos.....	13
2.3.7. Carotenoides .....	14
2.4. Propiedades físico-químicas .....	15
2.4.1. Color .....	15
2.5 Propiedades Biológicas .....	18
2.5.1 Capacidad antimicrobiana .....	18
2.5.2 Capacidad antioxidante .....	19
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	23
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS .....	24
4.1. Población.....	24
4.2. Muestras.....	24
4.3. Extracción de polen .....	24
4.4. Caracterización física-química .....	25
4.4.1 Color .....	25
4.4.2 Humedad .....	26
4.4.3 pH.....	28



4.4.4 Cenizas.....	28
4.4.5 Conductividad Eléctrica .....	28
4.4.6 Hidroximetilfurfural (HFM) .....	29
4.4.7 Índice de Diastasa .....	30
4.4.8 Aminoácidos libres.....	30
4.4.9 Flavonoides .....	31
4.4.10 Extracto polifenólico.....	32
4.4.11 Fenoles totales .....	32
4.4.12 Polifenoles totales mediante HPLC.....	33
4.4.13 $\beta$ -Carotenos .....	33
4.5. Capacidad Antioxidante .....	34
4.5.1 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) .....	34
4.5.2 FRAP ( <i>Ferric reducing/antioxidant power</i> ) .....	34
4.5.4 Capacidad antimicrobiana.....	37
4.5.4.1 Determinación de contenido de Peróxido de Hidrogeno ..	37
4.5.4.2 Inhibición de la miel en la formación de biofilm y eliminar la biopelícula preformada.....	37
4.6 Análisis estadístico de resultados.....	38
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
5.1. Análisis polínico .....	38
5.2. Caracterización físico-química .....	40
5.3. Compuestos Bioactivos .....	43
5.3.1 Determinación de compuestos polifenólicos por HPLC.....	44
5.4. Capacidad Antioxidante .....	46
5.4.1 Método de FRAP y DPPH.....	46
5.4.2 Peroxidación Lipídica.....	47
5.5 Capacidad Antimicrobiana.....	49
5.5.1 Determinación de contenido de	

peróxido de hidrogeno en miel.....	49
5.5.2 Inhibición de la miel en la formación de biopelícula y eliminación de la biopelícula preformada. ....	50
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>53</b>
6.1 Conclusiones .....	53
6.2 Recomendaciones .....	53
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

Se analizó la miel de nabo para determinar su origen floral, composición química, parámetros físico-químicos, capacidad antioxidante y su capacidad para inhibir la formación *in vitro* de biopelículas bacterianas por *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización físico-química, la miel de nabo mostró valores dentro del rango establecido por la Comisión Internacional de Miel para mieles tropicales. El contenido de compuestos bioactivos como flavonoides, carotenoides, aminoácidos libres y polifenoles totales se encontraba dentro de los valores previamente reportados por otros autores para la miel de nabo de otras regiones geográficas. La miel de nabo también fue capaz de proteger las membranas celulares contra el daño oxidativo inducido, demostrando su potencial como agente antioxidante. Se encontró una correlación positiva entre el color, la composición química y la capacidad antioxidante. Esto nos permite corroborar la hipótesis planteada por otros investigadores que han propuesto una correlación positiva entre la composición química y las propiedades biológicas en la miel. La miel de nabo también mostró valores importantes de contenido de peróxido de hidrógeno, y fue capaz de reducir las biopelículas bacterianas *in vitro*. En conclusión, la miel de nabo cumple con los estándares internacionales de calidad requeridos para las mieles de la especie de abeja *Apis mellifera* y representa una importante fuente natural de compuestos bioactivos con importantes efectos beneficiosos para la salud.

## ABSTRACT

The turnip honey was analyzed to determine its floral origin, chemical composition, physical-chemical parameters, antioxidant capacity and its ability to inhibit the *in vitro* formation of bacterial biofilms by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. According to the obtained results, the turnip honey showed values within the range established by the International Honey Commission for tropical honeys for the physico-chemical parameters. The content of bioactive compounds such as flavonoids, carotenoids, free amino acids and total polyphenols was within the values previously reported by other authors for turnip honey from other geographical regions. Turnip honey was also able to protect cell membranes against induced oxidative damage, demonstrating its potential as an antioxidant agent. A positive correlation was found between color, chemical composition and antioxidant capacity. This allows us to corroborate the hypothesis posed by other researchers who have proposed a positive correlation between chemical composition and biological properties in honey. Turnip honey also showed significant values of hydrogen peroxide content and was able to reduce bacterial biofilms *in vitro*. In conclusion, turnip honey complies with the international quality standards required for honeys of the bee species *Apis mellifera* and represents an important natural source of bioactive compounds with important beneficial effects for health.

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La miel es conocida como el principal producto de las abejas. A través de los años la miel de abeja se ha convertido en un producto de alto valor nutricional con gran importancia a nivel nacional e internacional. Desde la antigüedad se ha utilizado como fuente de alimento y como edulcorante para bebidas alcohólicas y no alcohólicas, lo cual impulsó que las abejas sean domesticadas con fines productivos, actividad que en la actualidad se conoce como apicultura (Rivadeneira, 2016,pp. 1-6).

La miel de abeja se define como un fluido viscoso y dulce, sintetizado por las abejas a través de su actividad polinizadora. En este proceso las abejas consumen el néctar de flores, las secreciones de partes vivas de las especies vegetales o de excreciones de insectos succionadores de plantas que se encuentran sobre ellas. Luego del consumo, se produce un primer proceso de transformación en el aparato digestivo de las abejas, combinándose con sustancias específicas como las enzimas. Luego de la transformación, el producto final es llevado a la colmena para ser almacenado y seguir con el proceso de maduración (Rivadeneira, 2016,pp. 1-6).

La miel se clasifica según su procedencia en: (i) miel de flores (néctar de flor) y (ii) mielada (obtenida primordialmente de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas). Dentro de la clasificación floral existe una subclasificación que está constituida por: mieles multiflorales, que contienen polen de diversas floraciones; y mieles monoflorales, que poseen el predominio del polen de una sola especie vegetal (Alvarez-Suarez, 2017,pp. 3-17).

Estudios realizados en la miel de abeja han permitido determinar los diversos compuestos que forman parte de ella, así como sus principales parámetros de calidad. Dentro de su composición química se encuentran azúcares, como la fructosa y la glucosa, vitaminas, minerales, compuestos fenólicos, proteínas, aldehídos aromáticos, carotenoides, terpenoides, agua, entre otros compuestos, los cuales en conjunto contribuyen a las propias características físico-químicas y organolépticas de la miel (Alvarez-Suarez, 2017, pp. 45-46).

Se ha identificado que la miel contiene propiedades terapéuticas las cuales están muy relacionadas con su origen floral (Gutiérrez, 2016, pp. 3-20). Dentro de estas propiedades se destaca su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos. Esta inhibición es provocada por un proceso de lisis osmótica derivada de factores físico-químicos como son: pH ácido aproximadamente 3.9, baja actividad de agua  $A_w$  (0,56-0,62) y una alta concentración de azúcar (Romero, 2012, pp. 3-15). Para demostrar la actividad antimicrobiana y antifúngica de mieles ecuatorianas Rivadeneira (2016, pp.34-39) realizó pruebas preliminares con extractos de miel monoflorales de Nabo, Ñachag y flores tropicales del Ecuador, dando como resultado un efecto de inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida tropicalis*, lo que demuestra el potencial de las mieles ecuatorianas para este tipo de tratamiento.

Otra de las propiedades que se destaca en la miel de abeja es su capacidad para impedir el daño oxidativo provocado por la acción de los radicales libres. Los radicales libres son moléculas inestables que poseen un electrón desapareado, capaces de interactuar con diferentes biomoléculas, provocando una reacción en cadena y un desequilibrio en el organismo (Alvarez-Suarez, 2017, pp. 86-89). Este tipo de daño a las macromoléculas, conocido como estrés oxidativo, genera trastornos fisiológicos y procesos patológicos como la disfunción de tejidos, la aparición de mutaciones y retraso en procesos

fisiológicos como la cicatrización de heridas (Gutiérrez, Rodríguez-Malavaer & Vit, 2008,pp.39-43).

Diversas investigaciones en la miel de abeja han reportado la capacidad que esta posee para proteger ante el daño oxidativo a través de su capacidad para impedir la oxidación de lípidos, la estimulación de la cicatrización y su capacidad antiinflamatoria (Alvarez-Suarez, 2017,pp. 86-89). Esta capacidad antioxidante ha sido estrechamente relacionada a su composición química, principalmente debido a la presencia de compuestos bioactivos derivados de las plantas como son: flavonoides, polifenoles, vitamina C y carotenoides, los cuales son ampliamente conocidos por su elevada actividad antioxidante (Vit, Gutiérrez, Titera, Bednar, & Rodríguez-Malaver, 2008,pp. 237-243). Este contenido de compuestos bioactivos, y por ende la actividad antioxidante, han sido estrechamente relacionados con el origen floral de las mieles. Es así, que estudios realizados en mieles monoflorales de Ulmo y Quillay, demostraron una correlación positiva entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante. Similares resultados los obtuvo Alvarez-Suarez, González Paramás, Santos-Buelga, & Battino (2010,pp. 9817-9824) en cinco tipos de mieles monofloral de Cuba, donde pudo constatar que las mieles con mayor contenido de polifenoles totales presentaron una mayor capacidad antioxidante total. Si bien estas diferencias fueron atribuidas a su origen floral, se tienen que tomar en cuenta otros factores tales como ambientales (localidad y temporada de producción), la madurez al momento de la cosecha y el origen floral de cada una de las muestras analizadas (Montenegro, Santander, Jara, Nuñez, & Fredes, 2013,pp. 257-265).

Ecuador es uno de los países más megadiversos del mundo con una riqueza floral que abarca todo el territorio nacional. La producción de miel en el país se distribuye fundamentalmente en la sierra y en la costa, con el predominio de especies vegetales con importantes capacidades melíferas como el Aguacate,

Eucaliptus, Nabo y Ñachag (Cabrera, 2012,pp. 1-5). La bibliografía en general reporta un alto número de estudios de mieles procedentes de diferentes regiones geográficas, sin embargo, los reportes de estudios relacionados con la identificación floral, los parámetros físico-químicos y las propiedades biológicas de las mieles de abeja de Ecuador son escasas. Esta situación justifica el planteamiento del presente estudio, el cual propone la determinación del origen floral, una caracterización físico-químico, la determinación de la capacidad antimicrobiana y capacidad antioxidante de la miel monofloral de Nabo producida en Ecuador.

## **1.2. Planteamiento del problema**

Actualmente en el Ecuador la producción de miel pura es significativamente menor al verdadero potencial del país. Según el Programa Nacional Apícola de Salud de la Agencia Ecuatoriana Agrícola de Garantía de Calidad (AGROCALIDAD), el Ecuador podría ser uno de los principales productores de miel a nivel de América del Sur por el potencial melífero del país, ya que cuenta con un mosaico de floraciones específicas distribuidas de manera escalonada durante todo el año, localizadas en las diferentes zonas geográficas del país (Rivadeneira, 2016,pp. 1-5). Se estima que en el Ecuador existen aproximadamente 200 mil colmenas y la producción de miel anual es de alrededor de 100 a 800 toneladas, esta producción alcanza únicamente para abastecer el consumo interno del país, sin obtener producción para la exportación (Cabrera, 2012,pp. 1-5). Entre los principales factores que han favorecido esta situación se encuentran los bajos incentivos a este tipo de producción, el desconocimiento de las buenas prácticas de producción apícola, así como un divorcio entre producción y las entidades del estado encargadas de apoyar este tipo de producción (Cabrera, 2012,pp. 1-10). Esta situación ha impulsado la aparición de la práctica cotidiana de adulterar la miel con el objetivo de aumentar el volumen de entrega a los sistemas de distribución nacional. Esta situación se ha vuelto una práctica común en el país lo que ha



influido negativamente en la calidad del producto y obviamente en sus propiedades biológicas (Cabrera, 2012, pp. 1-5).

Los principales criterios de calidad físico-química de la miel son el contenido de humedad, conductividad eléctrica, contenido de cenizas, azúcares reductores y no reductores, acidez libre, actividad de la diastasa e hidroximetilfurfural (HMF). Todos estos análisis se encuentran especificados por la Directiva 2001/110 del Consejo de la Unión Europea (UE, 2001) y la Comisión Internacional de la miel (International Honey Commission, 2002). Sin embargo, es responsabilidad de los organismos de control de cada país llevar a cabo las inspecciones de calidad. En el caso de nuestro país aún no son empleadas ni exigidas.

Adicionalmente, no existen estudios que permitan certificar el origen floral de la miel, por lo que es necesario investigar ampliamente este campo ya que resulta primordial para contribuir a los estudios de los parámetros de calidad y propiedad biológicas de la miel producida en el país, por lo que el presente estudio contribuiría en nuevos conocimientos. Por otra parte, debido al aumento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y los fenómenos de antibiorresistencia que se han reportado, resulta indispensable la búsqueda de nuevas alternativas económicas y viables que permitan reemplazar el uso de compuestos sintéticos con fines terapéuticos.

### **1.3. Objetivo General**

Estudiar los parámetros físico-químicos, el contenido de compuestos bioactivos, así como la actividad antioxidante y antimicrobiana de miel monofloral de nabo producida en Ecuador.

### **1.4. Objetivos específicos**

- Analizar el origen floral de la miel a través de un estudio polínico.

- Determinar los parámetros físico-químicos y contenido de compuestos bioactivos en la miel de nabo.
- Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de miel monofloral de nabo en modelos *in vitro*.

### 1.5. Justificación del trabajo

Con este trabajo de investigación se desea certificar el origen floral de la miel de nabo producida en Ecuador, así como establecer sus parámetros de calidad y constatar sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, como una posible alternativa para el tratamiento de infecciones y como fuente natural de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. En primer lugar, la caracterización físico química, permitirá conocer si el producto ha sufrido algún tipo de adulteración durante su extracción, almacenamiento y posterior empaquetamiento para la venta al público. Con los ensayos que se realicen en el laboratorio se podrá determinar los parámetros de calidad de estas y compararlos con los estándares internacionales que deben cumplir las mieles de origen monofloral.

Por otro lado, el estudio de la capacidad antioxidante permitirá conocer la capacidad de este tipo de miel para evitar el daño oxidativo, así como su posible uso como fuente natural de compuestos bioactivos en la dieta. Es importante mencionar que la miel monofloral de Nabo no ha sido caracterizada y se desconoce este tipo de propiedades.

Con los resultados proporcionados por el análisis polínico, se podrá conocer la zona de producción y la época del año en donde se encuentra mayormente

disponible la miel, además de describir el origen floral y cómo esto influye en sus características físico-químicas y sus propiedades biológicas.

Mediante los resultados que se obtengan en este trabajo de investigación, se podrá contribuir en la certificación de la miel y mejorar su calidad, además de conocer todos sus beneficios y sentar las bases para nuevos estudios en el tratamiento de enfermedades crónicas producidas por el estrés oxidativo. Así como su aplicación en la regeneración de tejido afectado por infecciones y quemaduras, justificando el uso de la miel de abeja en la medicina alternativa, en la industria farmacéutica, y cosmética.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Generalidades miel de abeja**

La miel de abeja es una sustancia dulce producida de forma natural por las abejas de la especie *Apis mellifera* o por otro tipo de especie de abejas. Las abejas obreras son las encargadas de producir la miel mediante el consumo del néctar de las flores, secreciones que proceden de las partes vivas de las plantas o de las excreciones que dejan algunos insectos succionadores de plantas. La familia apidae sintetiza la miel por acción de la enzima invertasa, esta enzima se encuentra en la saliva de las abejas; sin embargo, el proceso continúa en el sistema digestivo en donde se combinan con otras sustancias propias del organismo. Una vez concluido este proceso las abejas llevan la miel a los panales para su almacenamiento y maduración (Rivadeneira, 2016, pp. 1-10).

La consistencia del producto mielífero es viscosa y de alta palatabilidad, no debe contener aditivos, sustancias orgánicas e inorgánicas que alteren su composición natural. Es decir, que aquellos productos descritos como miel que contengan alteraciones no pueden ser denominados como tal (Ulloa, Mondragón Cortez, Rodríguez Rodríguez, Résendiz Vásquez, & Rosas Ulloa, 2010,pp. 11-13).



*Figura 1.* Proceso de almacenamiento y maduración de la miel

Tomado de (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Résendiz, & Rosas, 2010, p. 11).

### **2.1.2 Origen Polínico**

El origen polínico de la miel se realiza mediante el estudio del tipo, tamaño y la ornamentación con esporodermo de granos de polen; así, se puede identificar, diferenciar y clasificar las especies vegetales de las que provienen. No obstante, el polen que se encuentra en la miel puede tener diversas procedencias como son: el pelo de las abejas, el polen del aire dentro de la colmena y el polen que las abejas empaquetaron en las células y se liberaron

durante la extracción de miel. Como parte del control de la calidad de miel se determina de forma cualitativa y cuantitativa el origen botánico. Estableciendo la zona geográfica de producción y la vegetación predominante en el área que brinda la coloración, sabor, aroma y textura a la miel (Louveaux J, 1978, pp. 140-155).

## **2.2. Clasificación de la miel**

La miel se clasifica según la principal fuente floral en donde las abejas recolectan el néctar. Dentro de esta clasificación se encuentran las mieles monoflorales, las cuales se describen como mieles que poseen en mayor cantidad el polen de una sola planta; mientras que, las multiflorales se describen que su contenido polínico proviene de varias especies vegetales (Córdova-Córdova, Ramírez-Arriaga, Martíñez-Hernández, & Zaldívar-Cruz, 2013, pp. 164-175). Es muy importante la proporción del polen en la miel, ya que esto se relaciona directamente con el tipo de vegetación y el período de floración que mantienen las plantas. Las abejas generalmente consumen el néctar de un solo tipo de especie vegetal; pero, es muy probable encontrar néctar de otro tipo de vegetaciones. Para poder decir que una miel es monofloral, es necesario realizar un conteo del polen, teniendo en cuenta que el porcentaje mínimo de gránulos debe ser de aproximadamente un 45%, dependiendo de la especie vegetal, ya que este porcentaje puede variar. En cambio, para las multiflorales es necesario que se encuentre el polen de tres o más taxas en un porcentaje mayor o igual al 10% (Córdova-Córdova, Ramírez-Arriaga, Martíñez-Hernández, & Zaldívar-Cruz, 2013, pp. 164-175).

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

La composición química de la miel depende de algunos factores, como la zona geográfica en donde se encuentran distribuido los apiarios, el suelo en donde se desarrollan las especies vegetales que van a hacer polinizadas, así como su cosecha, el clima y las condiciones climáticas. La miel es conocida por contener una mezcla de carbohidratos, ácidos orgánicos, enzimas, aminos, ceras, etc (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 43-45).

### 2.3.1 Carbohidratos

Son el componente principal de la miel, en esta encontramos monosacáridos como son la glucosa y la fructosa. El 85% de la composición sólida de la miel está dada por estos azúcares simples, aunque también lo componen alrededor de 25 azúcares complejos, pero estos se encuentran en cantidades mínimas, ya que la mayoría se forman de la unión de la fructosa y glucosa en diversas combinaciones (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Résendiz, & Rosas, 2010,pp. 11-13).

A continuación, en la Tabla 1 se puede mostrar un listado de carbohidratos presentes en la miel.

Tabla 1.

*Azúcares presentes en la miel de abeja*

<b>Monosacáridos</b>	Fructosa Glucosa
----------------------	---------------------

<b>Disacáridos</b>	Maltosa Isomaltosa Gentibiosa Nigerosa Maltulosa Palatinosa Sacarosa Turalosa
<b>Trisacáridos</b>	Eriosa Centosa Isopanosa Panosa Isomaltotriosa Laminoritriosa Maltoriosa Melezitosa
<b>Azúcares complejos</b>	Isomaltotetraosa Isomaltopentosa

Adaptado de Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Résendiz, & Rosas, 2010,p. 13

### 2.3.2. Agua

El contenido de agua influye mucho en la miel puesto que ayuda a controlar la viscosidad, el peso específico y el color. El contenido de humedad está en función a factores ambientales y el contenido de humedad que comprende el néctar que ha consumido la abeja. La humedad en una miel madura es de

aproximadamente un 18,5%, si este valor es sobrepasado la miel es susceptible a fermentarse (Zandamela Mungói, 2008).

### **2.3.3. Enzimas**

Las enzimas presentes en la miel son adquiridas por las abejas y otras por la planta que polinizan. Una de las enzimas más importantes de la miel es la  $\alpha$ -glucosidasa, ésta se encarga de convertir el disacárido sacarosa en monosacáridos fructosa y glucosa. Otra es la glucosa oxidasa responsable de la capacidad antibacteriana. El ácido fosfatasa se encarga de degradar el almidón y la catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Résendiz, & Rosas, 2010.p. 13).

### **2.3.4. Proteínas y aminoácidos**

De igual manera que las enzimas, las proteínas y aminoácidos son adquiridas por las plantas y las abejas. La cantidad de nitrógeno está asociado a la presencia de proteínas y aminoácidos. Se han perfilado alrededor de 19 proteínas. La presencia de proteínas en la miel genera una baja tensión superficial formando finas burbujas de aire. Por otro lado, la presencia de aminoácidos en la miel no tiene ningún aporte nutricional, a pesar de ello, éstos reaccionan con algunos azúcares produciendo compuestos cafés o amarillentos, los mismos que son los responsables del oscurecimiento de la miel durante el almacenamiento. Algunos de los aminoácidos descritos son: prolina, tirosina, leucina, alanina, isoleucina, fenilalanina y ácido glutámico (Blanco, Trama, & Libonatti, 2016,pp. 6-18).

### **2.3.5. Vitaminas y minerales**



El porcentaje de minerales en la miel es de 0,02%- 1%, en donde el potasio se lleva la mayor cantidad de este porcentaje seguido de sodio, calcio y magnesio y en menor concentración se encuentran el azufre, hierro, cobre, manganeso, cloro y fósforo (Ulloa, et al., 2010, pp. 13).

### **2.3.6. Compuestos fenólicos**

Uno de los metabolitos que se encuentran en mayor concentración en las plantas son los compuestos fenólicos, sintetizados con el fin de brindar protección ante el estrés biótico, abiótico y el daño oxidativo. Estos compuestos los obtiene la miel en el momento que la abeja consume el néctar de las plantas. Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar en su estructura un anillo aromático, un anillo benceno y grupos hidroxilos (Martínez-Valverde, Periago, & Ros, 2000,5-13).

Dentro de los compuestos fenólicos también se encuentran la familia de los flavonoides, éstos comparten un esqueleto de fenilcromano ( $C_6-C_3-C_6$ ). Dependiendo de la oxidación que sufre el anillo C, los flavonoides se pueden clasificar en: flavonoides, flavonoles, flavonas, isoflavonas, antiocianinas, flavononas, dihidroflavonoles y flavan-3-oles. En la miel se han podido identificar flavononas, flavonas, flavonoles y dihidroflavonoles, como son: pinocembrina, crisina, galangina, pinobanksina, apigenina, genisteína, quercetina, kaempferol y miricetina (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp.65-70). Este tipo de compuestos tanto fenólicos como flavonoides se pueden degradar en la miel, dependiendo de las condiciones ambientales a las que están sometidos, un ejemplo son los flavonoides glucósidos que se ven afectados en ambientes alcalinos (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 65-70).

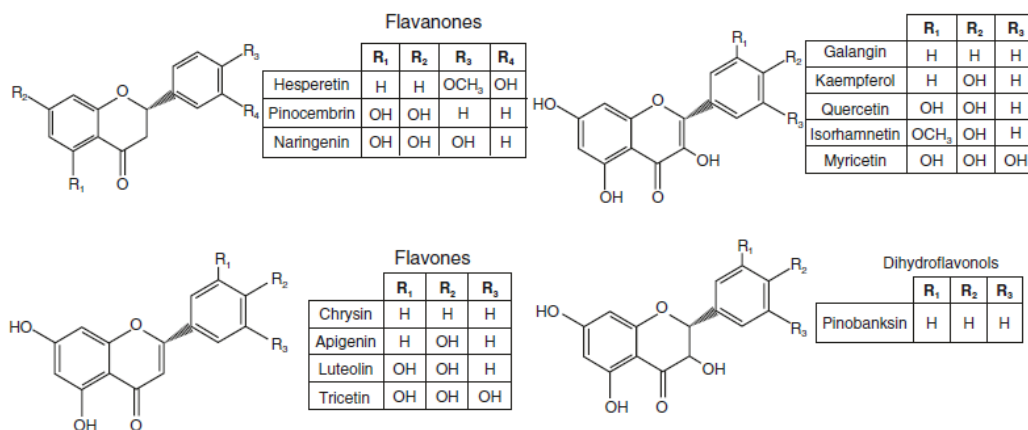


Figura 2. Estructura de los flavonoides descritos en la miel

Tomado de (Alvarez-Suarez J. M., 2017, p. 66).

### 2.3.7. Carotenoides

Este tipo de compuestos son pigmentos conocidos por brindar coloraciones rojizas, amarillas y naranjas en flores y frutos. Los carotenoides están vinculados con la fotosíntesis debido a que se encargan de captar luz. Así también, son compuestos benéficos para la salud humana porque son capaces de inactivar el oxígeno libre, hidroxilos y peróxidos. Esto lo convierte en un antioxidante, además son fuente de provitamina A. Los carotenoides se conforman por un anillo de ciclohexano y por distintas unidades de isoprenoides, además, son tetraterpenos ya que pueden sustituir o insaturar cada extremo del anillo de ciclohexano. Su naturaleza lipofílica lo hace insoluble en agua (Alvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 225-226).

## 2.4. Propiedades físico-químicas

### 2.4.1. Color

El color de la miel se debe a la presencia de pigmentos, colorantes como son carotenos, xantofila y flavonoides. Éstos provienen del néctar de la especie vegetal en donde la abeja haya libado, su coloración se vuelve más intensa con el tiempo. Los diversos tipos de miel se diferencian por su color, su sabor y su densidad, su coloración puede ir desde blanco agua hasta ámbar oscuro, es por esto por lo que en el mercado podemos encontrar mieles rojizas, verdosas o amarillentas, Ver Tabla 2. Se ha detallado que entre más oscura sea la miel, tendrá mayor cantidad de minerales y mayores serán sus propiedades biológicas. No obstante, las mieles claras son más ricas en vitamina A (Blanco, Trama, & Libonatti, 2016).

Tabla 2.

#### *Clasificación de la miel por color*

<b>Coloración</b>	<b>mm Pfund</b>	<b>Absorbancia</b>
Blanco agua	0-8	0.104-0.125
Extra blanco	8-16.5	0.125-0.148
Blanco	16.5-34	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
Ámbar oscuro	mayor a 114	0.411 Más

Adaptado de (Maradiaga Pineda, 2005,pp. 5-14)

#### **2.4.2. Conductividad eléctrica**

En este parámetro se relaciona la concentración de sales minerales, puesto que este valor no varía durante los procesos de almacenamiento. Este parámetro se determina por movilidad y concentración de los iones que provienen de las sustancias minerales. Aquí también influye la zona geográfica de donde proviene la miel y el suelo en donde han sido cultivadas las especies vegetales que fueron polinizadas. El rango de conductividad eléctrica para la miel debe estar entre 0.60 y 2.17 mS/cm (Acquarone, 2004,pp. 24-36).

#### **2.4.3. Cenizas**

El contenido de cenizas también es un parámetro para determinar la concentración de minerales presentes en la miel y para corroborar que la melaza sea de origen floral más no de mielada. Los mismos factores que influyen en la conductividad eléctrica, inciden en el porcentaje de cenizas, el mismo que debe estar en un rango de 0,6% y 1.5% (Álvarez Mecías & Sánchez Casamen, 2016, pp.16-17).

#### **2.4.4. pH y acidez**

El pH de la miel se basa en la concentración de moléculas de  $H^+$ . El rango que debe tener es de 3.4-6.1, así con estos valores de pH se puede inhibir la proliferación de microorganismos (Álvarez Mecías & Sánchez Casamen, 2016, pp. 16-17). Por otro lado, la cantidad de ácido que compone la miel depende de algunos factores, entre ellos, el tiempo que transcurre entre recolectar el néctar, almacenarlo y madurarlo. Es en la maduración que la glucosa oxidasa reduce su producción de ácido glucónico. La producción del ácido glucónico se puede incrementar por la cantidad de azúcares, el clima y la densidad del néctar. Dependiendo de la cantidad de ácido que presenta la miel se puede determinar su frescura y potenciar el flavor de la melada (Acquarone, 2004, pp. 24-37).

#### **2.4.5. Hidroximetilfurfural (HFM)**

El hidroximetilfurfural es un aldehído cíclico que se origina a partir de la degradación del azúcar presente en la miel. Más explícitamente la fructosa sufre una deshidratación. La presencia de Hidroximetilfurfural indica las condiciones y tiempo de almacenamiento que ha recibido la miel. El contenido máximo que permiten las normas internacionales de HMF es de 40 mg/ kg de miel, si este valor es excedido significa que el producto no es fresco, es de baja calidad, ha sido adulterada y sometida a calentamiento (Subovsky, Sosa López, Castillo, & Cano, 2004, pp. 32-33).

#### **2.4.6. Índice de Diastasa**

La enzima diastasa es una proteína enzimática con funciones hidrolíticas sobre azúcares complejos. Su actividad disminuye con el tiempo y a altas temperaturas es desnaturalizada, de esta forma, la determinación del índice de

diastasa denota la calidad de la miel (Sanz Cervera & Sanz Cervera, 1994,pp. 181-191).

## **2.5 Propiedades Biológicas**

### **2.5.1 Capacidad antimicrobiana**

La miel de abeja ha sido utilizada desde la antigüedad como un producto medicinal ya que genera una barrera contra infecciones bacterianas y fúngicas. Se ha demostrado que esta acción va muy de la mano con la composición físico-química de la miel como son el pH bajo, alta concentración de azúcares, liberación de citoquinas, flavonoides, osmolaridad, etc (Salazar, Medina, Donoso, Barrientos, & Sanhueza, 2009,pp. 77-82).

Existen dos formas de acción para cumplir con la capacidad antimicrobiana:

- I. La actividad peróxida, en este proceso, actúa la enzima glucosa oxidasa, esta enzima es secretada por la abeja exactamente en su glándula hipofaríngea. La glucosa oxidasa actúa sobre la glucosa dejando como resultado la liberación de peróxido de hidrógeno. Este compuesto en altas cantidades es el que cumple la función antimicrobiana (Rivadeneira, 2016,pp. 11-14).
  
- II. La actividad no peróxida, aquí intervienen algunos factores de la composición físico-química de la miel, entre ellos la acidez por la acción de ácidos fenólicos y el pH que se encuentra entre 3.2 y 4.5. Esto permite inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, otro compuesto

inhibidor es el péptido – defensina. El cual provoca una disrupción de la membrana bacteriana, interactuando con su superficie negativa (Alvarez-Suarez, González Paramás, Santos-Buelga, & Battino, 2010,pp. 2491-2498). De igual manera la elevada concentración de solutos genera una presión en el gradiente osmótico, produciendo una deshidratación en la célula bacteriana (Alvarez-Suarez, González Paramás, Santos-Buelga, & Battino, 2010,pp. 2491-2498).

Las pruebas in vitro se utilizan para determinar de forma cuantitativa la reducción de la colonia microbiana. Dentro de estas pruebas se encuentra la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC). Estas pruebas nos permiten conocer si la miel tiene acción bacteriostática que es la capacidad de impedir el crecimiento bacteriano o si tiene acción bactericida que significa que la miel está matando a la bacteria (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 86-89).

### **2.5.2 Capacidad antioxidante**

Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica contienen un electrón desapareado o libre, provocando inestabilidad. Las moléculas inestables, recorren el cuerpo de un organismo vivo intentando robar un electrón de alguna molécula estable a fin de normalizarse. (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 83-86). Una vez que el radical libre consigue sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte en un radical libre, provocando una verdadera reacción en cadena que destruye las células (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 83-86). Se conoce que la vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero es capaz de reaccionar con todo lo que se encuentra a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Nuestro cuerpo produce radicales libres de forma moderada para atacar virus y bacterias (Avello & Suwalsky, 2006,pp.

161-172). Para controlar la producción de los radicales libres es necesario la presencia de antioxidantes para que neutralice la acción del oxidante (Avello & Suwalsky, 2006, pp. 161-172).

Dentro de los factores que promueven la aparición de radicales libres se encuentran dos clases:

- I. Los factores endógenos que están constituidos por cadenas de transporte electrónico mitocondrial, microsomal y peroxisomal, enzimas citoplasmáticas y fagocíticas.
  
- II. Los factores exógenos conformados por xenobióticos, tabaquismo, algunos alimentos de la dieta diaria, radiaciones y la hiperoxia (Montero, 1996, pp. 278-280).

La formación de oxígeno molecular actúa como un contaminante dentro del metabolismo. Los organismos aerobios consumen este oxígeno a fin de obtener energía; a su vez, crean mecanismos de defensa antioxidante ante la toxicidad que crean las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las especies reactivas de oxígeno se originan al reducir el oxígeno parcialmente por transformación electrónica (Montero, 1996, pp. 278-280). Existen diversos tipos de ROS entre ellos el radical anión superóxido que se produce cuando se realiza una transferencia monoelectrónica. El peróxido de hidrógeno se origina por una transferencia dielectrónica y por último la transferencia trielectrónica da como resultado el radical hidroxilo, siendo este el más tóxico ya que su vida media es de  $10^{-09}$  segundos y es el más reactivo. El radical hidroxilo produce peroxidación lipídica, inactivación enzimática, ocasiona mutaciones a nivel de



ADN y causa alteraciones en los receptores celulares de los glúcidos (Montero, 1996, pp. 278-281).

La miel de abeja contiene una alta gama de compuestos fitoquímicos. Estos compuestos son de origen natural y se destacan por ser biológicamente activos y cumplir con la acción antioxidante. Dentro de esta gama de compuestos se encuentran los compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeíco, elágico, ferúlico y p-cumárico, ácido siríngico, ácido benzoico, ácido cinámico; ácido clorogénico), y flavonoides (apigenina, crisina, galangina, hesperetina, kaempferol, pinocembrina y quercetina) (Jáuregui, et al , 2014,pp. 287-296). Los antioxidantes son sustancias capaces de reducir o eliminar la oxidación mediante la neutralización de los radicales libres. La cantidad de compuestos fenólicos y no fenólicos en la miel depende mucho del origen floral, condiciones climáticas y zona geográfica. Se conoce que las mieles de color ámbar oscuro contienen mayor cantidad de antioxidantes, por presentar mayor concentración de flavonoides, ácido ascórbico y  $\beta$ -caroteno, a diferencia de las mieles blanco agua (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 83-86).

La acción antioxidante de los compuestos fenólicos está vinculada a una serie de mecanismos, como son la eliminación de radicales libres, donación de hidrógeno, extinción del oxígeno simple y la quelación de iones metálicos. (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 83-86). De modo que la actividad antioxidante se puede determinar mediante el uso de numerosos ensayos *in vitro*, tales como: el ensayo de DPPH, el cual usa el radical 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl como un factor de señal analítica, cuando un radical presenta un electrón desapareado, la muestra se torna de una coloración azul/violeta, al reaccionar con un antioxidante cambia su coloración a amarillo, permitiendo determinar el porcentaje de captación del radical libre mediante espectrofotometría (Alvarez-Suarez J. M., 2017,pp. 83-86). El ensayo de FRAP (*Ferric reducing/antioxidant power*) se fundamenta en la capacidad de los polifenoles totales de reducir el

ión férrico  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  ión ferroso, el cual forma un complejo de coloración azul indicando una actividad antioxidante por un alto poder de reducción del fitoquímico (Alvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86). Por otro lado, el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), estiman la degradación oxidativa de los lípidos o también llamada peroxidación lipídica, el resultado a la degradación de peróxidos es la formación del malondialdehído (MDA), éste forma un complejo el cual toma una coloración rosa al interactuar con el ácido tiobarbitúrico, por lo tanto, puede ser cuantificado por espectrofotometría (Alvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86).

No obstante, se ha asociado la capacidad antioxidante de la miel con la actividad e interacciones de algunos compuestos, entre ellos las enzimas catalasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y sustancias no enzimáticas como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, aminoácidos, proteínas y ácidos orgánicos (Alvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86). Vale destacar que una de las grandes ventajas de la miel es que posee varios componentes antioxidantes y si alguno de ellos muestra propiedades pro-oxidantes, habría otros antioxidantes que pueden actuar ante el estrés oxidativo, además la miel contiene antioxidantes hidrosolubles y liposolubles, lo que le permite actuar a diversos niveles celulares (Alvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86).

### 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

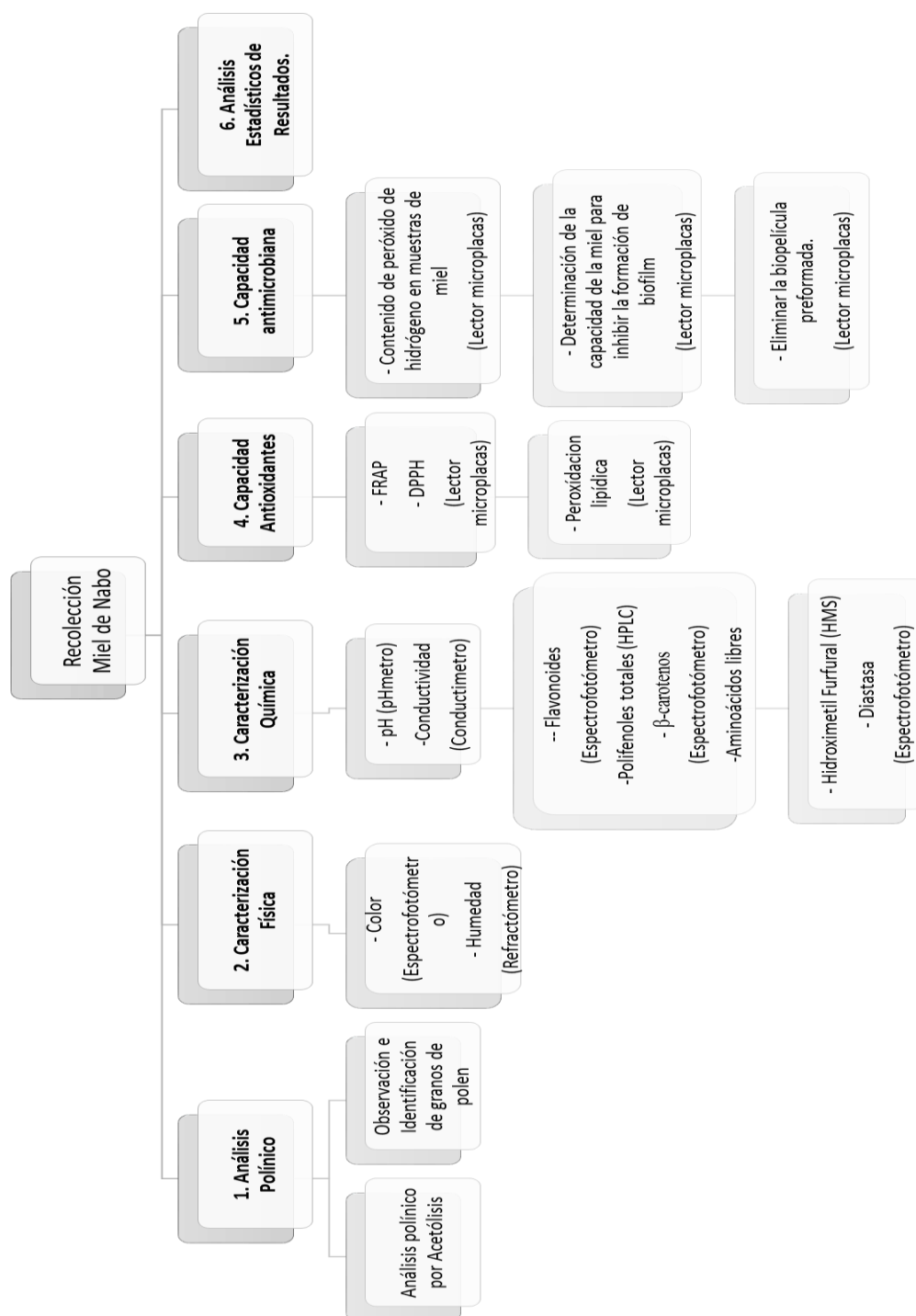


Figura 3. Esquema del Diseño del plan experimental para el estudio de la miel monofloral de Nabo.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1. Población

La población para analizar consistió en los apiarios que declararon producir miel de abeja monofloral de Nabo

### 4.2. Muestras

Las muestras de estudio fueron originarias de los apiarios de la provincia de Bolívar, en el cantón Chillanes en donde se produce la miel monofloral de Nabo.

### 4.3. Extracción de polen

La extracción de polen en la miel se realizó según el método de acetólisis descrito por Louveaux, et al (1978, pp. 140-155). Para este procedimiento se tomaron 150 ml de solución de miel, los cuales fueron separados en tres tubos falcon de 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de cada tubo fue recogido en un vaso de precipitación y el sedimento fue recolectado en un tubo falcon de 15 ml. A continuación, el sobrenadante se volvió a colocar en los tubos de 50 ml para ser centrifugado por 20 minutos a 4500 rpm. Posteriormente, al sedimento se le añadieron 10 ml de ácido acético glacial, se homogenizó por vortex (*Fisher scientific-Isoterm*) y se procedió a centrifugar por 5 minutos a 4500 rpm. El sobrenadante y el exceso de ácido fueron eliminados, al sedimento se le adiciono 10 ml de solución de acetólisis, homogenizándolo con una varilla de vidrio y centrifugándolo a 4500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se re suspendió con una gota de solución de glicerina, este fue colocado en un portaobjetos dejándolo secar en una plancha de calentamiento

por 5 minutos a 30°C. Seguidamente en el cubreobjetos se colocó la solución de gelatina-glicerina y se dejó secar por varios minutos. Por último, se contó los granos de polen con ayuda de un microscopio.

#### 4.4. Caracterización física-química

##### 4.4.1 Color

El color en miel se determinó a través del protocolo establecido según International Honey Commission (2002). Se preparó 5 ml de solución de miel, 2 ml de esta solución fueron vertidas en una cubeta espectrofotométrica y puestas en reposo por aproximadamente 10 minutos. Como último paso, se procedió a realizar la lectura en el espectrofotómetro (*Shimadzu- UV mini 1240*) a una longitud de onda de 635 nm. El blanco utilizado fue agua destilada.

Para determinar el color de la miel se obtuvo los mm Pfund a partir de la absorbancia empleando el siguiente cálculo (Montenegro, Avallone, Crazov & Aztarbe, 2005):

$$mm\ pfund = -38,70 + 371,39 * Abs, \quad (\text{Ecuación 1}).$$

Los valores obtenidos se compararon con la Tabla 3.

Tabla 3.

*Comparación entre color, mm Pfund y Absorbancia.*

<b>Miel</b>	<b>mm Pfund</b>
-------------	-----------------

Blanco agua	0-8
Extra blanco	8-16.5
Blanco	16.6-34
Ámbar extra claro	34-50
Ámbar Claro	50-85
Ámbar	85-114
Oscuro	más de 114

Tomado de (Maradiaga Pineda, 2005).

#### 4.4.2 Humedad

La determinación del porcentaje en miel se determinó mediante el protocolo descrito por International Honey Commission (2002). Una gota de la muestra de miel fue colocada en el refractómetro a una temperatura constante de 20°C, el porcentaje de humedad se obtuvo usando la *Tabla 4*.

Tabla 4.

*Determinación del contenido de humedad*

Índice de refracción (20°C)	Contenido de Humedad	Índice de refracción (20°C)	Contenido de Humedad	Índice de refracción (20°C)	Contenido de Humedad
-----------------------------	----------------------	-----------------------------	----------------------	-----------------------------	----------------------

	(%)		(%)		(%)
1,5044	13,0	1,4935	17,2	1,4830	21,4
1,5038	13,2	1,4930	17,4	1,4825	21,6
1,5033	13,4	1,4925	17,6	1,4820	21,8
1,5028	13,6	1,4920	17,8	1,4815	22,0
1,5023	13,8	1,4915	18,0	1,4810	22,2
1,5018	14,0	1,4910	18,2	1,4805	22,4
1,5012	14,2	1,4905	18,4	1,4800	22,6
1,5007	14,4	1,4900	18,6	1,4795	22,8
1,5002	14,6	1,4895	18,8	1,4790	23,0
1,4997	14,8	1,4890	19,0	1,4785	23,2
1,4992	15,0	1,4885	19,2	1,4780	23,4
1,4987	15,2	1,4880	19,4	1,4775	23,6
1,4982	15,4	1,4875	19,6	1,4770	23,8
1,4976	15,6	1,4870	19,8	1,4765	24,0
1,4971	15,8	1,4865	20,0	1,4760	24,2
1,4966	16,0	1,4860	20,2	1,4755	24,4
1,4961	16,2	1,4855	20,4	1,4750	24,6
1,4956	16,4	1,4850	20,6	1,4745	24,8
1,4951	16,6	1,4845	20,8	1,4740	25,0
1,4946	16,8	1,4840	21,0		

1,4940	17,0	1,4835	21,2		
--------	------	--------	------	--	--

Tomado de (Mexicana, 1997)

#### 4.4.3 pH

El pH fue determinado mediante el método establecido por Piccirillo, Rodríguez, & Ojeda de Rodríguez (1998, pp. 486-497). Se partió de 37,5 ml de solución de miel, los cuales fueron homogenizados por vortex. Con ayuda de un pHmetro se procedió a determinar el pH inicial de las muestras de miel.

#### 4.4.4 Cenizas

El porcentaje de cenizas en miel se adquirieron mediante el método descrito por Olivier (2006, pp. 89-95). Como parte inicial del ensayo se pesó el crisol vacío, luego se pesaron 5 g de miel en un crisol. Las muestras fueron calcinadas en una plancha de calentamiento hasta la temperatura máxima. Las muestras calcinadas ingresaron en la mufla a 500°C por 24 horas, cuando las muestras se hicieron cenizas se retiraron de la mufla, se dejaron enfriar en un desecador para luego registrar su peso final. El porcentaje de cenizas se obtuvieron mediante la siguiente fórmula (Velásquez Guanín, 2017):

$$\% \text{ de cenizas totales} = \frac{(B - A)}{(C - A)} * 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

(A= peso de crisol inicial, B= peso de crisol + muestra, C= peso de crisol + cenizas).

#### 4.4.5 Conductividad Eléctrica



La conductiva eléctrica fue ejecutada según el método de Álvarez Mecías & Sánchez Casamen (2016,pp. 28-30). Se prepararon 18,75 ml de solución de miel y se midió la conductividad mediante un conductímetro (Para ello, se sumergieron los electrodos del equipo en la solución y se mantuvo a una temperatura de 20°C).

#### 4.4.6 Hidroximetilfurfural (HFM)

La determinación del índice de Hidroximetilfurfural en miel es uno de los métodos más eficaces para determinar la calidad y frescura de esta. Para este análisis se usó el protocolo descrito por Sanz Cervera & Sanz Cervera (1994,pp. 181-191). Se dispusieron 50 ml de solución de miel y se filtraron para eliminar los residuos sólidos. En seguida a la solución de miel se le añadieron 0.5 ml de solución carrez I y 0,5 ml de solución carrez II. La solución resultante fue colocada en dos tubos de 5 ml, al primer tubo que se lo denominó como muestra, se le agregaron 5 ml de agua destilada, mientras al otro tubo se le adicionaron 5 ml de bisulfito sódico ( $NaHSO_3$ ), a este último se lo etiquetó como referencia. Los dos tubos fueron mezclados suavemente y colocados en cubetas de cuarzo; inmediatamente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 284 nm y a 336 nm.

Para determinar el contenido de hidroximetilfurfural se utilizó la siguiente fórmula (Sanz Cervera & Sanz Cervera, 1994):

$$HMF \left( \frac{mg}{100g} \right) = \frac{(A_1 - A_2) \times F \times 5}{P}$$

(Ecuación 3)

En Donde: A1= Absorbancia medida a 284 nm, A2= Absorbancia medida a 336 nm, P= Peso de la muestra (en gramos) y F= 14,97 (para expresarlo en mg/100g)

#### **4.4.7 Índice de Diastasa**

El proceso para establecer el índice de diastasa comenzó con la determinación de la dilución de almidón necesaria para ejecutar el ensayo descrito por Sanz Cervera & Sanz Cervera (1994,pp. 181-191). Una vez obtenida la dilución se procedió a realizar la solución de trabajo de miel, añadiendo 1 ml de buffer fosfato, 4 ml de agua destilada y 0,6 ml de solución de cloruro de sodio (*Cobachemin*), aforando esta solución a 10 ml. Un volumen de 2 ml de la solución fueron colocadas en un tubo de ensayo y 1 ml de solución de almidón en otro tubo, ambos se calentaron en baño maría a 40°C por 15 minutos. Pasado este tiempo, se juntaron el contenido de los dos tubos y se tomó el tiempo de reacción con un cronometro; cada 5 minutos la solución fue recolectada en un tubo eppendorf y se le agregaron 500 µL de solución de yodo; además, se realizó la dilución según la cantidad determinada previamente. Finalmente, la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 660nm. Este proceso se repitió hasta que la lectura de la absorbancia fuera menor o igual a 0,235 nm. Para el blanco se utilizó la solución de trabajo de miel y se empleó agua destilada en vez de la solución de almidón.

#### **4.4.8 Aminoácidos libres**

Los aminoácidos libres en miel provienen mayormente de su origen botánico, una forma de determinar estos compuestos en la miel es a través del método Ninhidrina-Cadmio establecido por Doi, Shibata, & Matoba (1981,pp.173-184). Es necesario establecer una curva de calibración. En un tubo de ensayo se agregó 1 ml de solución estándar (30 mg de leucina en 500 mL de agua

destilada) y se adicionaron 2 ml de solución de trabajo (0.8 gr de ninhidrina, 80 ml de etanol 99.5%, 10 ml de ácido acético y 1 gr de  $\text{CdCl}_2$ ), se calentó a  $84^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 507nm. Para la medición de la muestra se adiciono en un tubo de ensayo 1 ml de solución de miel y se añadieron 2 ml de solución de trabajo. Se usó como blanco 1 ml de agua destilada y se le adicionaron 2 ml de la solución de trabajo.

A partir de la ecuación de la curva estándar, se calculó la concentración de la muestra en mg de leucina y prolina por litro.

Para calcular el contenido de N-amínico en 100 gramos de miel se aplicó la siguiente ecuación (Doi, Shibata, & Matoba, 1981):

$$\frac{x \left( \frac{\text{mgLeuc}}{\text{L}} \right) * 25\text{mL} * 100\text{gmiel}}{1000 \left( \frac{\text{mL}}{\text{L}} \right) * 1.25 \left( \text{gmiel} \right)} \quad (\text{Ecuación 5})$$

#### 4.4.9 Flavonoides

Para la determinación de flavonoides en muestras de miel se utilizó el ensayo descrito por Muñoz (2007, pp. 848-851). Se utilizaron placas de 96 pocillos, en cada pocillo fueron adicionados 20  $\mu\text{L}$  de la muestra (solución de miel) y 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Consecutivamente, se añadieron 6  $\mu\text{L}$  de solución al 5% de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 6 minutos. Después de incubar, se adicionaron 12  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de aluminio hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) al 10% diluido en metanol y se incubó durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 1M y 22  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Por último, la medición fue realizada en un lector de placas (*Biotek-Synergy HT*) a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresaron en mg de catequina/kg de miel. Para establecer los resultados, se elaboró preliminarmente una curva de calibrado a partir de una solución madre 1 mM, en donde se emplearon 0,0308 g de catequina (*Cayman*) diluida en 100 ml de agua destilada.

#### 4.4.10 Extracto polifenólico

De acuerdo con el método señalado por Andrade, Ferreres, & Amaral (1997, pp. 2281-2286). Se pesaron 10 g de miel, los cuales fueron diluidos en 50 ml de agua a un pH de 2, para llegar a ese pH se adicionó ácido clorhídrico (HCl) 1 molar. Se activaron las columnas con el paso de metanol absoluto y luego se pasó agua a pH 2. Una vez activadas las columnas se procedió a pasar la solución de miel. Concluido este pasó, se efectuó tres lavados con agua a pH 2 y se adjuntó metanol. Toda la solución fue colectada y llevada al rotavapor (*Buchi-R210*) hasta obtener 2 ml de la solución. Finalmente, la muestra fue trasladada al concentrador al vacío (*Genelac-m/Vac Duo Conceentrator*) hasta que se obtuvo solo el extracto.

#### 4.4.11 Fenoles totales

El protocolo utilizado fue el descrito por Muñoz, (2007). Se utilizó cubetas de cuarzo, en ellas fueron agregados 100  $\mu$ L de la muestra (solución de miel) y 500  $\mu$ L del reactivo de Folin (FC), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente; terminado el tiempo de incubación se adicionaron 400  $\mu$ L de carbonato de sodio, se incubó nuevamente en oscuridad y a temperatura ambiente por un lapso de dos horas. Por último, se midió en el espectrofotómetro a 760 nm. Este mismo procedimiento se realizó con el blanco y la solución estándar. El resultado de concentración de fenoles se expresó en mg de ácido gálico/ 100 g de miel. Fue necesario realizar una curva de calibrado con una solución madre a 6 mM, disolviendo 0,1 g de ácido gálico (*Lobachemie*) en 1 ml de metanol se aforó a 100 ml con agua destilada.

#### 4.4.12 Polifenoles totales mediante HPLC

Este procedimiento se realizó según el protocolo descrito por Álvarez-Suarez, González Paramás, Santos-Buelga, & Battino (2010, 9817-9824). Para ello se ocupó el equipo HPLC Agilent Technologies Series 1260, una columna Eclipse Plus C18 5  $\mu\text{m}$  4.6 x 250 mm. Las condiciones de trabajo fueron una temperatura de 35°C, un flujo de 1.0 ml/min, la longitud de onda utilizada fue de 280, 330 y 360 nm a un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ . Como fase móvil se usó ácido fosfórico a 0,1% (Línea A) y acetonitrilo (Línea B). En la parte experimental, se pesaron 5 mg del extracto metanólico en un tubo eppendorf de 2ml, se aforó con metanol grado HPLC. La muestra fue filtrada y colocada en un vial para HPLC; se corrió la muestra y se obtuvo el espectro, el cual fue identificado con un espectro de referencia. De manera preliminar se realizó un patrón con un estándar de ácido gálico (pureza 99.1%) y de quercetina (pureza 99,1%), los dos estándares con Humedad 0%.

#### 4.4.13 $\beta$ -Carotenos

A partir del protocolo descrito por Bueno-Costa, et al (2016, pp. 334-338) a la muestra de miel se le agregaron 5 ml de hexano acetona. Las muestras se mantuvieron en agitación por una hora y consecutivamente fue centrifugada; se tomó el sobrenadante y se colocó en una cubeta de cuarzo. La medición se efectuó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm, usando como blanco hexano acetona. De forma preliminar, se realizó una curva de calibrado de  $\beta$ -caroteno (*Sigma*) y se comparó los datos de absorbancia de las muestras con las de la curva de calibrado.

## 4.5. Capacidad Antioxidante

### 4.5.1 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

La capacidad antioxidante mediante el uso de DPPH se realizó de acuerdo con lo descrito por Alvarez-Suarez, Tulipani, Romandini, Vidal, & Battino (2009, pp. 293-302). En primera instancia se efectuó una curva de calibrado de ácido ascórbico. En este protocolo fueron manejados dos blancos, en el primer blanco se agregaron 110 µL de etanol al 70 % (v/v), 10 µL de metanol y 80 µL de DPPH (*Alpha Aesar*) 0,2 mM; en el segundo blanco se adicionaron 110 µL de etanol al 70 %, 10 µL del estándar y 80 µL de metanol. Para la muestra fue preciso añadir 110 µL de etanol al 70 %, 10 µL de la solución de miel y 80 µL de DPPH 0,2 mM. Se incubó por 15 minutos y la medición fue realizada en un lector de placas a 517 nm. Los resultados se obtuvieron con la siguiente ecuación y se expresaron en umol de trolox/ 100 g de miel (Alvarez-Suarez, Tulipani, Romandini, Vidal, & Battino, 2009).

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

(Ecuación 6)

### 4.5.2 FRAP (*Ferric reducing/antioxidant power*)

La determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP fue realizada de acuerdo con el método empleado por Alvarez-Suarez, Tulipani, Romandini, Vidal, & Battino (2009, pp. 293-302). En una placa de 96 pocillos, en los pocillos se adicionaron 180 µl de solución de FRAP, 20 µl de muestra (solución de miel), se agregó solución estándar y por último fue incorporado un blanco. La solución de miel, solución estándar y el blanco fueron agregados en diferentes pocillos. Posteriormente se midió en un lector de placas a 539 nm.

Previamente fue elaborada una curva patrón, partiendo de una solución madre de trolox 5 Mm, utilizando 0.313 g de Trolox disuelto en 25 ml de etanol absoluto. La solución estándar partió de amonioferrosulfato 1 mM, se pesaron 0.0196 g del reactivo, aforando hasta 50 ml. Los resultados se expresaron en umol de trolox/ 100 g de miel (Alvarez-Suarez, et al., 2010, pp. 9817-9823)

### **4.5.3 Peroxidación Lipídica**

#### **4.5.3.1 Extracción de membranas de glóbulos rojos**

Los glóbulos rojos fueron extraídos de la sangre de voluntarios adultos no fumadores, los cuales previamente firmaron una carta de consentimiento. Se usó el protocolo estipulado por Hanahan & Ekholm (1974,pp. 168-172). Los glóbulos rojos (RBCs) fueron aislados de sangre hepanírizada, para ello se centrifugo a 1000 g por 10 minutos a 10°C, el plasma y la capa leucocítica fueron eliminados. Por otro lado, los glóbulos rojos se sometieron a un lavado con solución de NaCl AL 0,9% y tres lavados con PBS. Una vez obtenido los RBCs se produjo una hemolisis completa, para ello los RBCs fueron lavados con soluciones hipotónicas a diferentes concentraciones, como se describe a continuación: En primera instancia los RBCs fueron resuspendidos en una solución (1:20) de 5 mM buffer fosfato hipotónico (EDTA 2,2 mM, 1:20) a pH 7,4 e incubados a 4°C durante 30 min. Una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 3800 g durante 20 min a 8 ° C, el sobrenadante que se obtuvo fue descartado y el sedimento fue resuspendido en 2,5 mM de tampón de fosfato hipotónico (1:20) pH 8. El proceso se repitió y se agregaron 1,25 mM de tampón fosfato pH 8 y centrifugado a 13.500 rpm durante 20 minutos a 8 ° C. Por ultimo las membranas de glóbulos rojos quedaron completamente claras y se re suspendieron en un tampón PBS 2,2 mM de EDTA (1: 5). Las membranas fueron almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

#### **4.5.3.2 Peroxidación lipídica en membranas de glóbulos rojos**

Para iniciar el procedimiento las membranas de RBCs de acuerdo con el método de Alvarez-Suarez, et al (2012, pp. 31-38) fueron descongeladas y centrifugadas a 1800 g durante 20 minutos a 8°C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue lavado dos veces con NaCl 0,9%. Se resuspendió en NaCl 0,9% para el análisis posterior. En tubos eppendorf se agregaron 50 µl de solución de miel, 50 µl de AAPH (50 mM) y 100 µl de membranas de RBCs, fueron incubadas a 37°C durante 60 min. La formación de TBARS se determinó mediante un ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA). En el ensayo se añadió 1 ml de solución de TBA-TCA-HCl a las muestras, estas fueron calentadas durante 20 min a 95°C, luego enfriadas y centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min y la absorbancia del sobrenadante se midió por espectrofotometría a 535 nm. Además, se incluyeron dos muestras de control en el estudio: el primer control se usó para evaluar la peroxidación lipídica basal existente en el tejido (C0), y el segundo control fue utilizado para estimar la peroxidación máxima producida durante cada prueba (C60). De acuerdo con Alvarez-Suarez, et al (2012, pp. 31-38), la actividad antioxidante de las muestras se formuló como el porcentaje de inhibición (PI) de la formación de TBARS originado por la miel a partir de su valor de absorbancia (Am) en comparación con los controles y se calculó usando la siguiente ecuación (Alvarez-Suarez J. , 2012):

$$PI = \frac{[1 - (Am - C0)]}{(C60 - C0)} \times 100 \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Los resultados se expresaron como la concentración de miel que causa el 50% de inhibición de la formación máxima de TBARS (IC50) en la membrana de glóbulos rojos.



#### **4.5.4 Capacidad antimicrobiana**

##### **4.5.4.1 Determinación de contenido de Peróxido de Hidrogeno**

Este ensayo se utilizó el método FOX-1 para la determinación de peróxido de hidrógeno en muestras de miel descrito por Li, et al (2017, pp. 225.229). Se preparó una solución de trabajo FOX-1 (25 mM de sulfato ferroso de amonio en 0,25 M de ácido sulfúrico con una solución que consta de 62.5 l de xileno naranja y 150 mM de sorbitol 1: 100). Luego fueron adicionados 80 µl de solución de miel a 160 µl de la solución de trabajo FOX-1 en una placa de 96 pocillos. Esta mezcla fue homogenizada e incubada en la oscuridad durante 30 minutos; posteriormente, se midió la absorbancia a 580 nm usando un lector automático de microplacas. Como blanco se utilizó agua destilada. Para la solución estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se diluyó una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) para dar una concentración final de 3,4 mg / ml. De manera preliminar fue efectuada una curva de calibrado utilizando una solución madre de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluida, obteniendo rangos de dilución, a estas diluciones se le adicionó 160 µl de reactivo FOX-1 y se incubó durante 30 min. Pasado los 30 minutos se midió la absorbancia a 580 nm. El contenido de peróxido de hidrógeno en las muestras de miel se expresó como µg / kg de miel.

##### **4.5.4.2 Inhibición de la miel en la formación de biofilm y eliminar la biopelícula preformada**

Fue empleado un protocolo de formación de biopelícula en una placa de microtitulación de acuerdo con el método de Lu, et al (2014). En el ensayo se usaron dos cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* CAMP (Gram positivo) y *Klebsiella pneumoniae* KPC 609803 (gramnegativo). El par de cepas fueron cultivadas en TBS (Tryptic Soy Broth), se centrifugaron a 90 rpm, 37°C durante 18 h. La suspensión de cultivo, se disolvió 0,5 veces en la escala de McFarland

( $1,5 \times 10^8$  UFC), 100  $\mu$ l de esta dilución fueron trasladadas a una placa de 96 pocillos. Inmediatamente se añadieron 100  $\mu$ l de TBS que contenía la solución de miel, se incubó a 37°C por 24 horas. La biopelícula fue lavada tres veces con PBS y se incubó con la solución de miel durante 24 horas a 37°C. La célula planctónica fue eliminada y se cuantificó la masa de biopelícula por medio de espectrofotometría. La formación de biopelícula se formuló como un porcentaje relativo al originado por el control no tratado (100%). Como control negativo se utilizaron los medios con y sin solución de miel sin inocular.

#### 4.6 Análisis estadístico de resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó una comparación entre la miel artificial y la miel monofloral de Nabo, mediante un ANOVA y se determinó la desviación estándar.

## 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis polínico

Los resultados obtenidos en el análisis de granos de polen que constituye la miel monofloral de Nabo se describen en la Tabla 5.

Tabla 5.

*Contenido de granos de polen en miel monofloral de estudio.*

Tipo de miel	Clase de frecuencia	Identificación de granos de polen (% de frecuencia y géneros)
--------------	---------------------	---

		<b>botánico)</b>
Miel de Nabo	P	<i>Brassica napus</i> (72,21%)
	S	<i>Mimosa c.f. albida</i> (19.15%)
	M	<i>Poulsenia type</i> (8.64%)

Nota: Predominio de la clase de polen: P - Polen predominante (más del 45% de predominio de granos de polen específicos para un tipo botánico); S - polen secundario (10-45%); M - Polen menor (1-10%).

Al observar la tabla 5 se puede apreciar claramente que el grano de polen predominante pertenece a la especie de *Brassica napus*, es decir que esta especie vegetal es circundante a los apiarios de producción de miel. Debido al elevado porcentaje de grano de polen de nabo (72,21%) se puede clasificar a la miel como monofloral para este tipo de especie vegetal. De acuerdo con los resultados descritos por Stawiarz (2008 pp. 83-89), para que una miel se considere monofloral, el grano de polen predominante debe ser igual o mayor al 55% del total de polen identificado. Ecuador es uno de los países de América del Sur en donde se puede encontrar alrededor de 62 especies de hortalizas cultivadas, entre ellas el Nabo chino (*Brassica napus*). Este tipo de especie vegetal tiene la capacidad de adaptarse a climas fríos y contiene compuestos antioxidantes necesarios para prevenir enfermedades. Por tanto, la miel que contiene su polen adquiere las mismas propiedades, así como su coloración (Pascual Quispe, 2015, pp. 1-13).

Actualmente en Ecuador el cultivo de Nabo ha incrementado su volumen, puesto que, se lo utiliza para la obtención de aceites de consumo alimenticio. Al tratarse de un cultivo transitorio de ciclo corto, cada cierto periodo de tiempo es reemplazado por otra especie vegetal como maíz o trigo (Muirragui Almeida,

2013, pp. 14-49); Es por esto, que la producción de miel monofloral de Nabo se da en ciertas épocas del año.

## 5.2. Caracterización físico-química

Tabla 6.

*Resultados de la caracterización Físico-química realizada en la miel de estudio.*

<b>Técnicas elaboradas</b>	<b>Resultados obtenidos para la miel de Nabo</b>
Color (mmPfund)	37,09 ± 3,31
Humedad (%)	14,63 ± 2,74
pH	3,96 ± 0,24
Cenizas (%)	0,11 ± 0,02
Conductividad eléctrica (mS/cm)	0,20 ± 0,01
Hidroximetilfurfural (HMS)	70,81 ± 7,86
Índice de Diastasa (°Gothe)	13,71 ± 2,99

Las propiedades físico-químicas evaluadas para la miel monofloral de Nabo se realizaron de acuerdo con las normas de calidad que se establecen a nivel internacional por International Honey Commission (2002). La miel de Nabo posee un color Ámbar extra claro, el valor en mm Pfund fue comparado con la tabla que describe International Honey Commission. (2002). El color es un factor importante en la miel ya que se relaciona con otras propiedades y factores de calidad. Entre ellos sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, entre otras. Se sabe que el color de la miel es procedente de los pigmentos derivados de las especies vegetales como: los carotenos, xantofilas, flavonoides, fenoles, etc. (Maradiaga & David, 2005, pp. 4-9). Existe una amplia gama de coloraciones en miel desde blancos, oscuros, verdosas y

rojizas; sin embargo, las mieles predominantes son en tonos castaños claras o ambarinas (Maradiaga Pineda, 2005, pp. 4-9).

El porcentaje de humedad obtenida en las muestras analizadas de miel de Nabo no sobrepasa el rango límite de calidad que oscila entre 15 y 22%. (Ver Tabla 6). Si este valor se excediera del porcentaje normal, se afectaría la granulación del producto y su calidad debido a que puede fermentarse por presencia de microorganismos. El aumento de esta propiedad se puede originar por un proceso deficiente de almacenamiento; además, el clima de la zona puede ser desfavorable en el momento de envasar la miel ya que incrementa la humedad en el producto final (Pérez, 2015, pp. 5-10).

El pH conseguido en la miel de nabo (Ver Tabla 6) fluctúa entre el rango permitido de 3.3 a 5.5 para mieles de origen floral, mientras que para mielada el rango oscila entre 4.5-5.5. El valor de pH se relaciona con la presencia de los compuestos fenólicos y ácidos fenólicos que posee la miel; además de otra variedad de compuestos ácidos como: ácido pirúvico, málico, cítrico,  $\alpha$ -cetoglutarico, entre otros (Gutiérrez Pallo, 2016, pp. 28-42)

El valor de pH se relaciona con el porcentaje de cenizas ya que los minerales presentes en la miel interactúan con los ácidos que la componen, en consecuencia, aumentan el pH del producto (Gutiérrez Pallo, 2016, pp. 28-42). El porcentaje de cenizas alcanzado para las mieles de este estudio (Ver Tabla 6) es menor al 0,60% que es la cantidad máxima de cenizas en miel que establece International Honey Commission. (2002); por lo tanto, la miel de nabo cumple con los lineamientos señalados y con estudios previos realizados por Alvarez-Suarez, González Paramás, Santos-Buelga, & Battino (2010) en donde se especifica que las mieles de tonalidades claras poseen menor cantidad de cenizas. Este parámetro es importante para la calidad de la miel ya que se puede establecer si la miel ha sido adulterada principalmente con melazas, además de indicar el contenido de minerales que componen la miel. Las cenizas se relacionan con el contenido de humedad, las sales orgánicas o

electrólitos muestran la capacidad de conducir la corriente eléctrica, así como los iones presentes en plata, calcio, sodio, magnesio y potasio mineral asociado a la capacidad antioxidante (Gutiérrez Pallo, 2016, pp. 28-42). El valor obtenido de conductividad eléctrica se encuentra por debajo del valor máximo (2.09 mS/cm) establecido por International Honey Commission. (2002). Oddo, et al (2004,pp. 1-46) reportó datos similares para la miel monofloral de Nabo, obteniendo 0.19 mS/cm. Valor que concuerda con el resultado que se obtuvo en el análisis y con la bibliografía, ya que la miel de nabo se caracteriza por ser de baja conductividad eléctrica.

En cuanto al análisis de Hidroximetilfurfural (HMS) es uno de los más indispensables para establecer la calidad de la miel. El HMS es un aldehído que se forma por degradación de los compuestos azucarados, el hidroximetilfurfural no es propio de la miel, este compuesto aparece con el tiempo y aumenta cuando la miel ha sido expuesta a tratamientos térmicos inadecuados (Navarro, 2015,pp. 3-4). De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede plantear que la miel no ha sido adulterada y no ha sufrido malas prácticas de manufactura; por lo cual, cumpliría con los estándares de calidad según *International Honey Commission* (2002) especifica que el valor mínimo de HMF en mieles tropicales es de 80 mg de HFM/ kg de miel. Por otro parte, Maradiaga Pineda (2005,pp. 18-32) detalla que en países europeos el valor límite para una miel de calidad es de 15 mg HMF/ kg de miel.

La determinación del índice de diastasa es un análisis que corrobora los datos obtenidos en el ensayo de Hidroximetilfurfural. La diastasa es una enzima capaz de hidrolizar azúcares simples, su actividad se pierde al ser expuesta a altas temperaturas y cuando la miel es almacenada por largos periodos de tiempo (Sanz Cervera & Sanz Cervera, 1994). Según lo descrito por (Maradiaga Pineda, 2005,pp. 18-32), las mieles de mielada tienen un índice de diastasa superior a las mieles de origen floral. El valor permitido para el índice

de diastasa es superior a 8 unidades. Con los resultados obtenidos en el estudio se corrobora que los resultados de miel de nabo se encuentran en el rango de los valores permitidos y cumplirían con los estándares de calidad.

### 5.3. Compuestos Bioactivos

Tabla 7.

*Resultados de la concentración de compuestos bioactivos en la miel de Nabo.*

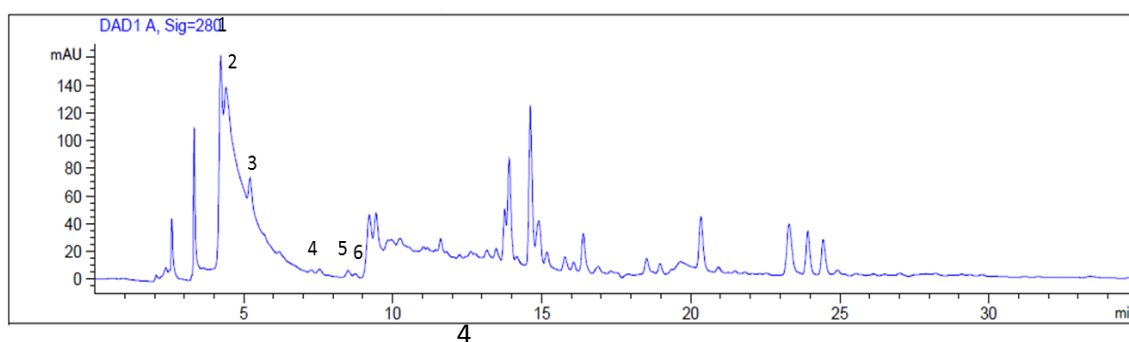
<b>Compuestos químicos analizados</b>	<b>Resultados obtenidos para la miel monofloral de Nabo</b>
Aminoácidos libres (mg LE/ 100 g miel)	10,53 ± 3,66
(mg Prol/100 g de miel)	88,19 ± 18,53
Flavonoides (mg de CE / 100g de miel)	0,72 ± 0,20
Fenoles totales (mg GAE/ 100 g miel)	34,33 ± 0,89
β-carotenos (mg β-carot/ kg de miel)	0,76 ± 0,14

Dentro de los compuestos bioactivos que posee la miel se detallan los fenoles, flavonoides, aminoácidos y carotenoides, estos compuestos naturales son los encargados de cumplir con la actividad antioxidante mediante la eliminación de los radicales libres; al mismo tiempo, estos compuestos son los encargados de brindar la coloración a la miel. Los compuestos bioactivos en la miel pueden variar dependiendo de la fuente de néctar que la abeja haya utilizado. El estudio de los compuestos bioactivos es considerado como un ensayo viable para el estudio del origen floral y geográfico de la miel, así como su aporte nutricional (León, 2015, pp. 178-181).

Alvarez-Suarez, et al (2010,9817-9824) realizó un estudio similar en mieles monoflorales de Cuba, en sí se muestran las concentraciones de los compuestos bioactivos para diferentes mieles según su coloración. La miel de espectro clara obtuvo las concentraciones más bajas 226 mg GAE/ kg de miel para Fenoles totales, 10.09 mg de CE/ kg de miel en flavonoides y 1.22 mg  $\beta$ -carot/ kg de miel. Los datos obtenidos para la miel de nabo se mantienen bajos y cumplirían con lo establecido para mieles claras. No obstante, el resultado que describe Alvarez-Suarez, et al (2010, pp. 9819-9823) para el ensayo de aminoácidos libres en mieles claras es de 15.3 mg LE/ 100 g de miel, dato que concuerda con el obtenido en miel de Nabo. Algo semejante ocurre con lo descrito por Oddo, et al (2004,pp. 1-46), en donde determinaron la cantidad de aminoácidos libres. En este caso por cuantificación de prolina obtuvieron 235 mg de Prolina / 100 g de miel de *Brassica napus* a diferencia de lo identificado en este estudio en donde la cantidad de prolina es menor, esta diferencia en miel de la misma especie floral está dada por los diversos factores ambientales y zona geográfica que posee la cosecha de este tipo de miel.

### 5.3.1 Determinación de compuestos polifenólicos por HPLC.

El estudio de los compuestos polifenoles por HPLC es un complemento al análisis realizado previamente, ya que nos permite determinar de manera cualitativa los ácidos fenólicos que forman parte de la miel, estableciendo posibles marcadores del origen floral.





*Figura 4.* Cromatograma obtenido por HPLC de los compuestos polifenoles de miel monofloral de Nabo.

Tabla 8.

*Compuestos obtenidos por análisis cualitativo en HPLC de la miel monofloral de Nabo.*

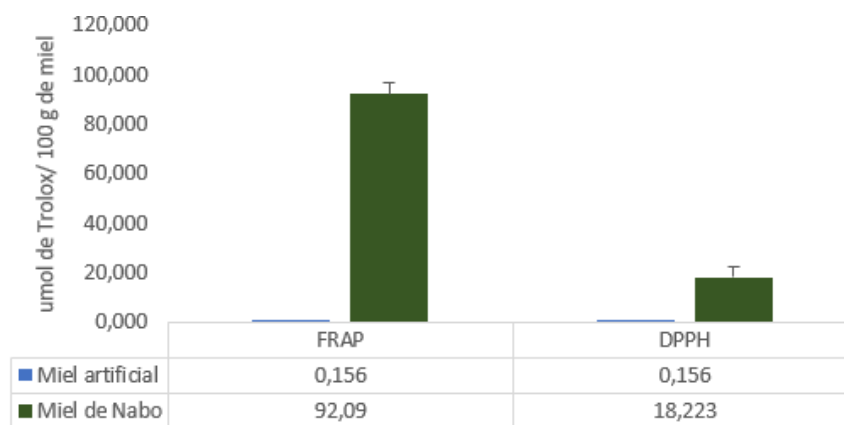
<b>Pico</b>	<b>Uv (nm)</b>	<b>Compuesto</b>
1	255	Floroglucinol
2	260, 294	Ácido vanílico
3	298sh,324	Ácido cafeico
4	274	Ácido Siríngico
5	232,310	Ácido p-cumárico
6	296,322	Ácido ferúlico

Un estudio de compuestos fenólicos realizado por Andrade, Ferreres, & Amaral, (1997, pp. 2282-2286) en mieles de Lavanda y Brezo, reportan la presencia de ácido gálico, vanílico, clorogénico, cafeico, siríngico, *p*-cumarico, ferúlico, elágico y cinámico; siendo el ácido *p*-cumárico su marcador ya que se encontraba en el 39% de las muestras analizadas. Alvarez-Suarez, et al (2010). realizo otro estudio en mieles uniflorales provenientes de diversos orígenes florales obteniendo los siguientes compuestos *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, siríngico, *p*-cumarico, cis-trans abscísico, cinámico, quercetina, pinocembrina, crisina, galangina y kaempferol. Como se puede observar la mayoría de los compuestos se encuentran en los distintos tipos de mieles de diversos orígenes florales; así mismo, ocurre con la miel de Nabo (Ver tabla 8) ya que concuerda con la mayoría de los compuestos descritos por los autores; no obstante, el fluroglucinol podría describirse como marcador de la miel de

Nabo, debido a que es el único compuesto que no se describen en las otras mieles, pero se requieren de más estudios para comprobar esta afirmación.

## 5.4. Capacidad Antioxidante

### 5.4.1 Método de FRAP y DPPH

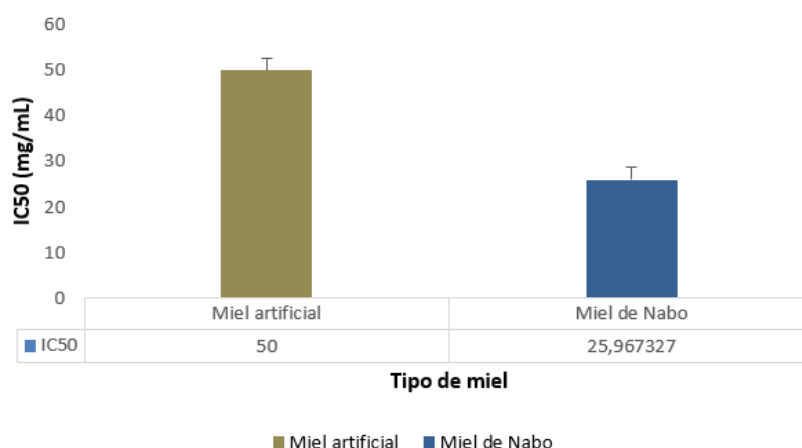


*Figura 5.* Capacidad antioxidante de miel de Nabo y miel artificial por método de FRAP (umol de Trolox / 100 g de miel) y DPPH (umol de Trolox / 100 g de miel).

La determinación de la capacidad antioxidante se ejecutó mediante dos métodos de transferencia de electrones para medir la capacidad reductora del sustrato, entre los métodos utilizados se encuentra el método de FRAP (Reducción del ion férrico) y por el reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), se utilizó una curva patrón de trolox para ambos ensayos. Se analizaron muestras de miel artificial y miel monofloral de Nabo, los resultados se muestran en la Figura 5. Como se puede observar la miel monofloral de Nabo posee mejores resultados que la miel artificial, esto se debe a los compuestos bioactivos que posee la miel de nabo incrementa su poder antioxidante. Se puede señalar, que la coloración de la miel influye en su actividad antioxidante. En el artículo publicado por Alvarez-Suarez, et al (2010) se detalla que las mieles claras poseen menor actividad antioxidante que en mieles oscuras. Las mieles con mayor cristalización Ciappini (2013, pp. 45-51) corrobora esta afirmación ya que, en su investigación, elaborada en mieles claras de trébol y

alfalfa, especifica que estas mieles presentan la menor concentración en actividad antioxidante de todas las muestras estudiadas. Como no existen valores estándar para la capacidad antioxidante de miel, la comparación de resultados se basa en los obtenidos en diversas investigaciones. La concentración que obtuvo Alvarez-Suarez J., et al (2016, pp. 38-48) para miel de Manuka por el método de FRAP fue de 110  $\mu\text{mol Trolox/ 100 g}$  de miel aproximadamente y de 50  $\mu\text{mol Trolox/ 100 g}$  de miel para DPPH. De igual forma, Gorjanović, et al (2013, pp.13-18) estableció una concentración de 0.67  $\mu\text{mol de trolox/ 100 g}$  de miel de prado con un mm Pfund de 34.22 y 0.22  $\mu\text{mol de trolox/ 100 g}$  de miel de prado. Aunque los estudios realizados en caracterización físico-química de miel denotan que la miel monofloral de nabo no es fresca podemos ver que aun cumple con su actividad antioxidante.

#### 5.4.2 Peroxidación Lipídica



*Figura 6.* Resultado del  $\text{IC}_{50}$  (mg/ml) para la determinación de peroxidación lipídica mediante el uso de TBARS en miel de nabo y miel artificial.

Otra forma de determinar la capacidad antioxidante de la miel es mediante el método de peroxidación lipídica proceso que ocurre de forma in vivo en el cuerpo y puede ser reproducido gracias al método de TBARS de forma in vitro.

La formación de radicales libres en el organismo de humanos y animales son los causantes de la mayor cantidad de enfermedades degenerativas como es el cáncer (Álvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86). El ácido tiobarbitúrico (TBA) se utiliza para determinar la degradación oxidativa de los lípidos ya que forma un complejo, el cual interactúa con el TBA y se torna de una coloración rosa para luego ser cuantificado por espectrofotometría (Álvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86). Como se puede apreciar en la Figura 6 los resultados para miel de nabo parten de una solución madre de 140 mg/ml. Mediante la determinación de la concentración de miel que provoca un 50% de inhibición de la formación máxima de TBARS en membranas (IC50), se obtuvo una concentración de 24,42 mg/m para miel de Nabo. Es decir que este tipo de miel tiene acción protectora en los lípidos de las membranas al ser sometida a un estrés oxidativo. Aunque los estudios en miel de Nabo son escasos podemos asociar los resultados al contenido de compuestos bioactivos, principalmente a los compuestos fenólicos como los flavonoides, ácidos cafeícos, ferúlicos, p-cumárico, ácido cinámico, entre otros (Álvarez-Suarez J. M., 2017, pp. 83-86). Todos estos compuestos interactúan entre sí, y en conjunto con los aminoácidos libres y  $\beta$ -carotenos son los encargados de la defensa oxidativa. Cabe destacar, que algunos de estos compuestos son de naturaleza lipofílica, logrando una acción a diversos niveles celulares (Álvarez-Suarez, 2017, pp. 83-86). (Álvarez-Suarez J., et al (2012, pp. 31-38) realizó un ensayo similar de peroxidación, en donde se determinó que el efecto inhibitor de la miel es dependiente de la concentración de esta. Además, se fijó la concentración mínima inhibitoria (IC50) de formación de TBARS en tejidos. Estableciendo que las mieles monoflorales cubanas analizadas mantuvieron efectos protectores a diferencia del control que fue la miel artificial. La miel descrita como vid navideña fue la menos efectiva, ya que obtuvo una concentración inhibitoria (IC50) de 9,94 mg/ml en un homogenizado de hígado de rata sometido a estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno, esta miel fue clasificada por Álvarez-Suarez, et al (2010, pp. 9817-9823) como una miel clara. No obstante, la miel de nabo obtuvo una mayor concentración de inhibición, aunque se describe

como miel clara, existe una diferencia en su origen floral y por ende en factores ambientales lo que provoca variaciones en el análisis del producto.

## 5.5 Capacidad Antimicrobiana

### 5.5.1 Determinación de contenido de peróxido de hidrogeno en miel

Tabla 9.

*Resultado del contenido de peróxido de hidrógeno en miel de nabo.*

Tipo de miel	Resultado de peróxido de hidrógeno
Miel de monofloral de Nabo (ug H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / kg de miel)	1431,42 ± 328,35

La acción del peróxido de hidrógeno en miel se disminuye cuando se encuentra a altas temperaturas (entre 55°C y 70°C) o lugares con elevada exposición de luz (Rivadeneira, 2016, pp. 11-12). En la Tabla 9, se puede apreciar la concentración que se obtuvo de peróxido de hidrógeno en miel de Nabo mediante el ensayo de FOX-1. La misma prueba fue llevada a cabo por Li, et al (2017, pp. 225-237) en algunas muestras de miel monofloral entre ellas miel de *Brassica campestris*, la cual arrojó un rango de concentración de 957,55-3514,60 ug H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/kg de miel. Aunque el valor que se obtuvo de Nabo (*Brassica rapa*) es menor al descrito por el autor, esto se debe a que existen diferencias entre las especies, así como su origen geográfico. Entre los factores que Li, et al (2017, pp. 225-237) describe para el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en miel se encuentra que la dieta de la abeja debe ser rica en diversas especies vegetales y un adecuado desarrollo de sus glándulas hipofaringea que son las encargadas de sintetizar la enzima gluco-oxidasa.

### 5.5.2 Inhibición de la miel en la formación de biopelícula y eliminación de la biopelícula preformada.

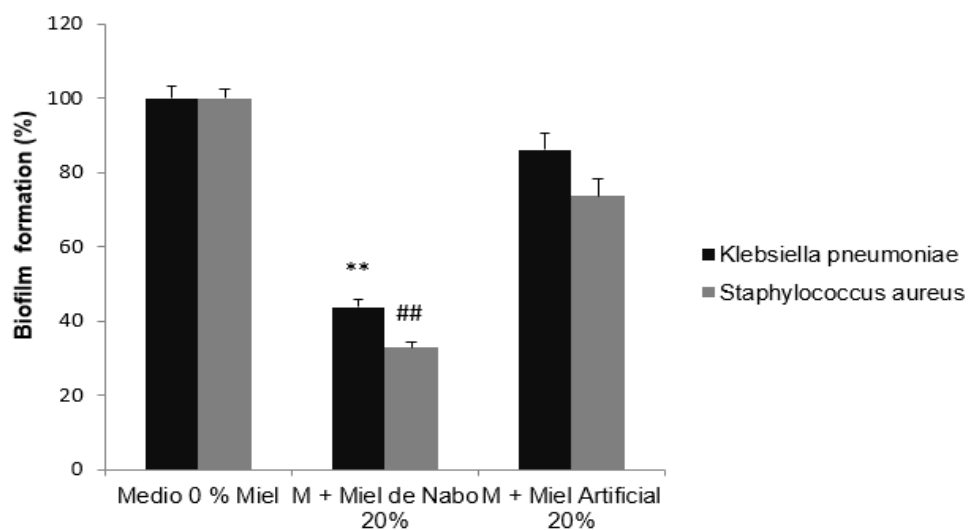


Figura 7. Porcentaje de formación de biofilm *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

Nota: \*\*p<0.05, ## p<0.01

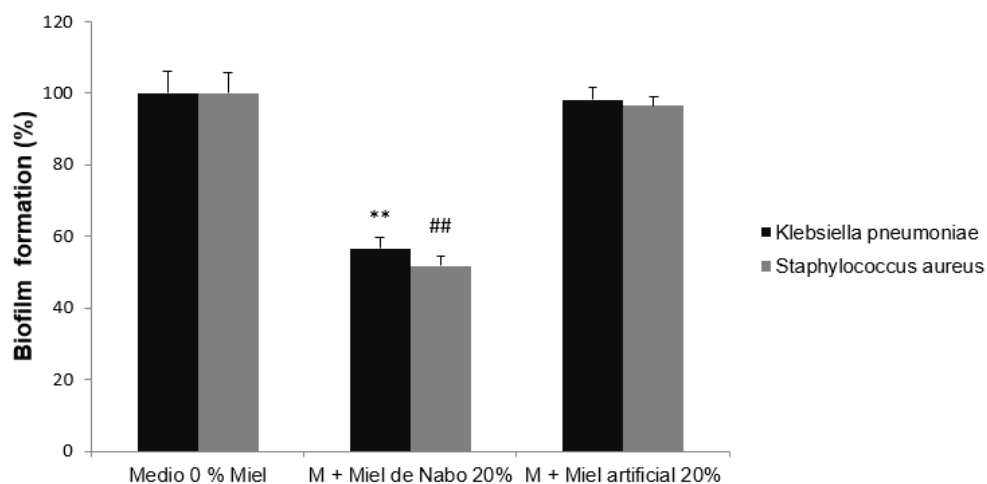


Figura 8. Capacidad de la miel de eliminar la biopelícula preformada de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

Nota: \*\*p<0.05, ## p<0.01

Parte del estudio del efecto de inhibición de la miel fue la formación de biopelícula y la eliminación de la biopelícula preformada, para ambos se utilizaron las mismas cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativa).

En la Figura 7, se puede apreciar que el medio de cultivo sin adiciones obtuvo el mayor porcentaje de formación de biofilm (100 %), considerándolo como nuestro control positivo. El medio con la adición del 20% de miel de nabo obtuvo una menor formación de biofilm con un 43,67% para *Klebsiella pneumoniae* y 32,81 % para *Staphylococcus aureus*; Por otro lado, el medio con la adición del 20% de miel artificial obtuvo un 86,2% para para *Klebsiella pneumoniae* y 73,5% para *Staphylococcus aureus*. En cambio, en la Figura 8, se obtuvo como resultado que el medio adicionado con 20% de miel artificial, no es capaz de eliminar la biopelícula preformada ya que obtuvo un porcentaje de 98% de formación de masa de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* y 96,50% para *Staphylococcus aureus*. No obstante, la miel de nabo en un 20% a diferencia que el control, en el medio obtuvo un porcentaje de formación de masa de 56,67% y 51,81% respectivamente. Esto quiere decir que la miel de nabo tiene un porcentaje de actividad antimicrobiana favorable para estas cepas. Alvarez-Suarez, et al (2010) detalla que en su artículo de actividad antimicrobiana para diversas mieles monoflorales todas tienen acción inhibitoria frente a bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*; mientras que en bacterias Gram negativas se describe *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, la miel con menor porcentaje de inhibición fue la miel de vid navideña. Ahora bien, Rivadeneira (2016, pp.34-39) realizó un estudio antimicrobiano en miel monofloral de Nabo de Ecuador, en él se describe las cepas bacterianas en donde causa una acción inhibitoria, entre las cepas descritas se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, expresando que a mayor concentración mayor es su efecto inhibitorio. Vale destacar, que estudios realizados por Lu, et al (2014) en mieles de Manuka también ejercen inhibición en *Staphylococcus aureus*, aseverando

que esta cepa bacteria es la más sensible a la acción que ejerce la miel. Los únicos compuestos de la miel relacionados con la eliminación de bacterias son el pH, la osmolaridad, peróxido de hidrogeno y compuestos fenólicos; además, de su origen floral (Rivadeneira, 2016,pp. 11-12).



## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

Se logró determinar que la miel se clasifica como monofloral ya que contiene más del 40% de granos de polen de Nabo (*Brassica napus*).

Los resultados obtenidos en la caracterización tanto físico—química como de compuestos bioactivos y análisis antioxidante nos demuestra que la miel adquiere las propiedades de la especie vegetal de la que proviene.

La miel monofloral de Nabo es capaz de inhibir la acción de los radicales libres, sin embargo, esta capacidad es mínima a diferencia de otros tipos de miel monofloral, esto se debe a que las mieles claras son menos eficientes en este tipo de propiedad.

La miel de nabo puede inhibir en un porcentaje considerable bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, confirmando su posible uso como producto natural antibacteriano, pudiendo competir con productos sintéticos que cumplen su misma función.

### 6.2 Recomendaciones

Las malas prácticas de manufactura desde el momento de la recolección de la miel hasta su posterior venta al público alteran considerablemente las propiedades de esta. Se recomienda que para los estudios de calidad la miel debe ser fresca y de cosechas de no más de 6 meses.

Es indispensable realizar el análisis polínico de la miel y comparar con el polen de la flor para confirmar el origen vegetal.

Para los análisis se debe utilizar la miel de la misma cosecha, es decir que provengan del mismo tiempo de maduración.

## REFERENCIAS

- Acquarone, C. (2004). Parámetros fisicoquímicos de mieles, relación entre los mismos y su aplicación potencial para la determinación del origen botánico y/o geográfico de mieles argentinas. Universidad de Belgrano. Recuperado el 02 de Octubre del 2017 de [http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/19\\_acquarone.PDF](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/19_acquarone.PDF).
- Álvarez Mesías, J., & Sánchez Casamen, E. (2016). Estudio de las propiedades físico-químicas y biológicas en cinco mieles de abeja (*Apis mellifera*. L.) distribuidas en la red de supermercados del Distrito Metropolitano de Quito. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana. Recuperado el 22 de septiembre del 2017 de <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13532>.
- Alvarez-Suarez, J. M. (2017). *Bee Products-Chemical and Biological Properties*. Springer. Recuperado el 05 de noviembre del 2017 de <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-59689-1>
- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Fattorini, D., Regoli, F., & Battino, M. (2012). *Radical-scavenging activity, protective effect against lipid peroxidation and mineral contents of monofloral Cuban honeys*. *Plant foods for human nutrition*, 31-38. Recuperado el 20 de septiembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-011-0268-7>.
- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., Cordero, M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L., & Varela-Lopez, A. (2016). *Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing*. *Journal of Functional Foods*, 38-49. Recuperado el 22 de julio del 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616301220>.
- Alvarez-Suarez, J., González Paramás, A., Santos-Buelga, C., & Battino, M. (2010). *Antioxidant Characterization of Native Monofloral Cuban Honeys*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*, 9824-9817. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf1018164>.
- Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., & Battino, M. (2009). *Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review*. *Current*

Analytical Chemistry, 293-302.  
<https://doi.org/10.2174/157341109789077768>

- Andrade, P., Ferreres, F., & Amaral, M. (1997). *Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization*. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2281-2288.<https://doi.org/10.1080/10826079708006563>.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea, 161-172.<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>
- Blanco, J., Trama, A., & Libonatti, C. (2016). Caracterización físico-química y polínica de mieles procedentes de una fraccionadora bonaerense. Recuperado el 12 de agosto del 2017 de <http://ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/779/BLANCO%20JOSEFINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Bogdanov, S. (2002). *Harmonised methods of the international honey commission*. Swiss Bee Research Centre. Recuperado el 02 de Julio del 2017 de [http://www.terezinka.cz/vcely/Med/IHCmethods\\_e.pdf](http://www.terezinka.cz/vcely/Med/IHCmethods_e.pdf).
- Bueno-Costa, F., Zambiasi, R., Bohmer, B., Chaves, F., da Silva, W., Zanusco, J., & Dutra, I. (2016). *Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil*. LWT-Food Science and Technology, 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.018>.
- Cabrera, J. (2012). La Apicultura en el Ecuador: Antecedentes Históricos. Pichincha, Ecuador. Recuperado el 10 de octubre del 2017 de <https://se148c6884df32392.jimcontent.com/.../Apiterapia%20en%20Ecuador.pdf>
- Ciappini, M. C. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. Revista de Ciencia y Tecnología, (19), 45-41. Recuperado el 15 de diciembre del 2017 de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872013000100007](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872013000100007)
- Córdova-Córdova, C., Ramírez-Arriaga, E., Martíñez-Hernández, E., & Zaldívar-Cruz, J. M. (2013). Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera* L.) de cuatro regiones del estado de Tabasco, México, mediante técnicas melisopalinológicas. Universidad y Ciencia, 163-178. Recuperado el 13 de enero del 2018 de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018629792013000200006&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018629792013000200006&script=sci_arttext&tlng=pt)

- Doi, E., Shibata, D., & Matoba, T. (1981). *Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay*. *Analytical Biochemistry*, 173–184. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90175-5).
- Gorjanović, S. Ž.-S. (2013). *Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), 13-18. Recuperado el 22 de junio del 2017 de [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44057166/Comparative\\_analysis\\_of\\_antioxidant\\_acti20160324-18995-zl228d.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=120282784&Signature=JsKL0eGj8u6Oyl5LrCPObiGBYsc%3D&response-contentdisposition=inline%3B%20filename%3DComparative\\_analysis\\_of\\_antioxidant\\_acti.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44057166/Comparative_analysis_of_antioxidant_acti20160324-18995-zl228d.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=120282784&Signature=JsKL0eGj8u6Oyl5LrCPObiGBYsc%3D&response-contentdisposition=inline%3B%20filename%3DComparative_analysis_of_antioxidant_acti.pdf)
- Gutiérrez Pallo, D. S. (2016). *Relación estadística de las propiedades químicas, físicas y microbiológicas de tres muestras de mieles (Apis mellifera. L.) comerciales, distribuidas en supermercados del distrito metropolitano de Quito (Bachelor's thesis)*. Recuperado el 17 de agosto del 2017 de <https://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13244/1/UPS-QT11176.pdf>.
- Gutiérrez, M. B., Rodríguez-Malavaer, A., & Vit, P. (2008). *Miel de abejas: Una fuente de Antioxidantes*. *Revista Fuerza Farmacéutica*, 1-5. Recuperado el 11 de diciembre del 2017 de [www.nutricionhospitalaria.com/pdf/9312.pdf](http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/9312.pdf).
- Hanahan, D., & Ekholm, J. (1974). *The preparation of red cell ghosts (membranes)*. *Methods in enzymology*, 168-172. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)31018-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)31018-X).
- International Honey Commission. (2002). *Harmonised methods of the International honey commission*. Swiss Bee Research Centre, 61. Recuperado el 02 de julio del 2017 de [http://www.terezinka.cz/vcely/Med/IHCmethods\\_e.pdf](http://www.terezinka.cz/vcely/Med/IHCmethods_e.pdf).
- Jáuregui, A. M., Ureta, C. A.-O., Blasco, T. B., Castañeda, B. C., Quiroz, J. R., & Yarasca, Á. A. (2014). *Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 287-297. Recuperado el 18 de octubre del 2017 de

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2014000400008&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2014000400008&script=sci_arttext&tlng=en)

- León, K. J. (2015). Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. *Methods*, 10,, 178-182. Recuperado el 02 de enero del 2018 de [http://biblioteca.uniss.edu.cu/sites/default/files/CD/Yayabociencia%202015/documentos/6-Prod\\_Sostenible/3Ken%20Jact%20Fern%C3%A1ndez%20Le%C3%B3n.pdf](http://biblioteca.uniss.edu.cu/sites/default/files/CD/Yayabociencia%202015/documentos/6-Prod_Sostenible/3Ken%20Jact%20Fern%C3%A1ndez%20Le%C3%B3n.pdf).
- 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*,, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.065>
- Louveaux J, A. M. (1978). *Methods of Melissopalynology.* *Bee World*, 139-157. Recuperado el 19 de octubre del 2017 de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1978.11097714>.
- Lu, J., Turnbull, L., Burke, C., Liu, M., Carter, D., Scholothauer, R., & Harry, E. (2014). *Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by Staphylococcus aureus strains with different biofilm-forming abilities.* <https://doi.org/10.7717/peerj.326>.
- Maradiaga Pineda, D. (2005). Caracterización físico-química y microbiológica de miel de abeja de cinco departamentos de Honduras . 2-72. Zamorano:Escuela Agrícola Panamericana. Recuperado el 09 de Junio del 2017 de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1074/1/AGI-2005-T016.pdf>
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 5-14. Recuperado el 22 de septiembre del 2017 de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222000000100001](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000100001)
- Mexicana, N. (1997). NMX-F-036-1997. Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba. Recuperado el 15 de enero del 2018 de <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-036-1981.PDF>.
- Montenegro, G., Santander, F., Jara, C., Nuñez, G., & Fredes, C. (2013). Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de*

Plantas Medicinales y Aromáticas, 69-87. Recuperado el 05 de agosto del 2017 de <http://www.redalyc.org/html/856/85626383003/>.

- Montenegro, S., Avallone, C., Crazov, A., & Aztarbe, M. (2005). Variación del color en miel de abejas (*Apis melifera*). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2005. Recuperado el 27 de septiembre del 2017 de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/7-Tecnologia/T-070.pdf>
- Montero, M. (1996). Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *Anales de la Facultad de Medicina*, 278-281. Recuperado el 08 de octubre del 2017 de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/viewFile/4897/3962>.
- Morales Vázquez, R. C. (2016). Morales Vázquez, R. C. (2016). Determinación de los parámetros físico-químicos para evaluar la calidad de la miel de abejas comercializada en la ciudad de Cuenca, según norma Nte Inen 1572" (Master's thesis, Universidad del Azuay). <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/5469>.
- Muirragui Almeida, B. (2013). Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de canola (*Brassica napus*) en Aloasí-Mejía-Pichincha (Bachelor's thesis, Quito, 2013.). <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2481>.
- Muñoz, O. C. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*, 848-851. Recuperado el 04 de agosto del 2017 de <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n4/a17v30n4>.
- Navarro, M. V. (2015). Determinación de hidroximetilfurfural en mieles como parámetro indicador de la calidad de las mismas. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*. Recuperado el 16 de diciembre del 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5122454>.
- Oddo, L., Piro, R., Bruneau, É., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., & Von der Ohe, W. (2004). *Main European unifloral honeys: descriptive sheets*. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38-S81. Recuperado el 10 de enero del 2018 de <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2004/06/MHS06.pdf>

- Olivier, P. V. (2006). Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *MedULA*, 89-95. Recuperado el 10 de enero del 2018 de <http://www.ihc-platform.net/necesidadcontroldecalidad2006medula.pdf>.
- Pascual Quishpe, M. M. (2015). Efecto de tres niveles de abono líquido orgánico en la producción del cultivo de nabo *Brassica napus* a campo abierto en el municipio de Achocalla (Doctoral dissertation). La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de agronomía. Recuperado el 12 de septiembre del 2017 de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?!sisScript=cidab.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=020732>.
- Pérez, H. &. (2015). Análisis comparativo de la calidad fisicoquímica, microbiológica y organoléptica de la miel de abeja (*Apis mellifera*) producida en diferentes regiones de Perú. *Revista de Investigación Universitaria*, 1(1). Recuperado el 05 de diciembre del 2017 de <http://revistascientificas.upeu.edu.pe/index.php/riu/article/view/5>
- Piccirillo, G., Rodríguez, B., & Ojeda de Rodríguez, G. (1998). Estudio de algunos parámetros físicoquímicos en mieles cosechadas durante la época seca de ocho zonas apícolas del Estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 486-497. Recuperado el 12 de septiembre del 2017 de <http://200.74.222.178/index.php/agronomia/article/viewFile/11771/11761>.
- Rivadeneira, M. B. (2016). Estudio de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la miel de abeja (*Apis mellifera*) como tratamiento de infecciones causadas por *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida tropicalis* y *Aspergillus brasiliensis*. Pichincha, Quito: Universidad de las Américas. Recuperado el 22 de junio del 2017 de <http://200.24.220.94/bitstream/33000/5385/5/UDLA-EC-TMVZ-2016-15.pdf>.
- Romero, B. A. (2012). Caracterización química y evaluación de las actividades antioxidante y antimicrobiana de mieles florales: Naranja, Cactáceas y Campanilla. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro. Recuperado el 15 de septiembre del 2017 de <http://ri.uaq.mx/handle/123456789/690>.
- Salazar, L. A., Medina, F., Donoso, F., Barrientos, L., & Sanhueza, A. (2009). Acción antimicrobiana in vitro de la miel de abejas sobre los microorganismos cariogénicos estreptococos del grupo mutans. *International Journal of Morphology*, 77-82. Recuperado el 02 de octubre

del 2017 de [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-95022009000100014&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-95022009000100014&script=sci_arttext).

Sanz Cervera, S., & Sanz Cervera, M. M. (1994). Índice de Diastasas y contenido en Hidroximetilfurfural en las mieles de la Rioja. 181-191. Recuperado el 18 de diciembre del 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/110290.pdf>.

Stawiarz, E. (2008). *Pollen spectrum of rapeseed honey from the Sandomierska Upland area*. Journal of Apicultural Science, 83-91. Recuperado el 20 de enero del 2018 de <http://www.jas.org.pl/pdf/167.pdf>.

Subovsky, M. J., Sosa López, Á., Castillo, A., & Cano, N. (2004). Evaluación del contenido de Hidroximetilfurfural en mieles del Nordeste Argentino. Agrotecnia, 32-33. Recuperado el 20 de agosto del 2017 de <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/agr/article/view/454>.

Ulloa, J. A., Mondragón, P., Rodríguez, R., Résendiz, J. A., & Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. Recuperado el 19 de junio del 2017 de <http://dspace.uan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/437/La%20miel%20de%20abeja%20y%20su%20importancia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Velásquez Guanín, D. K. (2017). Estudio comparativo entre una miel artificial y marcas comerciales de miel de abeja expandidas en los mercados del sur del Distrito Metropolitano de Quito empleando parámetros físico-químicos de acuerdo a la norma INEN 1572 - 1988. Trabajo de investigación previo a la obtención del Título de Química de Alimentos. Carrera de Química de Alimentos. Quito: UCE., 84. Recuperado el 13 de septiembre del 2017 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10020>.

Vit, P., Gutiérrez, M. G., Titera, D., Bednar, M., & Rodríguez-Malaver, J. (2008). Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante. Bioquímica Clínica Latinoamericana, 237-244. Recuperado el 28 de diciembre del 2017 de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572008000200009&script=sci\\_arttext&tIng=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572008000200009&script=sci_arttext&tIng=en).

Zandamela Mungói, E. (2008). Caracterización Físico-Química y Evaluación sanitaria de la miel de mozambique. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado el 28 de diciembre del 2017 de <https://ddd.uab.cat/record/38323>.



