



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIMICROBIANAS Y
SU RELACIÓN CON EL ORIGEN FLORAL DE MIELES ESPECÍFICAS
DE LA REGIÓN ANDINA DE ECUADOR

Autora

Marilyn Mishelle García Tenesaca

Año
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIMICROBIANAS Y
SU RELACIÓN CON EL ORIGEN FLORAL DE MIELES ESPECÍFICAS DE LA
REGIÓN ANDINA DE ECUADOR

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

Profesor guía

Ph.D. José Miguel Álvarez Suárez

Autora

Marilyn Mishelle García Tenesaca

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el presente trabajo, Estudio de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su relación con el origen floral de mieles específicas de la región andina, a través de reuniones periódicas con la estudiante Marilyn Mishelle García Tenesaca, 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 Álvarez Suárez
Doctor en Alimentación y Salud
CC: 1756653372

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Estudio de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su relación con el origen floral de mieles específicas de la región andina, del estudiante Marilyn Mishelle García Tenesaca, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas
CC: 1718092701

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

Marilyn Mishelle García Tenesaca

CC: 1722237870

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Maritza y Holger por darme la oportunidad de estudiar; a mis hermanos y novio, Kelly, Andrés y Mikel, los cuales han sido mi apoyo moral incondicional; a mis compañeros Mabel, Leonardo, Jonathan y Christopher por su gran amistad y apoyo en el transcurso de la carrera. A aquellos que forman parte el Centro de Investigación UDLA, Irina, Genoveba, Gabriel que de alguna manera permitieron también posible desarrollar este proyecto.

Mis sinceros agradecimientos al PhD José Miguel Álvarez, ya que sin su apoyo, orientación y conocimiento este proyecto no se podría haber llevado a cabo.

RESUMEN

Durante muchos años, la miel ha sido utilizada en varias aplicaciones medicinales. Gracias a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que posee la miel, ha sido posible tratar varias afecciones como heridas o infecciones. El objetivo del presente estudio fue determinar la composición química, propiedades antioxidantes y antimicrobianas de dos tipos de mieles pertenecientes a la región andina de Ecuador, y su relación con el origen floral. Se analizaron parámetros físico-químicos tales como: color, pH, humedad, índice de diastasa, hidroximetilfurfural, conductividad eléctrica y contenido de cenizas. Dentro de los compuestos bioactivos se analizó la composición polifenólica, contenido total de aminoácidos, carotenoides y flavonoides. La capacidad antioxidante total de las mieles fue estudiada según la capacidad de reducción y captación de radicales libres, y también por la capacidad de protección de membranas lipídicas de glóbulos rojos humanos contra la peroxidación lipídica. Los resultados del estudio permitieron clasificar a las mieles como monoflorales para aguacate y eucalipto según el análisis del contenido polínico. Ambas mieles presentaron valores físico-químicos dentro del rango establecido por normativas internacionales de calidad para mieles tropicales. El contenido de compuestos bioactivos varió de forma significativa según el origen botánico, en donde los valores más altos fueron encontrados en la miel de aguacate (miel ámbar oscuro). Estos valores se correlacionaron con la capacidad antioxidante total y capacidad de protección frente a la peroxidación lipídica, pues las mieles más oscuras (miel de aguacate) presentaron los mayores valores de actividad antioxidante y una alta capacidad de protección frente a la peroxidación lipídica, en comparación con la miel de Eucalipto. Asimismo, la miel de aguacate presentó una mayor inhibición de biopelícula preformada e inhibición de formación de biopelícula usando dos cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* CAMP y *Klebsiella pneumoniae* KPC 609803), con respecto a las mieles claras (Miel de eucalipto) que presentaron una menor inhibición. De esta forma, se encontró una correlación positiva entre la composición polifenólica vs. color vs. capacidad antioxidante total vs. capacidad antimicrobiana. El estudio realizado permitió demostrar que las mieles

son una fuente natural rica en compuestos bioactivos con propiedades biológicas con importancia medicinal.

ABSTRACT

For many years, honey has been used for several medicinal applications. Due to the antioxidant and antimicrobial properties of honey, it has been possible to treat several conditions such as wounds or infections. The aim of the present study was to determine the chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of two types of honeys belonging to the Andean region of Ecuador and its relationship with floral origin. Its physical-chemical parameters were analyzed, such as: color, pH, humidity, diastase index, hydroxymethylfurfural, electrical conductivity and ash content. Within the bioactive compounds, the polyphenolic composition, total content of amino acids, carotenoids and flavonoids were analyzed. The total antioxidant capacity of honey bee was studied according to the reduction capacity and free radicals uptake, and also for the protection capacity of lipid membranes of human red blood cells against lipid peroxidation. The results of the study allowed to classify honey as monofloral for avocado and eucalyptus according to the pollen content analysis. Both honeys presented physical-chemical values within the range established by international quality standards for tropical honeys. The content of bioactive compounds varied significantly according to the floral origin, where the highest values were found in avocado honey (dark amber honey). These values correlated with the total antioxidant capacity and protection capacity against lipid peroxidation, since darker honeys (avocado honey) showed the highest values of antioxidant activity and a high protection capacity against lipid peroxidation compared to eucalyptus honey. Likewise, avocado honey showed greater inhibition of preformed biofilm and inhibition of biofilm formation using two bacterial strains (*Staphylococcus aureus* CAMP and *Klebsiella pneumoniae* KPC 609803) with respect to clear honeys (eucalyptus honey) that showed less inhibition. In this way, a positive correlation was found between the polyphenolic composition vs. color vs. total antioxidant capacity vs. antimicrobial capacity. The study made it possible to demonstrate that honeys are a natural source rich in bioactive compounds with biological properties of great medicinal importance.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.3. Objetivo General	4
1.4. Objetivos específicos	4
1.5. Justificación del trabajo.....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Miel de abeja.....	6
2.1.1 Características generales	6
2.1.2 Propiedades Físico- Químicas de la miel.....	9
2.1.3. Composición química.....	16
2.1.4. Propiedades Biológicas	24
2.2. Producción de miel en el Ecuador	28
2.3. Importancia económica.....	29
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	31
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	32
4.1. Población y muestra	32
4.2. Análisis de origen floral- extracción de polen de miel.....	32
4.2. Caracterización Físico- Química.....	33
4.2.1. Determinación de color en miel	33
4.2.2. Análisis de pH en miel	33
4.2.3. Determinación de la conductividad eléctrica.....	33
4.2.4. Determinación de la actividad de la enzima diastasa en miel	34
4.2.5. Determinación del contenido de Hidroximetilfurfural (HMF).....	34
4.2.6. Determinación de aminoácidos libres	35
4.2.7. Determinación del contenido de humedad.....	36
4.2.8. Determinación del porcentaje de cenizas	36

4.3. Determinación de compuestos bioactivos	37
4.3.1. Determinación de flavonoides.....	37
4.3.2. Determinación de fenoles totales.....	37
4.3.3. Determinación Total de carotenoides	38
4.3.4. Análisis de polifenoles por HPLC-DAD	38
4.4. Determinación de la capacidad antioxidante	40
4.4.1. Capacidad reductora-método FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro).....	40
4.4.2. Capacidad de captar radicales libres- Método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	41
4.4.3. Efecto protector de la miel de abeja contra la peroxidación lipídica- Método TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)	41
4.5. Capacidad antimicrobiana	44
4.5.1. Determinación de Peróxido de hidrógeno en miel	44
4.5.2. Efecto antibacteriano de miel en Biopelículas	44
4.6. Análisis estadístico de resultados.....	46
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1. Caracterización físico-química.....	46
5.2. Determinación de compuestos bioactivos	51
5.3. Determinación de Polifenoles por HPLC	53
5.4. Determinación de la capacidad antioxidante total	55
5.5. Capacidad de protección de la miel contra la peroxidación lipídica.....	57
5.6. Capacidad antimicrobiana de la miel	58
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
6.1. Conclusiones	62
6.2. Recomendaciones	62
REFERENCIAS	63

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La miel, una sustancia natural de consistencia viscosa y de sabor dulce, posee diversos beneficios de los que se tiene conocimiento desde hace miles de años, y la cual se ha usado desde la antigüedad por su alto valor nutritivo y medicinal, además de ser el único edulcorante disponible hasta la aparición del azúcar industrial (Alvarez-Suárez et al, 2010). Los primeros reportes del uso de la miel por el hombre datan de hace unos 6000 años a.C. y su empleo como medicina natural desde el año 2500 a.C.(Rodríguez, 2014, pp.6,14).

La composición química de la miel es muy variable y depende de varios factores como los tipos de flores que visitan las abejas en su acción de pecoreo, así como también, de las condiciones climáticas y de la región geográfica donde se producen cada una de ellas. La miel de abeja contiene alrededor de 181 sustancias; se trata de una solución con alto contenido de azúcares, minerales, aminoácidos libres, proteínas, vitaminas y enzimas (Álvarez-Suárez et al., 2010b). Además, dentro de los componentes de la miel, los polifenoles constituyen un grupo de compuestos de importancia que se encuentran relacionados con sus propiedades funcionales y apariencia. Asimismo, los recientes estudios se han enfocado principalmente en su composición polifenólica, debido al potencial que tienen estos compuestos como marcadores químicos para la identificación botánica y su relación con las propiedades biológicas, sobre todo sus propiedades antioxidantes (Álvarez-Suárez & Giampieri, 2013). Como Álvarez-Suárez *et al* (2010b) ya lo mencionó, en la miel de abeja se han identificado tres grupos de familias de compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos benzoicos y ácidos cinámicos) con grupos en donde predominan los flavonoides (quercetina, crisina, luteolina, entre otros), los cuales determinan distintos perfiles botánicos en la miel de acuerdo al tipo de planta del cual se ha obtenido.

Las propiedades físicas que presenta la miel proveen una barrera protectora que, por su alta osmolaridad, genera un ambiente propicio para inhibir el crecimiento bacteriano y estimular la cicatrización al reducir la inflamación y la formación de exudados, de manera más efectiva que muchos de los tratamientos convencionales (Alvarez-Suárez et al, 2010b).

Otras propiedades que distinguen a la miel sobre otros productos naturales son su capacidad antioxidante y efecto antibacteriano. Esto permite la reducción de altas concentraciones de compuestos que provocan el daño oxidativo a los tejidos, como las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hadagali y Chua, 2014; Oryan et al., 2016). Varios ensayos clínicos han demostrado la reducción de síntomas de inflamación después de aplicar la miel sobre heridas, disminuyendo el edema y exudado (Calderón et al, 2015; Hadagali & Chua, 2014; Oryan et al., 2016; Yaghoobi y Kazerouni, 2013). Es así que, la capacidad de favorecer la cicatrización de heridas se ha asociado a un mecanismo que permite la estimulación de la respuesta antioxidante de las células epiteliales, y la protección frente al daño inducido por estrés oxidativo. El efecto de regenerar heridas que proporciona la miel se debe tanto a su capacidad antioxidante como de la capacidad antibacteriana y compuestos bioactivos que posee (Hadagali y Chua, 2014, pp. 1003-1014).

1.2. Planteamiento del problema

Los procesos de respiración celular en la mitocondria de las células animales resultan imprescindibles para la producción de energía, que luego será utilizada en las actividades metabólicas de la célula. Sin embargo, cuando este proceso se altera, en la mayoría de los casos aumenta el contenido de radicales libres intracelulares producidos por la mitocondria, los que resultan dañinos para las macromoléculas celulares y en consecuencia alteran el funcionamiento de la célula. El efecto nocivo de los radicales libres en los distintos sistemas biológicos se conoce como estrés oxidativo, y está determinado por una disminución de las

respuestas antioxidantes celulares contra el aumento de las especies reactivas del oxígeno (Kumul et al., 2015).

El daño oxidativo causado a las biomoléculas, provoca el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades y procesos patológicos como la inflamación, problemas inmunitarios, así como el desarrollo de algunos tipos de cáncer y sobre todo alteraciones en los vasos del sistema circulatorio (Kumul et al., 2015). Cabe mencionar además, que la inflamación desencadena una serie de procesos patológicos, como la deficiente activación de macrófagos y la patogénesis de enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes, artritis reumatoides o la aterosclerosis (Gasparrini et al., 2017, pp.4-5).

Por otro lado, el uso excesivo e indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de infecciones, el mal uso de los mismos, el empleo no controlado de antibióticos en la producción industrializada de los alimentos de origen cárnico así como la mala automedicación por la población, han hecho que se produzca resistencia bacteriana, y con ello daños colaterales en el organismo (OMS, 2017). Además, cabe mencionar que los altos costos de estos medicamentos están en constante ascenso. Es así que, se evidencia la necesidad de buscar terapias alternativas de bajo costo y más asequibles, que permitan paliar esta situación. Por lo tanto, los productos naturales son candidatos importantes. Dentro de los productos naturales, la miel de abeja ha sido utilizada desde tiempos remotos en el tratamiento de heridas, infecciones y ciertas enfermedades tanto por su poder antioxidante, antibacteriano como por su capacidad antiinflamatoria. En los últimos años se ha prestado atención al posible uso terapéutico de la miel en el tratamiento de afecciones relacionadas con el daño oxidativo, e incluso capaz de evitar la resistencia bacteriana debido a que se ha demostrado que es una fuente rica en compuestos bioactivos con propiedades prometedoras para la salud (Alvarez-Suárez, 2017^a, pp.86-89; Hadagali & Chua, 2014).

Ecuador es uno de los países más mega-diversos del mundo, con un potencial melífero que le permite su producción durante todo el año y por lo tanto, aumentar incluso su comercialización, expandirse tanto a nivel nacional como internacional. Sin embargo, se conoce poco sobre la composición química y biológica de las mieles producidas en el país. De esta manera, se requiere llevar a cabo un estudio que permita certificar las propiedades físico-químicas y propiedades biológicas de las principales mieles monoflorales del Ecuador según su origen floral.

1.3. Objetivo General

Determinar la composición química, propiedades antioxidantes y antimicrobianas de mieles específicas de la región andina del Ecuador así como su relación con el origen floral.

1.4. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros físico-químicos de las mieles de estudio.
- Identificar y cuantificar los principales compuestos bioactivos, así como la capacidad antioxidante total de las mieles.
- Determinar la capacidad antimicrobiana de las mieles de estudio.
- Establecer una posible correlación estadística entre los parámetros físico-químicos, el origen floral y la capacidad antioxidante y antimicrobiana.

1.5. Justificación del trabajo

Existen muchos estudios realizados que demuestran la efectividad de la miel, actuando sobre las especies reactivas del oxígeno y su efecto protector contra los daños provocados por el estrés oxidativo. Asimismo, la miel se ha venido utilizando desde tiempo remotos como remedio tradicional para tratar infecciones

microbianas, debido al efecto combinado y sinérgico de los distintos compuestos antioxidantes y propiedades físico-químicas que posee la miel (Cortés *et al.*, 2011; Oryan *et al.*, 2016). No obstante, no se han abordado estudios de las mieles producidas en Ecuador con respecto a su composición química y propiedades biológicas en relación a su origen floral.

Como se ha demostrado previamente, varios estudios han resaltado las potenciales propiedades medicinales de la miel y la opción de reemplazar algunos medicamentos de síntesis química. La utilización de medicamentos de alto costo hace que el acceso a los mismos sea limitado, por lo que se hace necesario buscar alternativas. Por tanto, el empleo de la miel como fuente natural rica en antioxidantes y otros compuestos importantes para el tratamiento de enfermedades, con una considerable prevalencia en el país tales como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares o incluso tratar infecciones microbianas, puede ser una buena opción como alternativa de tratamiento o como tratamiento complementario. De esta forma, se pueden citar varios estudios en donde la miel de Manuka ha demostrado ser un inhibidor de la producción de ROS por células monocíticas (Schencke *et al.*, 2016); la capacidad de la miel de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, su viabilidad y formación de biopelícula (Nassar, Li, & Gregory, 2012); la terapia combinada de la miel de Ulmo (*Eucryphia cordifolia*) y ácido ascórbico para el tratamiento de úlceras venosas lográndose una cicatrización del 100% de las úlceras venosas (Calderon *et al.*, 2015); el efecto combinado de los medicamentos anti-diabéticos con la miel en pacientes con diabetes mellitus, permitiendo un mejor control glucémico y mejorar las defensas antioxidantes (Erejuwa, 2014), entre otros.

Por otra parte, no se han llevado a cabo estudios de la miel para la certificación del origen floral y sus propiedades biológicas, lo que permitiría que dicho producto posea un valor agregado. De esta manera, este estudio repercutiría en

promover la producción nacional, tomando en cuenta las normativas internacionales de calidad, permitiendo así expandir las posibilidades de mercado. Cabe mencionar, que dada la producción en crecimiento que rodea los 910.000 kilos de miel en Ecuador y al precio de comercialización de este producto que fluctúa entre \$5-8/250 ml (Gutiérrez, 2016, p.14), resulta factible su uso para el tratamiento de las distintas enfermedades antes mencionadas, además de que no produce efectos secundarios y es efectiva. Adicionalmente, una de las ventajas de producir miel de abeja es que resulta asequible para cualquier persona, no requiere de ningún tratamiento ni envasado especial, aparte de que su costo es relativamente bajo frente a los beneficios que posee.

La producción de miel está aumentando y, gracias a la diversidad floral que posee Ecuador, su potencial melífero lo hace único, de tal manera, esto permitiría generar un amplio conocimiento acerca de la miel de abeja tanto por región como por periodo del año. Con ello, no solo se beneficiaría el apicultor sino el consumidor también, ya que así se podrá comercializar un producto que certifique la calidad y que demuestre el valor nutricional que posee. Cabe recalcar que la miel no solo se utilizaría en la industria farmacéutica o como medicina alternativa, sino también en las industrias de alimentos y cosméticos.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Miel de abeja

2.1.1 Características generales

De acuerdo a la FAO (2001), la miel se puede definir como una sustancia natural dulce producida por abejas (*Apis sp.*) a partir del néctar de secreciones de partes vivas de plantas. Las abejas recogen esta sustancia, la transforman y combinan con sustancias propias, luego se deposita, deshidrata, almacena y lo colocan en el panal para la maduración y añejo.

El análisis sensorial de la miel de abeja representa una disciplina integrativa que permite establecer la calidad de miel, el origen, apariencia, entre otros, el cual se basa en atributos organolépticos como el color, olor, sabor y textura. Muchas de estas características dependen principalmente de las fuentes nectíferas, es decir, muchos de los distintos cambios con relación a la composición y sabor, están muy relacionados con la región de producción y la acumulación de néctar que haya en cada una (Álvarez-Suárez, 2017a, pp. 22–24).

Gutiérrez (2016, pp. 16–18) hace referencia a la miel de abeja como producto biológico complejo, con una composición físico-química y organoléptica muy variada que depende del origen botánico, del clima o suelo asociado con países que poseen una diversa vegetación.

Las distintas características organolépticas de la miel de abeja determinan el valor nutricional, el origen floral y origen del néctar (Tabla 1).

Tabla 1.

Principales características organolépticas de la miel

Textura	Se encuentra relacionado con el proceso de cristalización de los azúcares que contiene la miel. Según la cantidad de los mismos, estos azúcares son los responsables del grado de fluidez total o parcial.
Aroma	Depende en su mayoría de la cantidad de aminoácidos y ácidos

	que posea según la variedad de vegetación y/o néctar.
Color	Se encuentra relacionado con la proporción de minerales, compuestos fenólicos y el polen que tenga la miel. Se utiliza la escala de Pfund que utiliza 7 tonos de colores para definir el color de las mieles (tonos agua, extra claros, claro, extra ligero ámbar, ligero ámbar, ámbar y oscuro ámbar)
Sabor	Son los azúcares los que principalmente proporcionan el sabor. Es así, que si hay una mayor cantidad de fructosa en la miel, ésta va a ser mucho más dulce que una miel con mayor contenido de glucosa.

Adaptado de (Alvarez-Suárez *et al*, 2017^a, pp. 21-26) y (Ulloa *et al*, 2010, p. 13,14).

Varias de estas características que posee la miel se relacionan con la clase de floración que tengan, ya sea multifloral (varias flores) o monofloral (una sola flor). La miel que es monofloral, se produce por abejas que obtienen el néctar mayoritariamente de un solo tipo de flor y debido a ello la miel se nombra por la flor que predomina, entre ellas están la miel de eucalipto, aguacate, acacia, trébol, etc. Si es polifloral o multifloral, las abejas recolectan el néctar de varias flores sin ninguna preferencia. Se pueden citar la miel del bosque, miel de frutos cítricos, miel del páramo, entre otras.

2.1.2 Propiedades Físico- Químicas de la miel

2.1.2.1 Propiedades físicas

Esta clase de propiedades tiene una gran influencia en la calidad de la miel. Además, son responsables de varias de las propiedades organolépticas y fundamentales para el control de posibles adulteraciones.

Entre las propiedades físicas presentes en la miel se pueden citar las siguientes:

- **Color**

El color de la miel depende de algunos factores, como es el origen floral, la composición del néctar, la temperatura y tiempo de almacenamiento y con el procedimiento de obtención de la miel. Este parámetro es muy importante en el área comercial ya que muchas veces, este determina el precio de la miel de abeja (Gutierrez, 2016, pp.7-8) .

Existen dos tipos de procedimientos para la medición del color: el instrumental y sensorial. Las técnicas instrumentales incluyen métodos en donde se lleva a cabo la medición de la transmitancia o reflectancia de la muestra. Para ello, se emplean equipos como colorímetros triestímulos o espectrofotómetros. Para la medición sensorial se utiliza un grupo de evaluadores entrenados siguiendo normas internacionales de calidad empleando referencias como el Atlas RHS o el Sistema Munsell. Además, dentro de este grupo se incluye un sistema visual, que consiste en la comparación de la muestra en estudio con un prisma coloreado estándar. Para ello, se suele utilizar colorímetros *Pfund* y *Lovibond Comparator*. Actualmente, la técnica estandarizada para medir el color en miel de abeja es la que utiliza un colorímetro *Pfund* (Tabla 2) o *Lovibond* por normas internacionales. En su mayoría se utiliza más la escala *Pfund* (Tabla 2), y la escala de color puede variar según el estado o textura de la miel, ya sea

líquida o cristalizada como se puede observar en la Figura 1 y 2 (Delmoro, Muñoz, Nadal, & Pranzetti, 2010, pp.145-152).

Tabla 2.

Comparación entre el color de miel, mmPFUND y absorbancia

Miel	mmPFUND	Absorbancia
Blanco Agua	0-8	0,104-0,125
Extra Blanco	8-16,5	0,125-0,148
Blanco	16,5-34	0,148-0,195
Ambar Extra Claro	34-50	0,195-0,238
Ambar Claro	50-85	0,238-0,333
Ambar	85-114	0,333-0,411
Oscuro	Más de 114	0,411 o más

Tomado de (Álvarez Suárez, 2017^a, pp. 21-26).



Figura 1. Escala de color para miel líquida.

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



Figura 2. Escala de color para miel cristalizada.

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

- **Conductividad eléctrica**

Este parámetro se encuentra relacionado con la cantidad de sales minerales, proteínas, ácidos orgánicos y posiblemente con ciertos compuestos como polioles o azúcares de la miel, permitiendo además, la estimación del origen (mielada o floral) y con ello conocer la fuente del néctar. De acuerdo a estudios realizados, se ha encontrado una estrecha relación entre la conductividad y el porcentaje de cenizas, por lo que es posible determinar el contenido en sales minerales (Sanz, 1994, pp.143-158).

La conductividad eléctrica de la miel se la puede definir como la conductividad que se mide a 20°C, de una solución de miel en 100 mL de agua destilada y cuyas unidades son mS/cm. Esta técnica se basa en medir la resistencia eléctrica a través de un conductímetro, en donde la conductividad (γ) es el valor recíproco de la resistividad (Norma Chilena NCh3064, 2007).

- **Humedad**

Es una de las propiedades que mayor influencia tiene sobre la viscosidad, peso específico y el sabor, además que cumple un importante papel en la conservación, solubilidad y palatabilidad (Gutierrez, 2016, p.7).

La humedad indica la madurez de la miel. Las abejas toman el néctar con una humedad cercana al 60%. Seguido, el néctar recolectado es secado y transformado por ellas hasta obtener la conocida "miel", la cual acaba con una humedad menor al 20% (CODEX STAN, 2001), como una manera de asegurar la conservación de la misma. Sin embargo, hay estaciones del año como otoño o invierno, en donde al ser la temperatura más baja y los días más cortos, es más complicado obtener las calorías que requieren las abejas

para llevar a cabo todos esos procesos, y por ello, las mieles de estas temporadas contienen más humedad que las de verano, siendo más susceptibles a la fermentación (López, 2014, pp.1-18).

- **Viscosidad**

Esta propiedad está muy relacionada con la temperatura, es decir, la viscosidad disminuye fácilmente cuando se incrementa con la temperatura. Un 1% de humedad equivale a 3.5 °C aproximadamente en su acción sobre la viscosidad (Sanz, 1994, pp.143-158; Zandamela, 2008, p.51).

- **Sólidos insolubles**

Los sólidos insolubles posibles a encontrarse en la miel de abeja son partículas como material vegetal, polen o insectos. Se trata de un parámetro que permite determinar el grado de impurezas que hay en la miel, aunque afecte a ciertas propiedades como la estabilidad, resistencia o textura. Se puede determinar los sólidos insolubles al diluir una cantidad específica de miel, filtrándola por papel filtro, secándola y pesando antes y luego de la filtración. El contenido máximo de sólidos insolubles para la miel de abeja es 0.1g/100 g, con excepción de la miel prensada que se permite hasta un 0.05 g/100 g (CODEX STAN, 2001; Zandamela, 2008, p.39).

2.1.2.2 Propiedades químicas

- **pH**

Este parámetro resulta prioritario cuando se trata de evaluar los alimentos durante su obtención y almacenamiento. Asimismo, el pH puede afectar a algunas propiedades como la resistencia, textura o estabilidad.

El pH de la miel se encuentra entre 3.3 y 4.9 según el origen de la miel(Ulloa et al., 2010, pp.11-18; Zandamela, 2008, pp.37-39).

- **Acidez**

La acidez brinda protección a este producto frente a ataques microbianos. Además, la combinación de la acidez con el peróxido de hidrógeno de la miel permite mejorar su conservación (Zandamela, 2008, pp.37-39).

Los ácidos orgánicos son los responsables de la dulzura de la miel y del bajo pH que posee la misma, los cuales representan alrededor del 0.5% de los sólidos de este producto. Los ácidos de la miel provienen de secreciones de glándulas salivales de las abejas. Existen alrededor de 20 ácidos orgánicos en la miel de abeja: ácido málico, acético, láctico, cítrico, oxálico, succínico, fosfórico, piroglutámico, y glucónico, etc. No obstante, el ácido orgánico que más abunda en la miel de abeja es el ácido glucónico. Este ácido se forma a partir de la glucosa por medio de la acción de la enzima glucosa oxidasa que proviene de las abejas (Gutierrez, 2016, p.9; Zandamela , 2008, pp.37-39).

Se ha encontrado variabilidad en la fracción ácida de la miel. Se pueden distinguir tres tipos: acidez lactónica, libre y total. La relación acidez lactónica/ acidez libre permite dar una mejor conocimiento del origen botánico de la miel, es decir, si es floral o mielada (Zandamela, 2008, pp.37-39).

- **Cenizas**

Este parámetro se relaciona con la conductividad eléctrica, es decir, ambos permiten medir el contenido de sales minerales presentes en las mieles. De

acuerdo a estudios previos, se ha podido correlacionar la conductividad eléctrica de una solución de miel al 20% de materia seca y el contenido de cenizas totales. El porcentaje de cenizas totales presentes en las mieles depende su origen botánico de la miel, por lo que es utilizado también como un criterio de evaluación de la misma (Zandamela, 2008, p.54).

- **Azúcares totales**

Los azúcares que posee la miel constituyen alrededor del 95% al 99% de la materia seca (80-82% del total) y estos se relacionan con el origen botánico. Entre los azúcares que más abundan en la miel está la glucosa y la fructosa. La miel es una solución con alto contenido en azúcares, la cual alcanza el equilibrio cuando se da el proceso de cristalización. Este proceso se debe a la precipitación de los cristales de glucosa y cuyo aumento ocasiona la formación de dos fases en la miel: una fase superior líquida y una fase sólida que contiene los cristales de glucosa (Zandamela, 2008, p.114).

La cristalización puede ser inhibida por la fructosa debido al aumento de la solubilidad de la glucosa de la miel. Por lo general, aquellas que poseen menos del 30% de glucosa suelen cristalizar mucho más lento. Asimismo, las que contienen agua en un porcentaje de 17% pueden granular más rápidamente que las que poseen mayor contenido de agua. Cabe mencionar, que la cristalización de la miel depende de ciertos factores como el porcentaje de humedad, es decir, mieles con menos humedad tienden a cristalizar más rápido; y la temperatura, ya que temperaturas de 10-21°C aceleran la cristalización (López, 2014, pp.1-14; Zandamela, 2008, p.114).

- **Hidroximetilfurfural (HMF)**

La frescura de la miel se puede evaluar mediante dos índices: contenido hidroximetilsulfural y actividad diastásica. El Hidroximetilfurfural es un compuesto que no se encuentra de forma natural en la miel. Es un aldehído cíclico, producto de la deshidratación de la fructosa en medio ácido que se genera más rápidamente a altas temperaturas. Por tanto, se puede decir que está directamente relacionado con el calor al que ha sido sometida la miel. La presencia de este compuesto en la miel, provoca tonalidades oscuras por reacciones de reordenación y polimerización con aminas y azúcares (Zandamela, 2008, pp.57-59).

Se ha determinado que el HMF en mieles aumenta aproximadamente 1 mg/Kg por mes en climas con temperaturas de 30°C. Asimismo, la Comisión Internacional de la Miel y la Organización Mundial de la Salud han establecido que el contenido máximo de HMF es de 40 mg/Kg, con excepción de las mieles de climas tropicales, en donde se puede admitir hasta 80 mg/kg (Ulloa *et al.*, 2010, pp.11-18; Codex Alimentario, 2001).

Se ha demostrado que ciertas propiedades contribuyen a la formación de HMF como la humedad o la acidez, pero principalmente se ha visto que está directamente relacionada con la actividad de la enzima diastasa, de tal forma que si existe un bajo índice de diastasa es porque hay un alto contenido de hidroximetilfurfural (Zandamela, 2008, pp.57-59).

- **Actividad diastásica**

La diastasa o amilasa es una enzima cuya función es la hidrólisis del almidón en glucosa. Esta enzima se encuentra presente de forma natural en las

mieles frescas, cuya actividad disminuye cuando se ha expuesto a la miel a altas temperaturas (Ulloa *et al.*, 2010, pp.11-18; Zandamela, 2008, pp.57-59). Según el Codex alimentario (2001), la actividad de diastasa en la miel no debe ser menor a 8 unidades Schade y en mieles cuyo contenido de enzima natural ya es bajo, no menos de 3.

2.1.3. Composición química

Según el Codex Alimentario (2001), la cantidad de azúcar presente en la miel varía de 80-83%, por lo que se puede considerar como una excelente fuente de energía (304 Kcal/100g). Los azúcares son los responsables de varias propiedades de la miel como las térmicas, viscosidad, higroscopicidad, granulación, entre otras. Además, junto con compuestos minerales y nitrogenados y ciertos ácidos, contribuyen al sabor de la miel.

La miel es un alimento natural principalmente compuesto por azúcares y agua, y en menor cantidad vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Tabla 3). Los monosacáridos presentes en la miel constituyen alrededor del 75% de los azúcares encontrados en la miel, junto con el 10-15% de disacáridos y pequeñas cantidades de otros azúcares (Tabla 4) (Alvarez-Suarez, 2017a). La fructosa y glucosa son los azúcares predominantes en la miel (85-95% del total). El valor medio de la relación fructosa/glucosa es 1,2:1.

Una buena parte de los azúcares no están en el néctar, sino que resultan del almacenamiento y maduración de la miel, además de pasar por procesos enzimáticos y la transformación del néctar. Los distintos tipos de miel poseen los mismos azúcares pero en diferentes concentraciones, cuyo contenido se encuentra relacionado con el origen floral-geográfico. Varios estudios afirman

que la composición de azúcares puede permitir distinguir entre mieles florales, mieladas y mezclas.

Tabla 3.

Composición química de la miel

Constituyentes mayoritarios (%)	Significancia	Desviación estándar	Rango
Fructosa	17.90	3.16	13.21-26.50
Agua	39.44	2.11	37.07-42.65
Glucosa	28.15	5.74	18.20-32.10
Sucrosa	3.19	3.81	0.36-16.57
Otros azúcares	8.5	-	0.1-16.0
Constituyentes minoritarios (%)			
Proteína total	0.36	0.18	0.11-0.72
Minerales	1.13	1.22	0.22-2.93
Ácidos (como ácido glucónico)			0.17- 1.17
Vitaminas, aromas, enzimas	<0.1		
Compuestos fenólicos	0.1		0.02-0.2

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

Tabla 4.

Principales azúcares encontrados en la miel.

Monosacáridos	
Glucosa	
Fructosa	
Disacáridos	
Mayoritarios	Minoritarios
Isomaltosa	Celobiosa
Kojibiosa	Gentiobiosa
Maltosa	Maltulosa
Sucrosa	Nigerosa
Turanosa	Palatinosa
Trisacáridos	
Mayoritarios	Minoritarios
Erlosa	Isomaltotriosa
Teanderosa	Isopanosa
Panosa	Melezitosa
Maltotriosa	Rafinosa

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

Los estudios realizados con relación a las proteínas en la miel son escasos, debido a su presencia en bajas cantidades, a la complicada extracción de ellas de una solución en donde abundan azúcares, y por la complejidad de su caracterización. Técnicas generales como Bradford o Kjeldahl han sido usadas para determinar el contenido proteico en miel, a pesar de que el 40-80% del nitrógeno total está en la fracción de proteínas, y el resto corresponde a los aminoácidos libres (Ulloa *et al.*, 2010, pp.11-18).

Las proteínas presentes en la miel pueden provenir del néctar y del polen floral e incluso de la savia de las plantas, pero frecuentemente suelen derivarse de las secreciones de las glándulas cefálicas de las abejas melíferas, que son las que descomponen mediante el uso de enzimas el polen y el néctar. La concentración media de proteínas de la miel es de aproximadamente 0.2-0.7% con pesos moleculares de 22-75 kDa variando según la especie de abeja, insectos y la fuente vegetal de polen y néctar. El contenido de proteína varía entre 0.1 y 3.3% en miel de *Apis cerana* y, 0.2-1.6% en miel de *Apis mellifera* (Alvarez-Suarez, 2017^a, pp. 21-26).

Gran parte de las proteínas que se encuentra en la miel proveniente de las abejas, en su gran mayoría enzimas que son secretadas por las glándulas hipofaríngeas y salivales de las abejas obreras (Tabla 5). La enzima más abundante es α -glucosidasa (sacarasa o invertasa) pues se encuentra en la glándula hipofaríngea de la abeja, alcanzando el 50% de las proteínas totales de la glándula. En cambio, las enzimas amilasa y glucosa oxidasa representan solo el 2-3%. El contenido de enzimas en la miel puede disminuirse por el calentamiento o almacenamiento prolongado o por el procesamiento de la miel. Es así que, la medición de las actividades de las enzimas puede aportar con información sobre la intensidad del tratamiento térmico y el tiempo de vida media del producto (Álvarez-Suárez, 2017^a, pp.21-26).

Tabla 5.

Principales enzimas en la miel y sus actividades

Enzimas	Actividad
α-Glucosidasa (Invertasa)	Convierte sucrosa en glucosa y fructosa

α- y β- amilasa (Diastasa)	Transforma almidón en otros carbohidratos (dextrinas, oligo-, di- y monosacáridos)
Glucosa oxidasa	Convierte glucosa en gluconolactona, que a su vez produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.
Catalasa	Convierte peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
Ácido fosfatasa	Remueve fosfato de fosfatos orgánicos.
Proteasas	Hidroliza proteínas y polipéptidos para producir péptidos de bajo peso molecular.
Esterasas	Rompe los enlaces éster.

Tomado de (Álvarez Suárez, 2017^a, pp. 21-26).

La miel de abeja contiene aminoácidos libres en un nivel de alrededor del 1%(p/p) de sus compuestos (Tabla 6). Debido a la baja cantidad de aminoácidos libres en la miel no proporciona un valor nutricional significativo. Se han considerado tres posibles fuentes de aminoácidos libres en la miel: el polen, néctar y las abejas mismas. Existen alrededor de 26 aminoácidos libres en la miel que varían de acuerdo al tipo de miel. Uno de los aminoácidos más abundantes es la prolina, constituyendo el 50-85% de esta fracción, seguido de la fenilalanina. La prolina se ha empleado como una manera de evaluar la maduración de la miel y de alguna posible adulteración con azúcar (Álvarez-Suarez, 2017a). Asimismo, los aminoácidos suelen reaccionar con azúcares

produciendo compuestos cafés o amarillos que son los que generan tonalidades oscuras en la miel durante el almacenamiento (Ulloa *et al.*, 2010, pp.11-18).

Tabla 6.

Aminoácidos libres presentes en la miel

Aminoácido	mg/100 g miel	Aminoácido	mg/100 g miel
Ácido Aspártico	3.44	Tirosina	2.58
Asparagina+ glutamine	11.64	Fenilalanina	14.75
Ácido glutámico	2.94	B-alanina	1.06
Prolina	59.65	γ - Ácido Aminobutírico	2.15
Glicina	0.68	Lisina	0.99
α - Alanina	2.07	Ornitina	0.26
Cisteína	0.47	Histidina	3.84
Valina	2.00	Triptófano	3.84
Metionina	0.33	Arginina	1.72
Isoleucina	1.12	Otros	24.53
Leucina	1.03	Total	118.77

Tomado de (Álvarez Suárez, 2017^a, pp. 21-26).

La concentración de los distintos elementos minerales y traza en la miel de abeja depende en su mayoría del origen botánico y geográfico. De acuerdo a Álvarez-Suárez (2010b), se conoce que muchos de estos elementos traza cumplen un papel importante en actividades biomédicas que están asociadas con este producto natural.

Varios de los minerales presentes en la miel provienen del suelo, los cuales son transportados a las plantas por medio de las raíces e introducidos en la miel a través del néctar (Álvarez-Suárez, 2017a). La tabla 7 muestra los principales elementos minerales y elementos traza encontrados en la miel.

Tabla 7.

Principales elementos minerales encontrados en la miel de abeja.

Minerales Mayoritarios	Contenido promedio en mieles claras a oscuras (ppm)	Elementos traza
Potasio (K)	40-1350	Cobre (Cu)
Azufre (S)	15-100	Litio (Li)
Cloro (Cl)	52-427	Cromo (Cr)
Sodio (Na)	3-237	Níquel (Ni)
Fósforo (P)	29-119	Estaño (Sn)
Calcio (Ca)	5-218	Plomo (Pb)
Magnesio (Mg)	2-564	Berilio (Be)
Hierro (Fe)	0.4-224	Osmio (Os)
Silicio (SiO₂)	9-41	Vanadio (V)
Zinc (Zn)	0.2-74	Plata (Ag)
Manganeso (Mn)	0.3-4	Zirconio (Zr)
		Bario (Ba)
		Bismuto (Bi)
		Galio (Ga)
		Oro (Au)
		Estroncio (Sr)
		Germanio (Ge)

Tomado de (Álvarez Suárez, 2017^a, pp. 21-26).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son biosintetizados para protegerse contra el estrés biótico, abiótico y daño ocasionado por radicales libres. Estos se transfieren a la miel via néctar. Los compuestos fenólicos se clasifican en dos familias: Flavonoides y ácidos fenólicos (Figura 3 y 4).

-Ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido gálico, ferúlico y p-cumárico, elágico, ácido benzoico, ácido siríngico, ácido cinámico, ácido clorogénico.

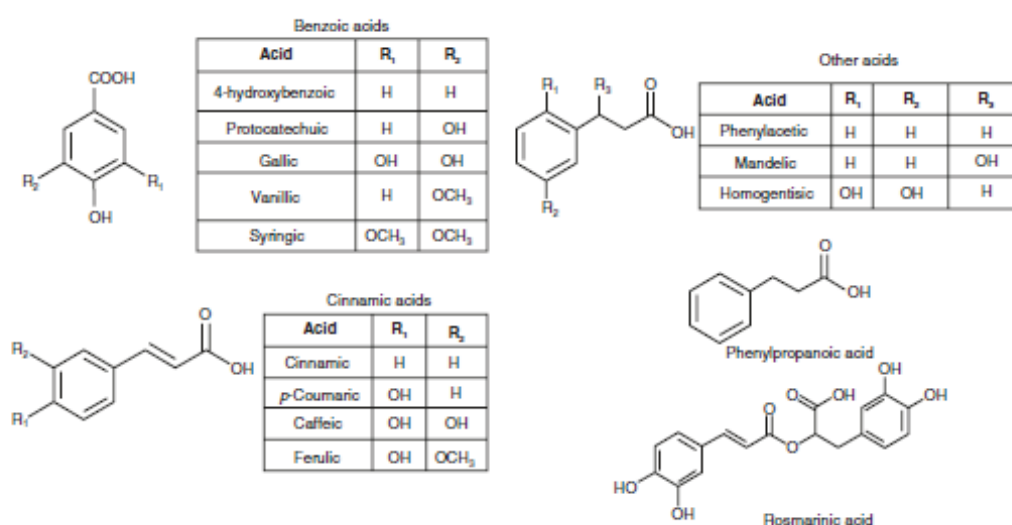


Figura 3. Estructuras de los principales ácidos fenólicos presentes en la miel. Tomado de (Alvarez-Suarez, 2017a, pp.65-66).

-Flavonoides: crisina, apigenina, herperetina, galangina, kaempferol, quercetina, pinocembrina, entre otros.

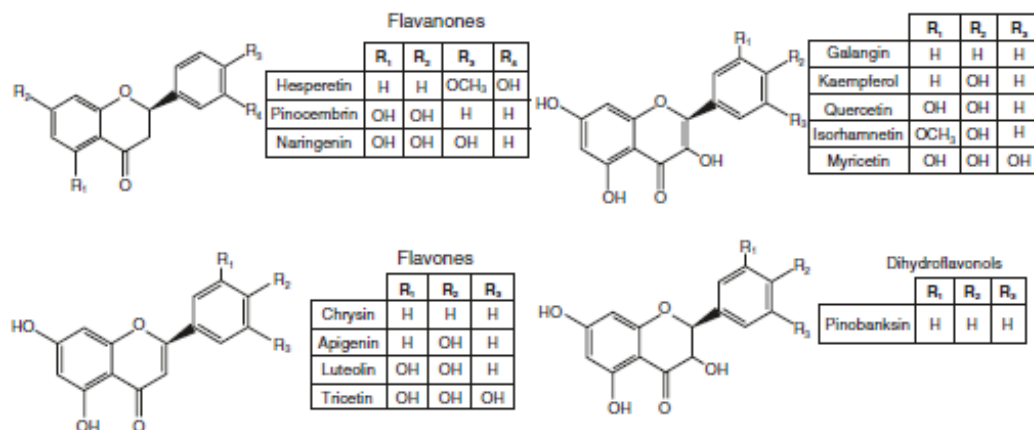


Figura 4. Estructura de los principales flavonoides presentes en la miel.

Tomado de (Alvarez-Suárez, 2017^a, pp. 65-66).

2.1.4. Propiedades Biológicas

2.1.4.1. Capacidad antioxidante

Existe una gran cantidad de patologías producto de alteraciones morfofisiológicas celulares a causa del incremento en la producción de moléculas muy inestables conocidas como radicales libres. Muchas de estas moléculas se derivan de procesos bioquímicos como la producción de energía en las mitocondrias, la radiación o la exposición a sustancias exógenas (xenobióticos) (Corrales & Muñoz, 2012, pp.213-225; Tetteh, 2012, pp.1-2).

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, los cuales son los que les confieren la inestabilidad en las células. Varios de estos compuestos pueden reaccionar de forma covalente con macromoléculas como proteínas formando compuestos electrofílicos; asimismo, las especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno (RNS y ROS) son capaces de originar reacciones en cadena de tipo redox (óxido-reducción), provocando la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y con ello alteraciones en las células e incluso hasta su muerte. El fenómeno causante del daño estructural y funcional por radicales libres se le conoce como estrés oxidativo. El cuerpo

humano posee varios mecanismos para contrarrestar este daño con la producción de antioxidantes, que pueden ser sintetizados *in situ* o suplementados por medio de las comidas (Jaramillo & Valdivia, 2016, pp.15-142).

Varias investigaciones han demostrado que el consumo de miel puede reducir el daño provocado por el estrés oxidativo. Esta capacidad de la miel se le atribuye al contenido en polifenoles (Figura 3 y 4) que ésta posee. Estos compuestos han presentado efectos terapéuticos contra una variedad de enfermedades como cáncer, desórdenes inflamatorios, degeneración neurológica, enfermedades cardiovasculares, entre otras.

Otros compuestos de la miel que también cumplen un rol importante como antioxidantes son las vitaminas del complejo B, el ácido ascórbico, carotenoides, ácidos orgánicos, tocoferoles, péptidos, selenio, aminoácidos, proteínas o productos de la reacción Maillard. Asimismo, se incluyen ciertas enzimas como catalasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, glucosa oxidasa o peroxidasa (Alvarez-Suarez, 2017a, pp.83-86; Schencke *et al*, 2016, pp.385-395).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se encuentra relacionada con distintos mecanismos, como la donación de hidrógeno, captación de radicales libres, actuando como sustrato para radicales libres y/o quelación de iones metálicos (Alvarez-Suarez, 2017^a, pp.83-86; Cortés, Vigil, & Montenegro, 2011, pp.303-317).

2.1.4.1.1 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso en el cual las especies oxidantes reactivas provocan un daño oxidativo a los lípidos. Los radicales libres provocan el deterioro de la membrana celular, provocando su autodestrucción e incluso la muerte celular (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014, pp.1-18).

Este proceso se lleva a cabo en tres etapas (Céspedes & Castillo, 2008):

1. **Fase de iniciación:** Un radical libre puede atacar a un ácido graso no saturado en los fosfolípidos de la membrana celular ocasionando la abstracción de un átomo de hidrógeno, y con ello la formación de una especie radicalica.
2. **Fase de propagación:** Se produce una reacción en cadena con la propagación del daño, formándose más especies radicalicas. Este radical formado reacciona con el oxígeno, y se forma un radical peroxilo (LOO.) capaz de reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados cercanos y producir un lipoperóxido o hidroperóxido y un radical alquílico. Con esto inicia y aumenta el daño oxidativo de los lípidos cercanos.
3. **Fase de terminación:** Los hidroperóxidos que se forman se pueden descomponer en pentano, etano, cetonas y aldehídos reactivos. Los aldehídos resultantes como el 4-hidroxinonenal y el malonildialdehído son capaces de reaccionar fácilmente con ácidos nucleicos o proteínas, lo que ocasiona desde citotoxicidad, genotoxicidad hasta mutagenicidad, además de ser un factor clave en la patogenicidad de ciertas enfermedades.

Un indicador directo del daño oxidativo en las células y de la peroxidación lipídica es uno de los productos finales de este proceso, el Malonildialdehído (MDA). La determinación de este compuesto en los tejidos o plasma es una de las técnicas más factibles y sensibles para la evaluación del estrés oxidativo causado. Su medición se basa en la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en donde un mol de MDA puede reaccionar con dos moles de TBA a alta temperatura y en medio ácido. El pigmento o cromógeno rojo es detectable por fluorimetría o espectrofotometría (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014, pp.1-18; Céspedes & Castillo, 2008, pp. 210-220; Rojas & Martínez, 2010, pp.1-8).

Según los estudios realizados que demuestran la capacidad antioxidante que posee la miel de abeja, se ha podido determinar que varios de sus componentes como los flavonoides, pueden contribuir a la estabilización de las paredes de las membranas, con la reducción de la peroxidación lipídica y la captura de radicales libres involucrados en este proceso (Álvarez-Suárez *et al.*, 2012, p.1511).

2.1.4.2. Capacidad antimicrobiana

En los últimos tiempos, el tratamiento de distintas infecciones bacterianas es cada vez más complicado, debido a que las bacterias han desarrollado mecanismos que les confiere resistencia a los agentes antimicrobianos. Esto supone la necesidad de un mejor y menor empleo de compuestos antifúngicos y antibacterianos, de mejorar el control de las infecciones y la investigación de nuevas sustancias terapéuticas (Alvarez-Suárez, 2017^a, pp. 86-89).

Estudios recientes han demostrado la eficacia de la miel como medicina natural alternativa. Una de sus aplicaciones es su capacidad antimicrobiana, ya que ésta ha conseguido inhibir desde bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, algunos hongos y virus, hasta ciertas cepas bacterianas resistentes a varios fármacos (Alvarez-Suarez, 2017^a, 86-89). Muchos reportes han demostrado el efecto antifúngico de la miel, en donde ha logrado incluso reducir la producción de

toxinas fúngicas, además de inhibir el crecimiento de los hongos (Oryan, Alemzadeh, & Moshiri, 2016, pp.98-118).

Las propiedades antimicrobianas que presenta la miel han permitido tratar ciertas afecciones como las quemaduras, lo que facilita el control microbiano en las heridas infectadas. Los factores responsables de la actividad antimicrobiana son: la presencia de peróxido de hidrógeno como producto de la acción de la enzima glucosa oxidasa en la glucosa en ambiente aerobio; algunas propiedades físico-químicas como el bajo pH o acidez que posee la miel o el alto contenido en azúcares, el cual debido a su concentración en la miel provoca un efecto osmótico alto; la presencia de ciertos ácidos orgánicos que generan el ambiente ácido necesario para evitar el crecimiento bacteriano; y también se incluyen componentes como los polifenoles que también tienen un efecto antimicrobiano (Cortés et al., 2011, pp.303-317; Ulloa et al., 2010, pp.1-18) . Oryan *et al* (2016, pp. 98-118) ha sugerido que los flavonoides presentes en la miel poseen un potencial comprometedor como agentes anticandidales. Estos compuestos se pueden adherir a la pared celular de las levaduras y llevar a cabo su acción disruptiva. Además, gran parte de la actividad de la miel se debe a los cambios que realiza en el progreso del ciclo celular, función mitocondrial, integridad de la membrana y la biogénesis.

2.2. Producción de miel en el Ecuador

Ecuador cuenta con una diversidad biológica tal, que le permite contar durante todo el año con varios tipos de floraciones escalonadas, permitiendo una producción continua de miel durante todo el año. De esta manera, el país tiene la facilidad de producir 1000 toneladas de miel por cada 20 hectáreas de bosque/año. Las principales provincias productoras de miel en el Ecuador son Manabí, Loja, Imbabura, Azuay, Pichincha, Azuay, Chimborazo (Figura 5). Se pueden diferenciar dos tipos de apicultores: los que realizan esta actividad de manera informal, sin legalizar el producto, con un fin único de satisfacer sus

necesidades; y otros que establecen su propia microempresa con interés competitivo en el mercado nacional (Gutiérrez, 2016, p.14).

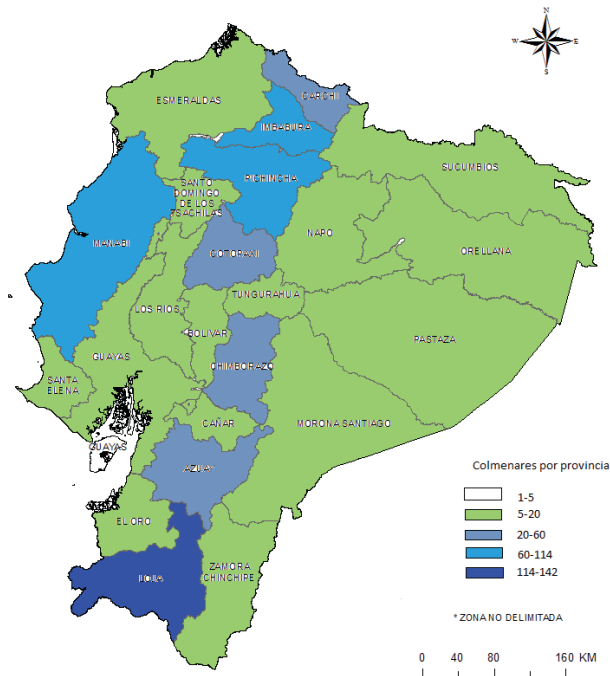


Figura 5. Mapa del Ecuador en donde destacan zonas de muestreo y la distribución de colmenares que existen por provincia.

Adaptada de (AGROCALIDAD, 2016) y (Rosero, 2015).

2.3. Importancia económica

La importancia que tiene la miel en la economía, radica en primer lugar en la apicultura, siendo la técnica que se encarga de criar abejas y aprovechar sus productos como la miel o la jalea real. Esta actividad se ha extendido a casi todos los lugares del mundo. Existen alrededor de 45 millones de colmenas de abejas en el mundo que producen aproximadamente 1'016.000 toneladas de miel y cerca de 25 millones de Kg de cera al año. En Ecuador se estima que alrededor del 62% de los productos de los colmenares es la miel de abeja, seguido del polen y ceras (Figura 6). Durante el año 2014 el mercado mundial de la miel experimentó un máximo histórico que presenta transacciones que se acercan a

los USD 2300 millones (Gutiérrez, 2016, pp.13-14). De acuerdo a Hugo Rosero del Programa Nacional Sanitario Apícola de Agrocalidad (2016), el “Ecuador tiene un gran potencial para la apicultura, en donde actualmente existen 200.000 colmenas con solo 912 explotaciones apícolas con 12188 colmenas catastradas”.



Figura 6. Actividad productiva de los colmenares de Ecuador
Tomado de (Rosero, 2015).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El plan experimental del estudio llevado a cabo se puede observar a continuación en la Figura 7.

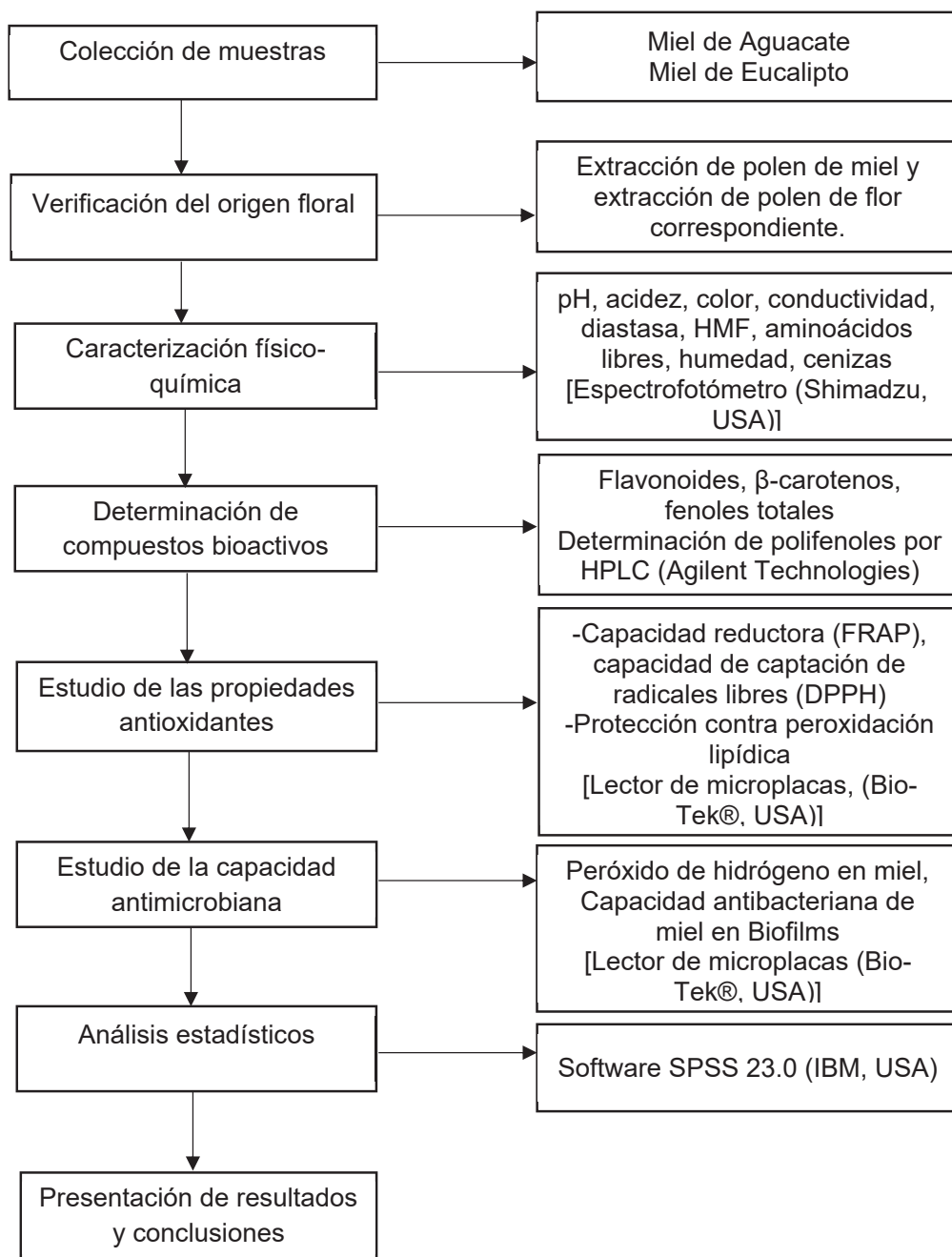


Figura 7. Esquema del diseño del plan experimental del presente estudio.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Población y muestra

La población en análisis consistió en el total de apiarios que declararon producción de miel monofloral de aguacate y eucalipto en la provincia de Pichincha.

4.2. Análisis de origen floral- extracción de polen de miel

Para verificar el origen floral se realizó una extracción de polen por acetólisis según la metodología descrita por Louveaux *et al* (1978). Para ello se diluyeron 30 gramos de miel en 150 mL de agua destilada tibia (máximo 40°C). Luego la solución de miel fue distribuida en tres tubos cónicos de 50 mL y luego centrifugados por 5 minutos a 4500 rpm (Eppendorf Hamburg). Seguido, el sobrenadante fue retirado en un vaso de precipitación limpio, y los sedimentos o precipitados de los tres tubos fueron colectados en un tubo cónico de 15 mL. Para extraer la mayor cantidad posible de polen, se tomaron 100 mL del sobrenadante que se colocó anteriormente en el vaso de precipitación limpio y se centrifugó a 4500 rpm por 20 min. Luego el sobrenadante fue retirado y el precipitado extraído se unió con el precipitado colectado en el paso anterior. Se colocaron 10 mL de ácido acético glacial sobre el sedimento recolectado y se centrifugó por 5 minutos a 4500 rpm. El sobrenadante fue retirado y se colocó una mezcla de acetólisis que contenía 1 mL de ácido sulfúrico y 9 mL de anhídrido acético por muestra. Posteriormente, se colocó la solución de acetólisis junto al precipitado en baño maría (Memmert, USA) por 10 minutos a 70°C. Se centrifugó por 5 minutos a 4500 rpm y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. Seguido, se añadieron 10 mL de agua destilada en el tubo con precipitado, se colocó una gota de detergente y se agitó vigorosamente. Se retiró el sobrenadante y se colocó una gota de una solución de glicerina 1:1. Los sedimentos obtenidos se dispersaron en el portaobjetos y sobre este se colocó el cubre- objetos con una gota de solución gelatina-glicerina. Una vez preparada

la muestra se observó en el microscopio a 100 aumentos, se analizó el tipo de grano polen presente en la misma y se determinó el porcentaje de granos de polen observado.

4.2. Caracterización Físico- Química

4.2.1. Determinación de color en miel

Para la determinación del color se utilizó la técnica descrita por Delmoro *et al* (2010, pp.145-152). Las muestras de mieles (2,5 g) fueron diluidas en 5 mL de agua destilada para luego ser colocadas en una cubeta de lectura espectrofotométrica. Se esperó 10 minutos y se leyó en el espectrofotómetro (Shimadzu, EEUU) a una longitud de onda de 635nm. La absorbancia obtenida se extrapoló de acuerdo a la escala *Pfund* utilizada para la clasificación del color. Los resultados obtenidos fueron expresados en mm *Pfund*.

4.2.2. Análisis de pH en miel

El análisis de pH en miel se realizó según el protocolo descrito en la Norma Mexicana de Miel F-036 (2000). En un vaso de precipitación de 100 mL se pesaron 5 gramos de muestra de miel y se diluyeron en 37.5 mL de agua destilada. El pH inicial fue determinado empleando un potenciómetro (Fisher Scientific, USA).

4.2.3. Determinación de la conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de las mieles fue determinada según la metodología de Sanz y Sanz (1994, pp.143-158). Para ello, se diluyeron 5 gramos de muestra de miel en 25mL de agua destilada y se midió la conductividad eléctrica mediante un conductímetro (Fisher scientific, USA) y los resultados se expresaron en unidades de mS/cm.

4.2.4. Determinación de la actividad de la enzima diastasa en miel

Para determinar la actividad de diastasa, se utilizó la metodología descrita en la Norma mexicana de Miel F-036 (2000). Previo a la determinación de diastasa en miel se llevó a cabo la determinación de la dilución de almidón soluble (Fisher Scientific) necesaria para la normalización del mismo mediante la mezcla del almidón con la solución de yodo 0,0007 N y probando diluciones con agua destilada hasta obtener una absorbancia de 0.760 ± 0.02 . Una vez identificada la dilución normal, las muestras de miel (2 g) fueron pesadas y diluidas en 1 mL de buffer acetato, 4 ml de agua destilada y 0.6 mL de solución de cloruro de sodio (Fisher Scientific) en este orden, y se aforaron a 10 mL con agua destilada. Luego, dos tubos de ensayo fueron calentados por 10 minutos a 40°C; uno contenía 2 mL de solución de miel, y el otro tubo 1 mL de solución de almidón (dos tubos por muestra). Pasado este tiempo, los volúmenes de ambos tubos fueron unidos para comenzar la reacción (se mantuvieron estas mezclas a 40°C). A partir de este momento, cada 5 minutos se tomaron alícuotas de 50 μ L de estas soluciones-reacciones hasta llegar a una absorbancia menor a 0.235 nm, y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL que contenía 500 μ L de solución de yodo 0.0007N. De inmediato se agitaron, se realizó la dilución normal con agua destilada previamente determinada al inicio y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro (Shimadzu, USA). El índice o actividad diastásica fue expresado en °Gothe.

4.2.5. Determinación del contenido de Hidroximetilfurfural (HMF)

Para determinar el contenido de HMF se utilizó la metodología mencionada en la Norma mexicana de Miel F-036 (2000). Las muestras de miel (5g) fueron diluidas en 25 mL de agua destilada. Luego, 0.5 mL de la solución de Carrez I (Tabla 8) fueron adicionados a las soluciones de miel y luego homogenizadas. Seguido, 0.5 mL de la solución de Carrez II (Tabla 8) fueron añadidos a estas soluciones, se mezcló y se aforó a un volumen de 50 mL con agua destilada. Se filtraron las soluciones con papel filtro y enseguida se distribuyeron 5 mL en

dos tubos de ensayo por muestra. A uno de los tubos de ensayo se le colocó 5 mL de agua destilada y al otro 5 mL de bisulfito de sodio 0.1% teniendo un volumen final de 10 mL por tubo. Se agitaron vigorosamente ambas mezclas y se determinó la absorbancia, tanto del tubo de ensayo 1 (muestra) como del tubo de ensayo 2 (referencia), a dos longitudes de onda, 284 y a 336 nm en celdas de cuarzo en el espectrofotómetro (Shimadzu, USA). Antes de medir, se utilizó agua destilada como blanco. El contenido total de Hidroximetilfurfural fue expresado como equivalentes de Hidroximetilfurfural por kilogramo de miel (mg HMF/ Kg de miel).

Tabla 8.

Preparación de soluciones de Carrez

Solución	Preparación
<i>Carrez I</i>	1.5 g de ferrocianuro de potasio trihidratado ((K ₄ Fe(CN) ₆ · 3 H ₂ O) en 10 mL de agua destilada.
<i>Carrez II</i>	3 g de acetato de zinc dihidratado ((Zn(AcO) ₂ · 2H ₂ O) en 10 mL de agua destilada.

4.2.6. Determinación de aminoácidos libres

El contenido de aminoácidos se determinó por el método Ninhidrina-Cadmio (Doi, Shibata, & Matoba, 1981, pp.173-184). En primer lugar, se realizó la curva patrón partiendo de una disolución madre de L-leucina (Sigma Aldrich) de 60mg/L en agua destilada. Asimismo, se utilizó Prolina (Sigma Aldrich) como segundo estándar. Las curvas estándar se elaboraron con concentraciones seriadas de L-leucina (2.4, 12, 24, 36 y 42 mg/L) y de prolina (10-50 mg/mL), las cuales se aforaron a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Las muestras de miel (1.25 g) fueron diluidas en 25 mL de agua destilada. Una vez obtenidos los patrones y las soluciones de miel, se llevó a cabo la reacción. En tubos de

ensayo se colocó 1 mL de muestra o patrón con 2 mL de reactivo (0.8 g de ninhidrina disuelto en 80 mL de etanol 99% y 10 mL de ácido acético con 1 mL de CdCl_2 disuelto en agua destilada). Seguido, las mezclas fueron calentadas a 84°C por 5 min y enfriadas. Luego se procedió a medir la absorbancia de las soluciones-reacción a 507 nm en espectrofotómetro. Para realizar el blanco se sustituyó la muestra por agua destilada siguiendo el mismo procedimiento. Los resultados fueron expresados en equivalentes de Leucina por 100 gramos de miel (mg Leucina/100 g de miel) y en equivalentes de Prolina por 100 gramos de miel (mg Prolina/ 100 g de miel).

4.2.7. Determinación del contenido de humedad

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

4.2.8. Determinación del porcentaje de cenizas

El porcentaje de cenizas fue determinado mediante el procedimiento descrito en la Norma mexicana de Miel F-036 (2000, p.10). Los crisoles fueron pesados previo a colocar las muestras respectivas. Seguido, se pesaron 5 g de miel de eucalipto y 2.5 g de miel de aguacate. Las muestras fueron calcinadas en una plancha de calentamiento hasta que dejaron de desprender humos y se haya evaporado la mayor cantidad de líquido presente. Posteriormente, las muestras calcinadas se colocaron en la mufla (Acequilabs, Colombia) durante 4 horas a una temperatura de 500°C . Las muestras se colocaron en un desecador y se esperó una hora. Pasado este tiempo, las muestras fueron pesadas y se realizó

el cálculo correspondiente de acuerdo a los pesos tomados y según la siguiente ecuación:

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

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

$$b = \text{crisol}$$

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

El análisis fue expresado en porcentaje de cenizas presentes en la miel.

4.3. Determinación de compuestos bioactivos

4.3.1. Determinación de flavonoides

El contenido total de flavonoides se determinó siguiendo la técnica previamente descrita por Dewanto *et al* (2002, pp. 3010-3014). Las muestras de mieles (1g) fueron diluidas en 1 mL de agua destilada. Se tomaron 20 μL de muestra/estándar y se colocaron en una placa de 96 pocillos junto con 100 μL de agua destilada y 6 μL de la solución de NaNO_2 (Sigma Aldrich) al 5% y se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, 12 μL de la solución de AlCl_3 (Lobachemie) fueron añadidos y se incubó durante 5 minutos. Seguido, se añadieron 40 μL de NaOH 1M y 22 μL de agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia de esta solución a 510 nm contra el blanco que posee agua destilada en lugar de la muestra de miel. Previo a este análisis se realizó la curva de calibración de Catequina (Cayman) (0.0625-0.5 mM) y el contenido total de flavonoides se expresó como equivalentes de catequina por 100 g de miel (mg Catequina/100 g miel).

4.3.2. Determinación de fenoles totales

El contenido total de fenoles fue determinado según el procedimiento descrito por Slinkard y Singleton (1977, pp.49-55). Las soluciones de miel se prepararon

con 0,5 g de miel diluida en 5 mL de agua destilada. En microtubos de 1.5 mL separados se colocaron 100 μ L de la muestra, en otro tubo se colocó el blanco y en otro el estándar junto con 500 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich) y se esperó 5 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, 400 μ L de Carbonato de Sodio fueron añadidos y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de la solución de reacción a 760 nm contra un blanco que contenía agua destilada en lugar de la solución de miel. Previo a este análisis, se realizó la curva estándar de Ácido Gálico (Lobachemie) (0.1875- 1 mM) y el análisis fue expresado como equivalentes de Ácido gálico por 100 g de miel (mg Ácido Gálico/100 g miel).

4.3.3. Determinación Total de carotenoides

El contenido total de carotenoides fue determinado según la técnica descrita por Bueno-Costa *et al* (2016, pp. 333-340). Para su análisis, las soluciones de miel se prepararon con 0.5 g de miel diluido en 0.5 mL de agua destilada. Estas soluciones de miel fueron mezcladas con 5 mL de solución hexano-acetona (6:4), agitadas durante 1 minuto y luego colocadas en oscuridad durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 450 nm en cubetas de cuarzo. Previo a este análisis se realizó la curva de calibración de β -caroteno (Lobachemie) (0.25-4 μ g/mL) y los resultados obtenidos fueron expresados en miligramos de β -caroteno equivalentes por kilogramo de miel (mg β -caroteno/Kg miel).

4.3.4. Análisis de polifenoles por HPLC-DAD

4.3.4.1. Extracción de polifenoles de las mieles de estudio

La extracción de polifenoles fue realizada según la metodología mencionada por Álvarez-Suárez *et al* (2010^a, pp.9817-9824). Para la extracción se utilizó 50 mL de agua destilada pH 2 (con HCl 1M). En primer lugar, se activaron las columnas

Sebpack (Agilent Technologies). Para ello, se hizo pasar por las columnas 10 mL de metanol puro y 10 mL de agua destilada pH 2 en ese orden.

Luego de la activación, las soluciones de mieles fueron añadidas (10 g de miel en 100 mL de agua destilada pH 2). Una vez que las soluciones de miel fueron pasadas, se realizaron tres lavados de las columnas con agua destilada pH 2. Finalmente, los polifenoles fueron obtenidos por elución con metanol absoluto. Una vez obtenidos, los polifenoles recogidos en metanol se llevaron al rotavapor R210 (Buchi, USA) hasta obtener alrededor de dos mililitros de solución. Estos mililitros se colocaron en microtubos de 1.5 mL y se colocaron en un concentrador al vacío *SpeedVac* (Genelac, USA) hasta que se haya evaporado todo el metanol. Para finalizar, se almacenó el extracto metanólico (polifenoles) a 4°C.

4.3.4.2. Determinación de polifenoles por HPLC

El presente análisis se llevó a cabo según la metodología descrita por Muñoz-Jaúregui *et al* (2014, pp. 287-297). El equipo de Cromatografía de alta resolución (HPLC) empleado fue un modelo 1260 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), el cual posee una bomba cuaternaria Agilent 1260 y un módulo automático de colección de muestras (1260 Infinity Standard Autosampler). La columna que se utilizó fue una columna de dimetil-n-octadecilsilano como fase estacionaria (Eclipse Plus C18 5 µm 4.6 x 250 mm). Las longitudes de onda elegidas para el análisis fueron 280, 330 y 360 nm. El flujo fue de 1.0 mL/min, un volumen de inyección de 20 µl y un tiempo de corrida de 35 min. La fase móvil utilizada fue de una solución de ácido fosfórico 0.1% en la Línea A y Acetonitrilo en la Línea B. El modo de elución fue por gradiente, es decir por mezcla de dos líneas en distintas proporciones como se observa en la Tabla 9.

Tabla 9.

Gradiente y modo de elución de las líneas A y B

Tiempo	Línea A	Línea B
0,0	90	10
5,0	85	15
10,0	70	30
20,0	50	50
25,0	40	60
35,0	40	60

Se pesaron 5 mg de extracto metanólico de las mieles de estudio y se aforaron a 2 mL con metanol grado HPLC en un microtubo de 1.5 mL. Seguido, las muestras se pasaron a través de un filtro de 0.45 μm y luego colocadas en un vial para HPLC. Finalmente, se analizaron las muestras en el HPLC. Previo al análisis se elaboraron las curvas de calibración de Quercetina (Lobachemie) de pureza 99.0% (0.05-10 mg/mL) y el mismo rango para Ácido gálico de pureza 99.1 %.

4.4. Determinación de la capacidad antioxidante

4.4.1. Capacidad reductora-método FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro)

La capacidad reductora por el método FRAP fue determinada según la metodología descrita por Benzie y Strain (1996, pp. 70-76). Para este análisis, 1 g de muestra de miel fue diluida en 10 mL de agua destilada. Seguido, 100 μL de la muestra, en otro microtubo la misma cantidad de estándar y en otro el Blanco fueron mezcladas con 900 μL de reactivo FRAP. Luego se midió la absorbancia de la solución-reacción a 539 nm contra el blanco en el que se utilizó agua grado 1 en lugar de la muestra. Previamente, se realizó la curva de

calibración de Trolox (50-500 μM) y los resultados fueron expresados en equivalentes de Trolox por 100 g miel ($\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g miel}$).

4.4.2. Capacidad de captar radicales libres- Método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

Para medir la actividad de inhibición de radicales libres, se utilizó el protocolo desarrollado por Hatano *et al* modificado(1988, pp. 2090-2097). En primer lugar, las muestras de miel (1g) fueron diluidas en 10 mL de agua destilada. En microtubos de 1.5 mL se colocaron 100 μL de la solución de miel, 500 μL de etanol 70% y 400 μL del reactivo DPPH y se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se incubaron durante 15 minutos. Pasado este tiempo se midió su absorbancia a 517 nm. En otro microtubo de 1.5 mL, se realizó el blanco DPPH que contenía 400 μL de DPPH, 500 μL de etanol 70% y 100 μL de agua destilada. Asimismo, se elaboró otro blanco para cada muestra, que estaba compuesto por 500 μL de etanol 70%, 400 μL de metanol y 100 μL de solución de miel. Se utilizó un blanco DPPH por análisis completo y otro blanco por cada muestra de estudio. Se realizó una curva estándar de Trolox (5-500 μM) según el porcentaje de actividad de captación de radicales generado. Los resultados obtenidos fueron expresados en equivalentes de Trolox por 100 gramos de miel ($\mu\text{mol trolox}/100 \text{ g miel}$).

4.4.3. Efecto protector de la miel de abeja contra la peroxidación lipídica- Método TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)

4.4.3.1. Extracción de sangre y preparación de membrana celular de glóbulos rojos.

Los glóbulos rojos fueron extraídos de voluntarios sanos no fumadores con previo consentimiento informado. Los eritrocitos fueron aislados de sangre heparinizada a través de centrifugaciones a 1000 g durante 10 minutos a 10°C.

La capa de leucocitos y el plasma fueron eliminados y los glóbulos rojos fueron lavados con solución NaCl 0.9% fría y, seguido se realizaron tres lavados con PBS (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 1,9 mM y NaH₂PO₄ 8,1 mM, pH 7,4) a 4°C.

La membrana se preparó según la técnica descrita por Álvarez-Suárez *et al* (2012, pp.1508-1516) . Para conseguir una hemólisis completa, los glóbulos rojos fueron lavados con soluciones hipotónicas a distintas concentraciones de la siguiente forma: primero, los glóbulos rojos fueron resuspendidos en 20 veces su volumen (1:20) con 5 mM de tampón fosfato hipotónico (EDTA 2,2 mM, 1:20) a un pH 7,4 y se mantuvo a 4°C por 30 minutos. Después del tiempo transcurrido, la solución fue centrifugada a 3800x g durante 20 minutos a 8°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se volvió a resuspender con tampón fosfato 2.5 mM (1:20) pH 8. Finalmente, se realizó el último lavado con tampón fosfato 1.25 mM pH 8 y se centrifugó a 13500 rpm a 8°C por 20 minutos. Tras realizar los lavados, se cosiguieron membranas claras en el sedimento. Estas se resuspendieron en PBS con EDTA 2.2 mM (1:5) y se almacenaron a -80°C.

4.4.3.2. Determinación de peroxidación lipídica en la membrana.

El siguiente ensayo fue determinado según la metodología de Álvarez- Suárez *et al* (2012, pp.1508-1516). Previo al análisis, las membranas extraídas se descongelaron y el tampón de almacenamiento fue eliminado por centrifugación (1800 g a 8°C por 20 minutos). Los precipitados fueron lavados dos veces con solución de NaCl 0.9%, y luego las membranas empaquetadas se volvieron a resuspender en NaCl 0.9% para el ensayo.

La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 50 µl de solución de miel, 50 µl de AAPH (50 mM) y 100 µl de membranas. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora y luego se detuvo la reacción. La formación de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitrúrico (TBARS) se logró determinar luego que las membranas

fueran expuestas al oxidante y reaccionaran con el ácido tiobarbitúrico modificado (TBA) (Buege & Aust, 1978). Una vez que se detuvo la reacción, se colocó 1 mL de solución TBA-TCA-HCl (0.375% p/v de TBA, 15% p/v de TCA o ácido tricloroacético, 0.2 M de HCl o ácido clorhídrico) a 0,5 mL de muestra con BHT (Butilhidroxitolueno) 0.3 mM para la prevención de una posible peroxidación lipídica de las membranas durante la reacción con el TBA. Estas muestras se calentaron a 95°C por 20 minutos y, seguido se enfriaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron estas muestras a 14000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en una microplaca de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 535 nm (Synergy™ Multi-Detection Microplate Reader; Bio-Tek®, USA). Asimismo, se incluyeron dos muestras control para el ensayo: a) para la evaluación de la peroxidación lipídica basal que exista en el tejido (C1), el cual consistía en 100 µl de membranas, y NaCl 0.9% en lugar de AAPH y solución de miel; b) para la estimación de la máxima peroxidación lipídica en las membranas (C2), el cual contenía 100 µl de membranas, 50 µl de AAPH y 50 µl de NaCl 0.9%. La actividad antioxidante de las muestras se expresó como porcentaje de inhibición (P) de la formación de las Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a partir de la absorbancia (Abs) con los respectivos controles según la siguiente ecuación:

$$P = \left[\frac{(1 - (Abs - C1))}{(C2 - C1)} \right] * 100$$

Los resultados fueron expresados como la concentración de miel necesaria para inhibir el 50 % (IC50) de la peroxidación lipídica en las membranas. El diseño del ensayo se muestra en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10.

Diseño del ensayo TBARS con el rango de concentraciones utilizadas para la miel de aguacate.

Preseca de AAPH	Miel de aguacate (mg/mL)				Control +
	20	15	10	7,5	
Ausencia de AAPH	20	15	10	7,5	Control -

Tabla 11.

Diseño del ensayo TBARS con el rango de concentraciones utilizadas para la miel de eucalipto.

	Miel de eucalipto (mg/mL)				
Preseña de AAPH	25	20	15	10	Control +
Ausencia de AAPH	20	20	15	10	Control -

4.5. Capacidad antimicrobiana

4.5.1. Determinación de Peróxido de hidrógeno en miel

El presente análisis fue llevado a cabo mediante el método FOX-1 modificado para determinar peróxido de hidrógeno en las muestras de miel de estudio, el cual fue descrito por Li *et al* (2017, pp. 225-231). Los reactivos empleados fueron los siguientes: Solución 1 (Sulfato ferroso de amonio 25 mM con Ácido sulfúrico 0,25 M), Solución 2 (62.5 μ M xileno y x150 mM sorbitol) y la solución de trabajo FOX-1 (solución 1 más solución 2, proporción 1:100). La concentración utilizada fue de 0.5 mg/ mL para la miel de aguacate y 100 mg/mL para la de eucalipto. La reacción consistió en la mezcla de 133,33 μ L de solución de trabajo FOX -1 con 66.6 μ L de muestra de miel en una placa de 96 pocillos. Las soluciones-reacción fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, éstas se midieron en el lector de placas (Bio-Tek®, USA) a una absorbancia de 580 nm con su respectivo blanco (agua destilada). Previamente se realizó una curva estándar de Peróxido de hidrógeno 30% (0.01- 0.4 μ g/mL). Los resultados fueron expresados en equivalentes de peróxido de hidrógeno por kilogramo de miel (μ g H₂O₂ / kg de miel).

4.5.2. Efecto antibacteriano de miel en Biopelículas

El presente análisis se llevó a cabo según la metodología propuesta por Lu *et al* (2014, pp. 1-25), el cual permitió determinar la capacidad de inhibición de la

formación de biopelículas y la eliminación de la misma preformada mediante la aplicación de miel de abeja. Las cepas bacterianas utilizadas fueron cepas gram positivo (*Staphylococcus aureus* CAMP) y cepas Gram negativo (*Klebsiella pneumoniae* KPC 609803). Estas fueron cultivadas en TBS (Tryptic Soy Broth) y agitadas (90rpm) a 37°C por 18 horas.

Para determinar la inhibición de formación de biopelícula, se realizó una dilución al 0.5 en la escala Mc Farland (1.5×10^8 UFC) y se transfirieron 100 μ L de la dilución a una placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 μ l de la dilución de mieles (eucalipto, aguacate y miel artificial al 10 y 20%) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Como controles negativos se utilizó medios con la muestra sin inoculación de la bacteria. Posteriormente, se llevó a cabo la eliminación de células planctónicas mediante tres lavados continuos con PBS. Posteriormente, las placas se midieron en el espectrofotómetro para su cuantificación a una longitud de onda de 240 nm. La formación de la biopelícula fue expresado como el porcentaje relativo de formación de biopelícula con respecto al control que no fue tratado, tomando este último como el 100%.

Para la determinación de la acción de la miel para eliminar la biopelícula preformada, se formaron primeramente biopelículas en la placa de microtitulación de 96 pocillos a 37°C por 18 horas. Se realizaron tres lavados con PBS y se midió la absorbancia a 240 nm para determinar la formación inicial de biopelícula. Seguido, se colocaron 200 μ l de la solución de miel correspondiente (aguacate, eucalipto y miel artificial, 20 y 10%) y se incubaron por 18 horas a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS y se midió la absorbancia a la misma longitud de onda. Para realizar los cálculos de absorbancia final, se restó la absorbancia inicial de la final. Este valor fue expresado como se mencionó anteriormente.

4.6. Análisis estadístico de resultados

Las muestras de estudio fueron analizadas por triplicado y los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. Los datos resultantes se analizaron con el Paquete Estadístico IBM SPSS 20.0.

Se llevó a cabo un análisis multivariado (MANOVA) para las propiedades físico-químicas y composición polifenólica. Asimismo, la corrección de bonferroni fue utilizada en ambos casos para el ajuste de análisis post hoc para comparar grupos múltiples.

Con respecto a la correlación entre variables cuantitativas, se empleó el coeficiente de correlación Pearson para su estudio. El nivel de confianza que se utilizó en todos los análisis fue del 95 % y se consideró un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

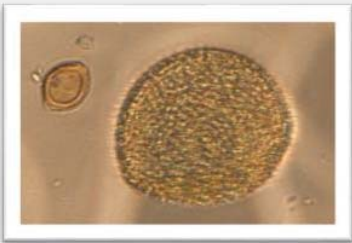
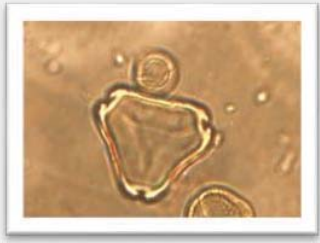
5.1. Caracterización físico-química

El resultado del contenido polínico de las mieles fue expresado en porcentaje, en donde se reportó que la miel de aguacate contenía cerca del 69,12% de polen de *Persea americana*, mientras que un 83.24% de polen de *Eucalyptus sp.* para la miel de eucalipto (Tabla 12). El porcentaje de polen obtenido en miel de eucalipto se encuentra dentro del rango correspondiente a mieles monoflorales de eucalipto según Flores *et al* (2014, pp. 2177-2191). De acuerdo a Terrad y Heredia (2004, pp. 1803-1805), el bajo porcentaje de polen encontrado en las mieles de aguacate (5-70%) se debe posiblemente al comportamiento de floración de aguacate, es decir, la flor bisexual puede abrirse dos veces: en la primera apertura puede funcionar como hembra y en la segunda (usualmente al siguiente día) funciona como macho, y se libera el polen. No obstante, en ambas aperturas el néctar es secretado. Además varias observaciones y estudios han

logrado demostrar que existe una tasa muy baja e ineficiente de transferencia de polen de aguacate, a través de la colmena por el contacto físico entre las abejas melíferas.

Tabla 12.

Contenido de granos de polen en las mieles monoflorales en estudio.

Tipo de miel	Frecuencia de clase ^a	Identificación de granos de polen (% de frecuencia y género botánico)
Miel de aguacate  1	P	<i>Persea americana</i> (69.12 %)
	S	<i>Brassica napus.</i> (26.65 %)
	M	<i>Poulsenia type</i> (4.23 %)
Miel de eucalipto  2	P	<i>Eucalyptus sp.</i> (83.24 %)
	S	<i>Mimosa c.f. albida</i> (12.63 %)
	M	<i>Persea americana</i> (4.13 %)

Nota: ^a 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%). 1 y 2 Imágenes por microscopía tomadas por el Autor: 1 grano de polen de aguacate y 2 grano de polen de eucalipto

Los resultados obtenidos de la caracterización físico-química de las mieles monoflorales de aguacate y eucalipto (Tabla 13) muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas mieles en los parámetros analizados y el origen botánico. De tal forma, según el análisis del color, la miel de aguacate

puede clasificarse como ámbar oscuro dentro de la escala de Pfund (mayor a 114 mmPfund), y ámbar extra claro para la miel de eucalipto (valores entre 34-50 mmPfund) como previamente se ha reportado para estas clases de mieles por González-Miret *et al*(2005, pp. 2574-2580), Delmoro *et al* (2010, pp. 145-172) y Bentabol Manzanarez *et al* (2014). No obstante, los valores de color obtenidos para miel de eucalipto son bajos en comparación con mieles de eucalipto del noroeste de la Península Ibérica clasificadas como ámbar claro (Flores *et al.*, 2014). Por otro lado, se han encontrado valores similares con mieles de aguacate de Israel (Dag *et al*, 2006, pp. 387-394).

Tabla 13.

Parámetros físico-químicos de las mieles monoflorales de estudio.

Parámetros físico-químicos	Tipo de miel monofloral/Valor	
	Miel de aguacate	Miel de eucalipto
Color (mm Pfund)	137.29 ± 66.97 ^a	39.87± 11.458 ^b
Humedad (%)	16.42 ± 2.53 ^a	18.62 ± 1.84 ^b
pH	5.23 ± 0.96 ^a	4.01 ± 0.18 ^b
Hidroximetilsulfural(HMF) (mg/kg de miel)	27.16 ± 30.43 ^a	3.78 ± 3.481 ^b
Índice de Diastasa (°Gothe)	47.65 ± 34.95 ^a	32.92 ± 11.35 ^b
Conductividad eléctrica (mS/cm)	1.31 ± 0.472 ^a	0.39 ± 0.032 ^b
Contenido de cenizas (%)	1.05 ± 0.13 ^a	0.25 ± 0.02 ^b

Nota: Los valores representados con letras son significativamente diferentes para $p < 0.05$.

Se ha visto que la humedad en la miel es uno de los parámetros que más afecta a la calidad. Esta propiedad se encuentra muy relacionada con las condiciones ambientales y la manipulación durante la etapa de cosecha y/o almacenamiento (Alvarez-Suárez *et al.*, 2017b, pp. 272-279). El contenido de humedad encontrado en los dos tipos de mieles arrojó valores similares (Tabla 13) los cuales después de ser analizados y comparados con normas de calidad (CODEX

STAN 12, 2001; Real Decreto 1049, 2003; EU Council, 2001) conforme al Codex Alimentarius de la miel, determinaron que se encuentran dentro del rango permisible para mieles producidas en regiones tropicales ($\leq 20\%$). Por tanto, es posible aseverar que las mieles de nuestro estudio han sido manipuladas y conservadas en condiciones adecuadas.

La acidez total que presenta la miel de abeja es una de las principales propiedades que la caracteriza. Conjuntamente el pH y otros parámetros cumplen un papel muy importante en la frescura, textura, estabilidad y calidad de la misma (Alvarez-Suárez *et al.*, 2017b, pp. 272-279). El rango de pH obtenido en las muestras de estudio varía de 3.96-5.23, siendo la miel de aguacate la de pH más alto. A pesar de que no se ha establecido un rango de pH estandarizado, se han encontrado valores similares con mieles de aguacate de la Península Ibérica (Bentabol-Manzanares *et al.*, 2014, pp. 572-574; Terrab & Heredia, 2004, pp. 1803-1804) y de Israel (Dag *et al.*, 2006, pp. 387-394). Asimismo, el pH que presentaron las mieles de eucalipto se encuentran dentro de rango de pH reportados en estudios previos (Flores *et al.*, 2014, pp.2177-2190; Gomez *et al.*, 2015, pp.121-126). De acuerdo a López (2014, pp.1-14), los valores de pH pueden ser bajos cuando existe una mayor humedad, la cual puede deberse por un aumento en la producción de ácido glucónico por acción de la enzima glucosaoxidasa, lo cual se correlaciona con los valores de humedad y pH obtenidos.

La frescura de la miel es posible evaluarla mediante el índice de diastasa así como con el contenido de hidroximetilfurfural (HMF). El HMF es un compuesto que puede estar ausente o en pocas cantidades de forma natural en la miel (Alvarez-Suárez *et al.*, 2017b, pp. 272-279). De acuerdo a Zandamela (2008, pp.57-59), este compuesto se forma más rápidamente en medio ácido y a altas temperaturas, por lo que está directamente relacionado con el calor al que ha sido sometida la miel, grado de envejecimiento y/o condiciones de

almacenamiento. Los valores de HMF encontrados en las mieles se encuentran dentro del rango establecido (<80 mg/Kg) (EU Council, 2001) para mieles de *Apis mellifera* como se puede observar en la Tabla 13.

Como Ulloa *et al* (2010, pp.11-18) lo mencionaron, la diastasa es una enzima que está presente de forma natural en las mieles, la cual puede disminuir cuando ha sido sometida a temperaturas altas o durante el almacenamiento de las mieles. Los valores para el índice de diastasa obtenidos para las mieles de aguacate y eucalipto se encuentran dentro del rango recomendado para estas clases de mieles (>8 unidades Shade) según estándares Internacionales (EU Council, 2001). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que las muestras de estudio han sido correctamente procesadas y/o almacenadas en buenas condiciones permitiendo mantener la frescura de las mismas.

La conductividad eléctrica es un parámetro que analiza la concentración de sales minerales, proteínas y ácidos orgánicos presentes en las mieles, mediante el cual se permite establecer el origen botánico de las mismas e incluso conocer las características del suelo en donde las plantas están localizadas (Alvarez-Suárez *et al.*, 2017b, pp. 272-279). Además, puede indicar si las abejas fueron alimentadas con azúcares (Ulloa *et al.*, 2010, pp.11-18). Según los resultados obtenidos (Tabla 13), la miel de aguacate presentó una alta conductividad eléctrica en comparación con los valores obtenidos para la miel de eucalipto la cual se encuentra dentro del rango recomendado por el Codex Alimentarius y/o estándares internacionales (<0,8 mS/cm) (EU Council, 2001; CODEX STAN 12-1981, 2001). No obstante, a pesar del límite establecido por regulaciones internacionales, se ha encontrado que algunas mieles monoflorales como la de fresa, lima, breso, castaña y árbol de té han mostrado valores superiores a este límite, por lo que se consideran excepciones como lo menciona el Consejo de la Unión Europea (2001). Es así, que los datos presentados son consistentes con valores de conductividad eléctrica de mieles de aguacate de España e Israel que

de igual manera mostraron valores superiores a 0,8 mS/cm (Bentabol Manzanares et al., 2014; Dag et al., 2006; Terrab & Heredia, 2004), mientras que para la miel de eucalipto se encontraron valores similares a las mieles de eucalipto de España (Flores et al., 2014, pp. 2177-2191; Gomez et al., 2015, pp. 121-126). Por otro lado, de acuerdo a Zandamela (2008), el contenido de cenizas totales en mieles se encuentra muy relacionado con la conductividad eléctrica, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos (Tabla 13), pues la miel de aguacate presentó un alto porcentaje de cenizas ($p < 0,01$) en comparación con la miel de eucalipto que presenta un porcentaje dentro del rango normal para mieles *Apis mellifera* (<0,6%).

5.2. Determinación de compuestos bioactivos

El contenido de compuestos bioactivos como el contenido de fenoles, flavonoides, carotenoides fueron determinados como se observa en la Tabla 14. Estos resultados muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos tipos de mieles, en donde la miel de aguacate presentó los valores más altos en comparación con la miel de Eucalipto para cada uno de los parámetros analizados. Los resultados son consistentes con los estudios reportados por Álvarez-Suárez *et al* (2010a, pp. 9817- 9824) y Schencke *et al* (2016, pp.385-395) con respecto a la alta cantidad de polifenoles, flavonoides y carotenoides en mieles oscuras, en comparación con las mieles claras. Por lo tanto, la miel de aguacate, al haber sido clasificada como miel ámbar oscuro, presentó altas cantidades de los tres compuestos, mientras que la miel de eucalipto, clasificada como miel ámbar extra claro, presentó los más bajos. Como Schencke *et al* (2016, pp. 385-395) lo mencionaron, estos compuestos son los responsables en su mayoría del poder antioxidante y en tanto mayor sea la cantidad de estos compuestos, mayor poder antioxidante tendrá el producto.

Tabla 14.

Compuestos bioactivos determinados en las mieles monoflorales de estudio.

Compuestos bioactivos	Tipo de miel monofloral/Valor	
	Miel de aguacate	Miel de eucalipto
Contenido total de fenoles (mg GAE/100 de miel)	68.23 ± 5.79 ^a	47.71 ± 1.71 ^b
Contenido total de flavonoides (mg CE/100 g de miel)	4.25 ± 1.22 ^a	1.09 ± 0.24 ^b
Contenido total de carotenoides (mg β-caroteno/kg de miel)	2.24 ± 0.67 ^a	1.60 ± 0.33 ^b
Contenido total de aminoácidos libres (mg LE/100 g de miel)	83.46 ± 43.41 ^a	14.07 ± 3.20 ^b
Contenido de prolina total (mg Prol/100 g de miel)	1039.94 ± 53.31 ^a	140.82 ± 40.71 ^b

Nota: Los valores representados con letras son significativamente diferentes para $P < 0.05$

Como se puede observar, los resultados para el contenido total de aminoácidos libres y prolina (Tabla 14), evidenciaron que la mayor cantidad de estos compuestos están presentes en la miel de aguacate vs. la miel de eucalipto. De acuerdo a Álvarez-Suárez (2017a, pp. pp. 52-53) y da Silva *et al* (2016, pp. 309-323) existen tres posibles fuentes de aminoácidos en la miel: el polen (origen floral), néctar y las abejas mismas. Por tanto, en este caso la principal causa de la presencia de aminoácidos en las mieles podría ser el polen y néctar proveniente de ambos tipos florales. De tal forma, esto puede explicar en gran parte las diferencias entre los valores encontrados en ambos tipos de mieles monoflorales. Asimismo, como Ulloa *et al* (2010, pp.11-18) ya lo dijeron, a pesar de que los aminoácidos libres presentes en la miel no poseen un valor nutricional significativo, su determinación podría ser un parámetro para la evaluación de la maduración de la miel y de posibles adulteraciones con azúcar. Dado que el aminoácido que más predomina en la miel es la prolina, su determinación resulta de mucho interés, en donde de igual manera la miel de aguacate fue la que mayor cantidad de este aminoácido presentó (Tabla 14). Estudios previos han

obtenido valores similares con respecto a estos parámetros en relación al origen floral, en donde la miel de aguacate reportó el mayor contenido total de aminoácidos libres y prolina total en comparación con la miel de eucalipto (Bentabol Manzanares *et al.*, 2014, pp. 572-578; Flores *et al.*, 2014, pp. 2177-2191; Gomez *et al.*, 2015, pp. 121-126).

5.3. Determinación de Polifenoles por HPLC

Los distintos ácidos fenólicos que poseen los dos tipos de mieles en estudio fueron analizados e identificados por HPLC como se puede observar en las Figuras 8 y 9 para miel de aguacate y eucalipto respectivamente. En la Tabla 15 se pueden diferenciar los picos, con su respectiva longitud de onda, que indican la presencia de los ácidos fenólicos encontrados en la miel de aguacate y miel de eucalipto. Cabe mencionar que las condiciones de trabajo fueron adecuadas ya que la línea base no presentó ruido y por ende se puede concluir que los analitos estaban puros. Como se mencionó anteriormente, los polifenoles son los principales responsables de la capacidad antioxidante que posee la miel de abeja. Como Pyrzynska y Biesaga (2009, pp.893-894) ya lo mencionaron, el conocimiento de la composición fenólica de la miel, viene a ser una forma muy prometedora para el estudio del origen botánico y geográfico de las mieles. De tal manera, los resultados muestran la presencia de seis ácidos fenólicos, que también han sido previamente reportados en mieles monoflorales de Bangladesh y otros lugares (Ciulu, Spano, Pilo, & Sanna, 2016; I. A. A. da Silva *et al.*, 2013; Jáuregui *et al.*, 2014; Moniruzzaman *et al.*, 2014). Adicionalmente, se han encontrado ácidos fenólicos específicos para la miel de eucalipto tales como ácidos ferúlico, ácido cumárico, ácido cafeico, quercetina, ácido vanílico, ácido siringico (Ciulu *et al.*, 2016; Pyrzynska & Biesaga, 2009) los cuales se han identificado igualmente en el presente estudio. Por otro lado, para la miel de aguacate no hay suficientes estudios que reporten ácidos fenólicos, aún así se ha encontrado el ácido cumárico (Marshall, 2013), el mismo que se ha reportado en el presente estudio. Por consiguiente, como Ciulu *et al.*(2016, p.10) ya lo

dijeron, el perfil fenólico constituiría una herramienta muy importante para la autenticación y clasificación de las mieles.

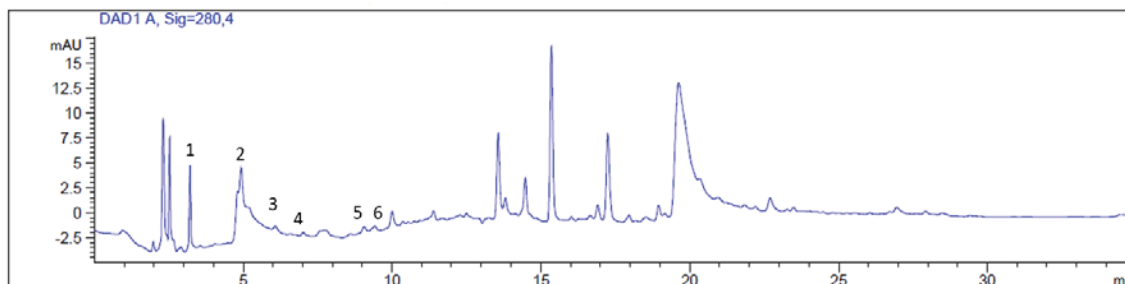


Figura 8. Análisis de la composición de ácidos fenólicos por HPLC de la miel de aguacate. Los picos indican los distintos ácidos fenólicos encontrados en este tipo de miel.

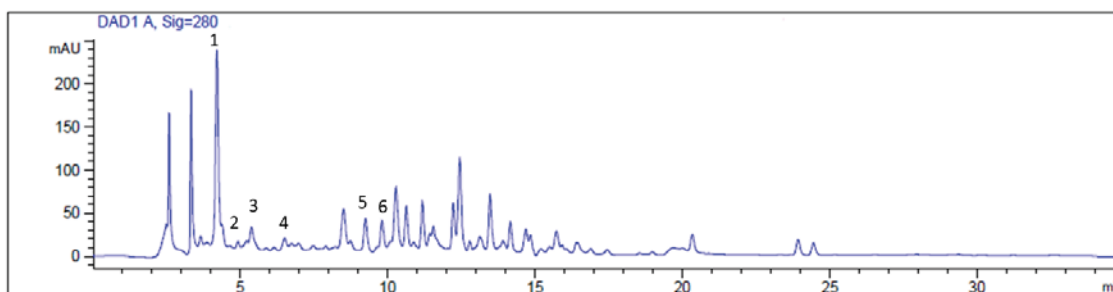


Figura 9. Análisis de la composición de ácidos fenólicos por HPLC de la miel de eucalipto. Los picos indican los distintos ácidos fenólicos encontrados en este tipo de miel.

Tabla 15.

Interpretación de los números señalados en los cromatogramas correspondientes a los picos de los ácidos fenólicos encontrados en las mieles de estudio.

Pico	Uv (nm)	Compuesto
1	255	Floroglucinol
2	260, 294	Ácido vanílico
3	298,324	Ácido cafeico

4	274	Ácido Siríngico
5	232,310	Ácido p-cumárico
6	296,322	Ácido ferúlico

5.4. Determinación de la capacidad antioxidante total

Se conoce que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante de la miel, ya que estos compuestos han presentado efectos preventivos contra una variedad de enfermedades como cáncer, desórdenes inflamatorios o cardiovasculares y envejecimiento, entre otras (Alvarez-Suárez, 2017a, pp.83-84; Schencke et al, 2016, pp.385-386).

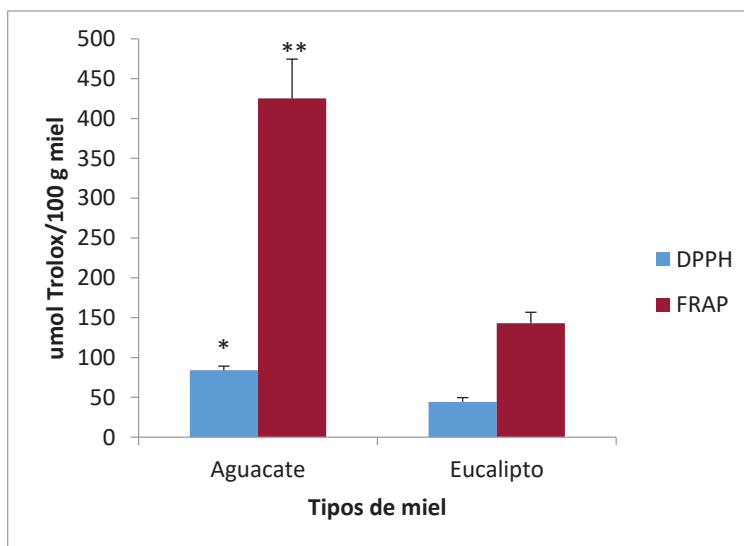


Figura 10. Capacidad antioxidante total; DPPH (umol Trolox/ 100 g de miel) y FRAP) (umol de trolox / 100 g de miel).

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar, en donde * $p < 0,005$ significativamente diferente entre ambos tipos de mieles y ** $p < 0,001$ altamente significativo entre ambos tipos de mieles.

En la Figura 10, se puede observar la capacidad antioxidante que poseen la miel de aguacate y miel de eucalipto. Para determinar la actividad antioxidante de estos productos se realizó dos ensayos: capacidad reductora del hierro (Fe) (FRAP) y capacidad de captar radicales libres DPPH*. Se tomó en cuenta una solución de miel artificial con el fin de evaluar la contribución que puedan tener los principales azúcares presentes en la miel en la capacidad antioxidante y posteriormente en la capacidad antimicrobiana. La miel artificial mostró una baja actividad de protección y/o actividad antioxidante lo que sugirió que los azúcares que predominan en la miel no contribuyen de forma significativa en la actividad biológica de las mieles, lo cual es consistente con lo previamente reportado por Gorjanovic *et al* (2013, pp.15-17).

Por otro lado, ambas mieles lograron reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} y atrapar el radical DPPH. Aún así, la miel de aguacate presentó diferencias significativas en cuanto al poder antioxidante ($p < 0,05$) en comparación con la miel de eucalipto. Esto es posible corroborar con estudios previos, en donde se ha demostrado que las mieles oscuras son las que mayor actividad antioxidante poseen, en comparación con mieles claras (Alvarez-Suárez, 2017a; Maurya *et al*, 2014; Oryan *et al.*, 2016; Schencke *et al*, 2016). Valores similares se encontraron en mieles de aguacate analizadas por Rodríguez-Carpenat *et al* (2011) y mieles de eucalipto por Ciappini *et al* (2013). Asimismo, estos resultados se correlacionan con el contenido polifenólico previamente expuesto, en donde la miel de aguacate presentó mayor contenido polifenólico y por ende mayor poder antioxidante. Adicionalmente, como Oryan *et al* (2016, pp.106-107) ya lo mencionaron, el origen botánico tiene un papel muy importante en la actividad antioxidante, en donde las proteínas y azúcares que contenga la miel pueden dar lugar a melanoidinas de alto peso molecular que son uno de los principales responsables de la capacidad de captación de radicales.

5.5. Capacidad de protección de la miel contra la peroxidación lipídica

Las mieles de estudio también fueron capaces de proteger a membranas de glóbulos rojos contra la peroxidación lipídica (Figura 11). Como se mencionó anteriormente, la miel artificial no contribuyó de forma significativa a la actividad biológica de la miel. La miel de aguacate (IC50 de 6.77 mg/mL) mostró una mayor capacidad para proteger las membranas de glóbulos rojos contra la peroxidación lipídica en comparación con la miel de eucalipto (IC50 de 16.13 mg/mL). Estos resultados son consistentes con investigaciones previas en donde se demuestra el efecto protector de la miel frente a la peroxidación de lípidos (Alvarez-Suarez et al., 2012b; Jubri, Rahim, & Aan, 2013; McKibben & Engeseth, 2002), en donde según Álvarez-Suarez *et al* (2012b, p.1508), la miel por medio de los compuestos bioactivos, sobretodo polifenólicos, contribuye a la estabilización de las paredes de la membrana celular, logrando reducir la peroxidación lipídica y con ello también la captura de los radicales libres presentes.

Adicionalmente, se ha demostrado que las mieles oscuras son las que mayor protección brindan a las membranas por las razones previamente expuestas (Alvarez-Suarez, Giampieri, Damiani, et al., 2012a; Alvarez-Suarez, Giampieri, Gonzalez-Paramás, et al., 2012b). Por consiguiente, se evidencia que existe una correlación entre el contenido polifenólico (flavonoides, caroteoides, etc.) vs capacidad antioxidante vs color y por ende también con el origen floral de las mieles (Vallianou, 2014; Oryan *et al.*, 2016).

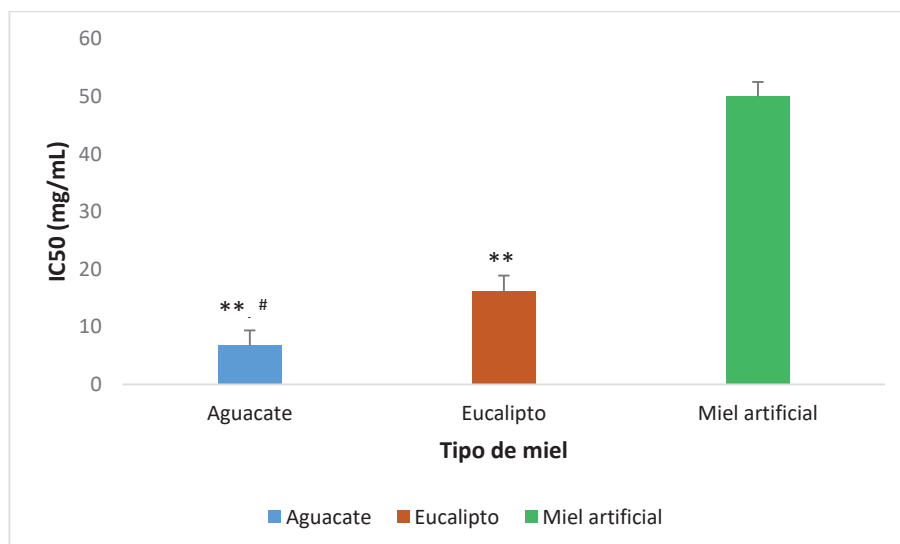


Figura 11. Efecto protector de la miel frente a la peroxidación lipídica-TBARS - IC50 (mg/mL).

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar, en donde ** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto a la miel artificial y # $p < 0,005$ significativamente diferente entre ambos tipos de mieles.

5.6. Capacidad antimicrobiana de la miel

Se realizó un estudio *in vitro* de la capacidad de la miel para inhibir biopelícula preformadas y de inhibir la formación de las mismas usando dos cepas bacterianas: una gram-positiva (*Staphylococcus aureus* CAMP) y una gram-negativa (*Klebsiella pneumoniae* KPC 609803) (Figura 12 y 13) teniendo como referencia a la miel artificial por lo previamente expuesto. Dado que muchas biopelículas bacterianas se establecen en heridas abiertas y crónicas y al presentar una organización estructural que les confiere resistencia a los mecanismos de defensa del huésped e incluso a ciertos antibióticos (Nazar, 2009, pp.61-72), resulta de mucha prioridad su estudio. Los resultados obtenidos demostraron la efectividad de ambas mieles, siendo la miel de aguacate la que mayor inhibición presentó en ambos casos con respecto a la miel de eucalipto. Aun así, se observó que la miel fue más efectiva inhibiendo la formación de la

biopelícula que inhibiendo la biopelícula preformada con las cepas bacterianas de prueba. La miel de aguacate y la miel de eucalipto fueron mucho más eficientes en la inhibición empleando una concentración del 20 % p/v (Figura 12 y 13). Estos resultados pueden ser corroborados por estudios realizados por Lu *et al*(2014), Nassar *et al*(2012), Maddocks *et al*(2012) y Alandejani *et al* (2009), los cuales confirman el efecto de la miel contra las biopelículas. Como Álvarez-Suárez (2017, pp.86-88) ya lo mencionó, el poder antibiopelícula/ antibacteriano puede variar según el origen floral, condiciones de almacenamiento o especies de abejas. La actividad antimicrobiana de la miel se debe a varios mecanismos como la presencia de peróxido de hidrógeno como producto de la acción de la enzima glucosa oxidasa en la glucosa; ciertas propiedades físico-químicas como el bajo pH y acidez que posee la miel o el alto contenido en azúcares provocando un efecto osmótico; y también se incluyen ciertos componentes como los polifenoles que también tienen un efecto antimicrobiano (Cortés *et al.*, 2011, pp.303-317; Ulloa *et al.*, 2010, pp.11-18). Por tanto, estos resultados sugieren una alternativa efectiva para el tratamiento de infecciones en donde se producen biopelícula e incluso combatir la conocida “resistencia bacteriana” ocasionada muchas veces por las formaciones de biopelícula.

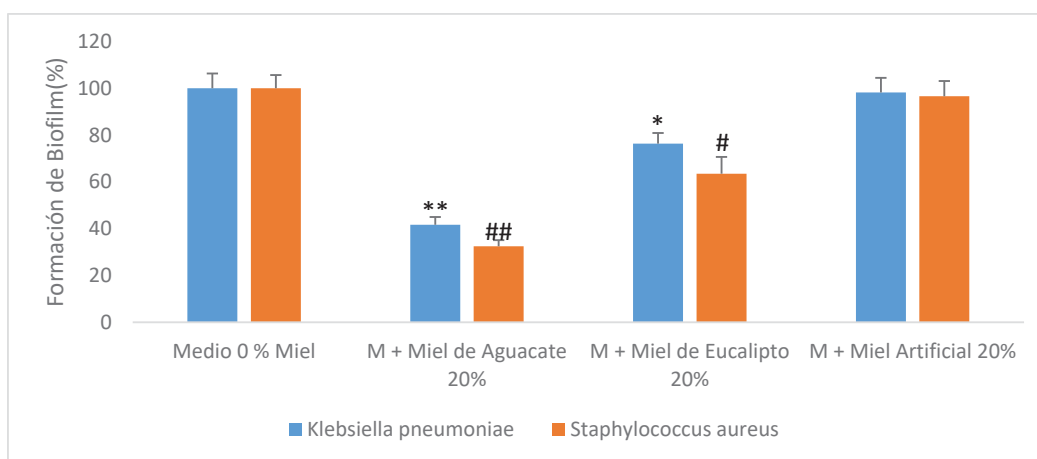


Figura 12. Porcentaje de inhibición de biopelícula preformada.

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar. * $p < 0,005$, # $p < 0,005$ significativamente diferente de la miel artificial y ** $p < 0,001$, ## $p < 0,001$ altamente significativo en comparación con la miel artificial.

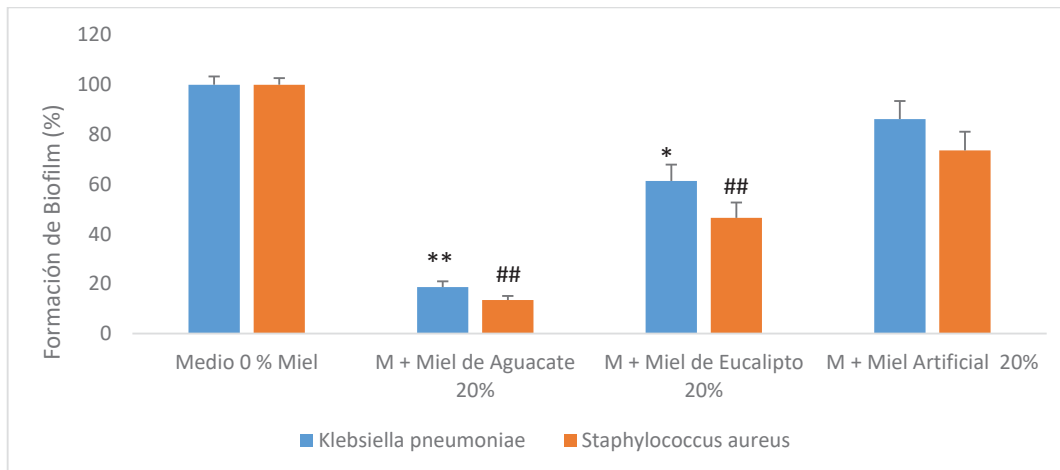


Figura 13. Porcentaje de inhibición de formación de biopelícula.

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar. * $p < 0,005$, # $p < 0,005$ significativamente diferente de la miel artificial y ** $p < 0,001$, ## $p < 0,001$ altamente significativo en comparación con la miel artificial.

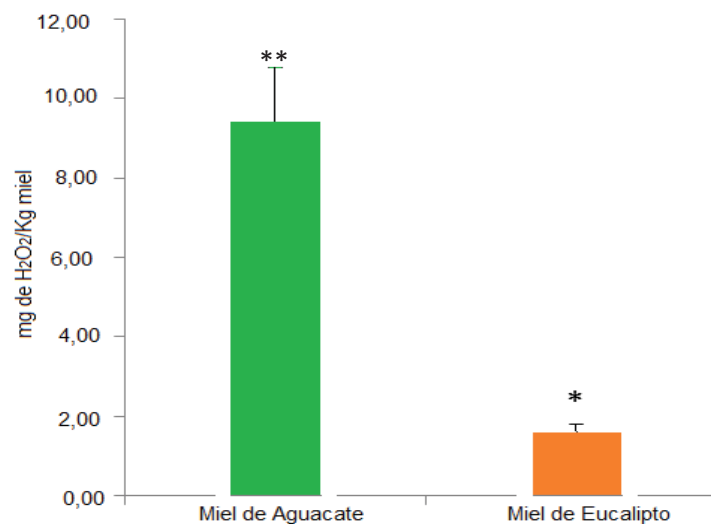


Figura 14. Contenido de Peróxido de hidrógeno en las mieles de aguacate y eucalipto.

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar, en donde * $p < 0,005$ significativamente diferente entre ambos tipos de mieles y ** $p < 0,001$ altamente significativo entre ambos tipos de mieles.

Los resultados obtenidos (Figura 14) mostraron que la miel de aguacate presentó un alto contenido de H_2O_2 en comparación con la miel de eucalipto. No obstante, la miel de eucalipto obtuvo un valor dentro del rango en reportes previos de mieles monoflorales de China (Li et al., 2017). Como ya se mencionó el peróxido de hidrógeno viene a ser uno de los compuestos más influyentes en la capacidad antimicrobiana de la miel. El contenido de peróxido de hidrógeno en miel depende de algunos factores que pueden estar involucrados en la producción o neutralización del mismo, como aquellos que puedan afectar a la enzima que lo produce (origen floral, temperatura y salud de las abejas), la catalasa derivada del polen que en efecto puede hidrolizar este compuesto en oxígeno y agua y la auto-oxidación de los polifenoles que pueden inactivar el H_2O_2 en la miel (Li et al., 2017, pp. 225-231; Oryan et al., 2016, p.102). De esta forma, estos resultados pueden estar influenciados por los distintos factores anteriormente mencionados sobretodo el origen floral, lo cual explicaría las diferencias entre ambos tipos de mieles.

Por otro lado, según Oryan *et al*(2016, pp.99-102) la presencia de ácido ascórbico en la miel puede promover la actividad antibacteriana del peróxido de hidrógeno, lo cual puede ser un factor que esté relacionado con la alta actividad antibiofilm que presentó la miel de aguacate al poseer una mayor cantidad de H_2O_2 .

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

El presente estudio permitió afirmar que existe una estrecha relación entre el origen floral vs. color vs. composición vs. capacidad antioxidante vs. capacidad antimicrobiana de la miel de abeja, donde las mieles más oscuras son las que reflejan mayor contenido de compuestos bioactivos y por ende mayor actividad biológica. Por otra parte, se pudo verificar que las mieles monoflorales producidas en el Ecuador cumplen con los parámetros de calidad establecidos por la Comisión Internacional de Miel de Abeja (IHC).

Las propiedades antimicrobianas que posee la miel resultan ser superiores y más efectivas que la mayoría de los antimicrobianos comunes. La miel es capaz de reducir la formación de biopelícula e incluso matar células bacterianas adheridas en la matriz. Estas observaciones pueden tener una gran importancia en implicaciones clínicas pues podrían llevar a un nuevo enfoque en el tratamiento de biopelículas relacionadas con infecciones.

6.2. Recomendaciones

Puede realizarse un estudio más amplio de otros tipos de mieles monoflorales de Ecuador así como su respectivo análisis de composición química y poder antioxidante, tomando en cuenta la región geográfica. Por otro lado, es posible realizar estudios complementarios para la determinación de ácido ascórbico con el fin de analizar su influencia en el peróxido de hidrógeno /actividad antimicrobiana. Asimismo, se pueden realizar pruebas *in vitro* de las mieles de estudio en células dérmicas humanas frente a la oxidación inducida por algún oxidante como AAPH, para verificar su efecto antioxidante.

Es importante que en cada ensayo se lleve a cabo bajo las mismas condiciones con su respectiva curva de calibración al mismo tiempo de su ejecución.

REFERENCIAS

- AGROCALIDAD. (2016). *Diseño de muestreo para determinar la prevalencia de loque americano y loque europeo y el porcentaje de nosemosis y varroosis en abejas melíferas de la región sierra del Ecuador*. Quito-Ecuador: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/02-control-zoosanitario/resolucion-0237-rt-sa-instructivo-para-la-prevencion-y-control-de-loque-americana-y-loque-europea-en-colmenares.pdf>
- Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R., & Chan, F. (2009). *Effectiveness of honey on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms*. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 141(1), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2009.01.005>
- Alvarez-Suárez, J. M. (2017a). *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. (Springer Link, Ed.). Quito-Ecuador.
- Alvarez-Suárez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparrini, M., González-Paramás, A. M., ... Battino, M. (2017b). *Apis mellifera vs Melipona beecheii Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties*. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.079>
- Álvarez-Suárez, J. M., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Fattorini, D., Regoli, F., ... Battino, M. (2012a). *Radical-scavenging Activity, Protective Effect Against Lipid Peroxidation and Mineral Contents of Monofloral Cuban Honeys*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0268-7>
- Alvarez-Suárez, J. M., Giampieri, F., Gonzalez-Paramás, A. M., Damiani, E.,

- Astolfi, P., Martinez-Sanchez, G., ... Battino, M. (2012b). *Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage*. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1508–1516. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.042>
- Álvarez-Suárez, J. M., González- Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., & Battino, M. (2010a). *Antioxidant characterization of native monofloral Cuban honeys*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9817–9824. <https://doi.org/10.1021/jf1018164>
- Álvarez-Suárez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010b). *Contribution of honey in nutrition and human health: A review*. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). *Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bentabol Manzanares, A., Hernández García, Z., Rodríguez Galdón, B., Rodríguez-Rodríguez, E. M., & Díaz Romero, C. (2014). *Physicochemical characteristics and pollen spectrum of monofloral honeys from Tenerife, Spain*. *Food Science and Technology*, 55(2), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.150>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay*. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bueno-Costa, F. M., Zambiasi, R. C., Bohmer, B. W., Chaves, F. C., Silva, W. P.

- da, Zanusso, J. T., & Dutra, I. (2016). *Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil*. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.018>
- Calderon, M., Schencke Figueroa, C., Arias, J. S., Sandoval, A. H., & Torre, F. O. (2015). *Combined therapy of Ulmo honey (Eucryphia cordifolia) and ascorbic acid to treat venous ulcers 1*. *Enfermagem Mar.-Apr*, 2323(22), 259–266. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.0020.2550>
- Chilena, N. (2007). *Miel de abejas - Determinación de la conductividad eléctrica*.
- Ciappini, M. C., Stoppani, F. S., Martinet, R., & Alvarez, M. B. (2013). *Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles , eucalipto y alfalfa*. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 15(19), 7.
- Ciulu, M., Spano, N., Pilo, M., & Sanna, G. (2016). *Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys*. *Molecules*, 21(4), 451. <https://doi.org/10.3390/molecules21040451>
- Corrales, L. C., & Muñoz, M. M. (2012). *Estrés oxidativo : origen , evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*. *Scielo*, 10, 213–225.
- Cortés, M. E., Vigil, P., & Montenegro, G. (2011). *The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation*. *Ciencia E Investigación Agraria*, 38(2), 303–317. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202011000200015>
- da Silva, I. A. A., da Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J. S., ... de Souza, A. G. (2013). *Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil*. *Food Chemistry*, 141(4), 3552–3558.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.072>

- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). *Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food Chemistry*, 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dag, A., Afik, O., Yeselson, Y., Schaffer, A., & Shafir, S. (2006). *Physical, chemical and palynological characterization of avocado (Persea americana Mill.) honey in Israel. International Journal of Food Science and Technology*, 41(4), 387–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01081.x>
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., & Pranzetti, V. (2010). El color en los alimentos: Determinación de color en mieles. *Invenio*, 13(25), 145–152.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Doi, E., Shibata, D., & Matoba, T. (1981). *Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Analytical Biochemistry*, 118(1), 173–184. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90175-5)
- Erejuwa, O. O. (2014). *Effect of honey in diabetes mellitus: Matters arising. Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 13(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-23>

- Flores, M. S. R., Escuredo Pérez, O., & Coello, M. C. S. (2014). *Characterization of eucalyptus globulus honeys produced in the eurosiberian area of the Iberian Peninsula. International Journal of Food Properties*, 17(10), 2177–2191. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.790050>
- Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Álvarez-Suárez, J. M., Mazzoni, L., ... Battino, M. (2017). *Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. Food and Chemical Toxicology*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.018>
- G Vallianou, N. (2014). *Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. General Medicine: Open Access*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2327-5146.1000132>
- Gomez, M. E. M., Hernandez, E. G., Gomez, J. Y. M., & Marin, J. L. M. (2015). *Physicochemical analysis of Spanish commercial Eucalyptus honeys. Journal of Apicultural Research*, 32(3–4), 121–126. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101296>
- González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á., & Heredia, F. J. (2005). *Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2574–2580. <https://doi.org/10.1021/jf048207p>
- Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suárez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., & Sužnjević, D. Ž. (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. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.12.004>

- Gutierrez, 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*. Universidad Politécnica Salesiana sede quito.
- Hadagali, M. D., & Chua, L. S. (2014). *The anti-inflammatory and wound healing properties of honey*. *European Food Research and Technology*, 239(6), 1003–1014. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2297-6>
- HATANO, T., KAGAWA, H., YASUHARA, T., & OKUDA, T. (1988). *Two new flavonoids and other constituents in licorice root. Their relative astringency and radical scavenging effects*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 2090–2097. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.2090>
- Jaramillo, F., & Valdivia, A. (2016). *Fundamentos de estrés oxidativo celular*. (U. A. de Aguascalientes, Ed.). México.
- Jáuregui, A. M., Alvarado-Ortiz, C., Castañeda, B. C., Quiroz, J. R., & Yarasca, Á. (2014). *Mieles Peruanas De Diferentes Fuentes Florales Determination of Phenolic Compounds , Total Flavonoids and Antioxidant Activity in Peruvian Honey From Different Flower Sources*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 80(4), 287–297.
- Jubri, Z., Rahim, N. B. A., & Aan, G. J. (2013). *Manuka honey protects middle-aged rats from oxidative damage*. *Clinics*, 68(11), 1446–1454. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(11\)11](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(11)11)
- Li, D., Wang, M., Cheng, N., Xue, X., Wu, L., & Cao, W. (2017). *A modified FOX-1 method for Micro-determination of hydrogen peroxide in honey samples*. *Food Chemistry*, 237, 225–231.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.065>

- López, M. (2014). *Efecto de la humedad de la miel y temperatura de descristalizado en la calidad de la miel procesada Efecto de la humedad de la miel y temperatura de descristalizado en la calidad de la miel procesada*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Lu, J., Turnbull, L., Burke, C. M., Liu, M., Carter, D. A., Schlothauer, R. C., ... Harry, E. J. (2014). *Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by Staphylococcus aureus strains with different biofilm-forming abilities*. *PeerJ*, 2, e326. <https://doi.org/10.7717/peerj.326>
- Maddocks, S. E., Lopez, M. S., Rowlands, R. S., & Cooper, R. A. (2012). *Manuka honey inhibits the development of Streptococcus pyogenes biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins*. *Microbiology*, 158(3), 781–790. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053959-0>
- Marshall, S. M. (2013). *Identification and Concentration of Phenolic and Carbonyl compounds in Florida honeys*. UNIVERSITY OF FLORIDA. Recuperado el 3 de enero del 2018 de: http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/UF/E0/04/55/10/00001/MARSHALL_S.pdf
- Maurya, S., Kushwaha, A. K., Singh, S., & Singh, G. (2014). *An overview on antioxidative potential of honey from different flora and geographical origins*. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5(1), 9–19. Recuperado el 5 de enero de 2018 de <http://op.niscair.res.in/index.php/IJNPR/article/view/989>
- McKibben, J., & Engeseth, N. J. (2002). *Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground Turkey*. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 50(3), 592–595. <https://doi.org/10.1021/jf010820a>

Moniruzzaman, M., Yung An, C., Rao, P. V., Hawlader, M. N. I., Azlan, S. A. B. M., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2014). *Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from bangladesh by high performance liquid chromatography: Determination of antioxidant capacity. BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/737490>

Muñoz-Jáuregui, A., Alvarado-Ortiz, C., Blanco-Blasco, T., Castañeda-Castañeda, B., Ruiz-Quiroz, J., & Alvarado-Yarasca, A. (2014). Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Scielo- Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 80(4), 287–297.

Nassar, H. M., Li, M., & Gregory, R. L. (2012). *Effect of honey on Streptococcus mutans growth and biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 536–540. <https://doi.org/10.1128/AEM.05538-11>

Nazar, J. (2009). Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 67, 61–72. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>

Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2016). *Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. Journal of Tissue Viability*, 25(2), 98–118. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2015.12.002>

Pyrzynska, K., & Biesaga, M. (2009). *Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015>

- Quintanilla, C. (2000). *Alimentos-Miel-Especificaciones Y Metodos De Prueba*.
- Rodríguez, E. (2014). *La Miel en el Tratamiento de Heridas*. Universidad de Cantabria. Recuperado el 5 de Enero de 2018 de <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5243/MartinezGiraoRA.pdf?sequence>
- Rojas, M., & Martínez, T. (2010). Lípidos y Salud. *Cenipalma*, 10(3), 1–8.
- Sanz, S. (1994). Humedad, cenizas y conductividad eléctrica de mieles de la Rioja. *Dialnet-Universidad de La Rioja*, 143–158. Recuperado el 28 de diciembre de 2017 de: <file:///E:/Downloads/Dialnet-HumedadCenizasYConductividadElectricaDeMielesDeLaR-110288.pdf>
- Schencke, C.; Vásquez, B.; Sandoval, C.; Sol, M. (2016). El Rol de la Miel en los Procesos Morfofisiológicos de Reparación de Heridas. *Int.J.Morphol*, 34(1), 385–395. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000100056>
- Slinkard, K., & Singleton, V. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.030>
- Terrab, A., & Heredia, F. J. (2004). *Characterisation of avocado (Persea americana Mill) honeys by their physicochemical characteristics*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1801–1805. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1888>
- Tetteh, M. M. (2012). ¿ Qué es el Estrés Oxidativo ? *Environmental Health Fact Sheet*, 1–2. Recuperado el 5 de enero de 2018 de <http://ehscc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf>

Ulloa, J. A., Cortez, P. M. M., Rodríguez, Q. F. B. R. R., Alberto, Q. F. B. J., Vázquez, R., Petra, M. C., & Ulloa, R. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*, 4(4), 11–18. Recuperado el 28 de diciembre de 2018 de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/01-04/2.pdf>

Zandamela Mungói, E. M. F. (2008). *Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de mozambique*. Universitat Autònoma de Barcelona. Recuperado el 28 de diciembre de 2017 de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5701/emfzm1de1.pdf?sequence=1>

