



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE
DOS MUESTRAS DE MIELES ECUATORIANAS

ORDOÑEZ CAIMINAGUA DAYANA CAROLINA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

VALAREZO RODRIGUEZ ANGIE MICHELLE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA Y
BIOLÓGICA DE DOS MUESTRAS DE MIELES ECUATORIANAS

ORDOÑEZ CAIMINAGUA DAYANA CAROLINA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

VALAREZO RODRIGUEZ ANGIE MICHELLE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE DOS
MUESTRAS DE MIELES ECUATORIANAS

ORDOÑEZ CAIMINAGUA DAYANA CAROLINA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

VALAREZO RODRIGUEZ ANGIE MICHELLE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MARQUEZ HERNANDEZ INGRID

MACHALA, 12 DE SEPTIEMBRE DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE DOS MUESTRAS DE MIELES ECUATORIANAS, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

MARQUEZ HERNANDEZ INGRID
0959479577
TUTOR - ESPECIALISTA 1

CUESTA RUBIO OSMANY
0959164716
ESPECIALISTA 2

DUTAN TORRES FAUSTO BALDEMAR
0705193183
ESPECIALISTA 3

Machala, 12 de septiembre de 2019

trabajo de titulación Dayana-Angie

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

1%

FUENTES DE
INTERNET

0%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

www.ceniap.gov.ve

Fuente de Internet

<1%

2

M. Lutz, Y. Cajas, C. Henríquez. "Phenolics content and antioxidant capacity of Chilean grapes cv. País and Cabernet Sauvignon", CyTA - Journal of Food, 2012

Publicación

<1%

3

Submitted to Universidad Estatal a Distancia

Trabajo del estudiante

<1%

4

Submitted to Universidad del Valle

Trabajo del estudiante

<1%

5

www.unodc.org

Fuente de Internet

<1%

6

www.scielo.org.co

Fuente de Internet

<1%

7

www.researchgate.net

Fuente de Internet

<1%

8

H. M. Sbihi, I. A. Nehdi, C. P. Tan, S. I. Al-

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Las que suscriben, ORDOÑEZ CAIMINAGUA DAYANA CAROLINA y VALAREZO RODRIGUEZ ANGIE MICHELLE, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE DOS MUESTRAS DE MIELES ECUATORIANAS, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 12 de septiembre de 2019



ORDOÑEZ CAIMINAGUA DAYANA
CAROLINA
2101114169



VALAREZO RODRIGUEZ ANGIE MICHELLE
0750200008

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho amor a Dios por darme la fortaleza, sabiduría e inspiración para continuar en este proceso de cumplir mi meta más deseada.

A mis padres, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo que me han brindado durante todos estos años en mi carrera, he llegado hasta aquí y convertirme en lo que soy, por ser mi mayor fuerza y motivación, sobre todo porque me han otorgado ese apoyo incondicional, económico y los consejos necesarios para culminar con éxito este trabajo investigativo.

A mi tía Alina, por apoyarme en todo momento y sobre todo por tener fe en mí, en que soy capaz de lograr cualquier cosa que me proponga.

A mis hermanos por su presencia en todo momento y brindarme su apoyo moral en esta etapa tan importante en mi vida.

Angie Michelle Valarezo Rodríguez

A Dios, quien ha sido mi guía durante toda mi carrera, por haberme permitido lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí, todo esto te lo debo a ti.

A mis abuelitos, por ser mi pilar fundamental, que siempre estuvieron conmigo, brindándome su confianza y palabras de aliento para continuar y no decaer en mi carrera.

A mis hermanos quienes me han brindado su apoyo en todo momento y han compartido los mejores momentos de mi vida.

A mi tía querida Anita, por ser una gran mujer y ayudarme en todo momento.

Dayana Carolina Ordoñez Caiminagua

AGRADECIMIENTO

A nuestros familiares que con su esfuerzo y dedicación nos ayudaron a culminar nuestra carrera universitaria.

A nuestra tutora la Lcda. Ingrid Márquez Hernández PhD, a nuestro cotutor el Lcdo. Osmany Cuesta Rubio PhD y a la Lcda. Mercedes Campos Hernández PhD por brindarnos su tiempo, dedicación, paciencia y sus valiosos conocimientos para realizar nuestro trabajo de investigación, ayudarnos día a día a crecer como buenos profesionales y sobre todo por brindarnos su apoyo y amistad incondicional.

A nuestros amigos con quienes hemos logrado muchas experiencias y nos han acompañado durante este proceso.

Sobre todo agradecemos a Dios por ser nuestro guía en el transcurso de nuestras vidas, brindándonos paciencia y sabiduría para culminar con éxito nuestras metas propuestas.

Angie Michelle Valarezo Rodriguez
Dayana Carolina Ordoñez Caiminagua

RESUMEN

La miel ha sido utilizada desde tiempos ancestrales por sus bondades terapéuticas. Presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, entre otras, que ya se han demostrado científicamente.

En las etapas iniciales de la comercialización de las mieles, estas eran producidas por abejas de la especie *Apis mellifera* (europea); sin embargo, al decursar del tiempo, estas se mezclaron con otras subespecies, en particular la *Apis mellifera scutellata*, de origen africano.

La adulteración de las mieles ha sido un grave problema al cual se ha enfrentado el hombre históricamente y hasta la actualidad. Por eso, numerosas organizaciones mundiales, y de forma particular en la mayoría de los países, han creado un conjunto de reglamentaciones, para declarar como aptas para la comercialización y el consumo a las mieles. Estas consisten en evaluar un conjunto de parámetros que demuestren la autenticidad de las mismas, y que conlleven a determinaciones físico-químicas y químicas. También permiten evaluar la edad y estabilidad de las mismas.

Se ha evidenciado, que la potencia de los efectos farmacológicos de las mieles, incluso la diversidad de sus actividades, depende directamente de la composición química particular que presente. Resulta entonces imprescindible desarrollar. Conjuntamente los estudios químicos con los biológicos. Sumado a esto se encuentra el hecho de la inexistencia de estudios sobre composición química en mieles del Ecuador.

Por ello el presente trabajo tiene como finalidad evaluar propiedades físico-químicas, químicas y biológicas de mieles de abejas de la especie *Apis Mellifera Africanizada*, de diferentes entornos geográficos, a través de métodos recomendados en la literatura especializada, para la determinación de semejanzas y diferencias entre ellas.

Los parámetros físico-químicos que se determinaron fueron: color, por ciento de humedad, índice de refracción, densidad relativa, grados Brix, por ciento de azúcar invertido, pH, conductividad y cenizas. Todas las mediciones estuvieron basadas en métodos recomendados

en la literatura especializada. Su determinación permitió reconocer que se encontraban dentro de los rangos establecidos según las normativas reportadas para mieles, con discretas diferencias entre las muestras.

Los análisis químicos se desarrollaron a través de métodos espectroscópicos y a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAE). Se llevaron a cabo estudios para detectar algunos minerales presentes en las muestras, así como sustancias de naturaleza fenólica y ácida. Los principales minerales detectados fueron: potasio, fósforo, calcio y magnesio. Los estudios a través de CLAE acoplada a espectrometría de masas (EM) permitieron identificar la presencia de ácidos grasos, compuestos fenólicos y flavonoides en las dos muestras. Se detectaron también diferencias entre ambas muestras objeto de estudio.

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de compuestos fenólicos y se evaluó la capacidad antioxidante de las mieles mediante el método de DPPH. La muestra proveniente de Zaruma mostró mayor contenido de compuestos fenólicos y una mejor capacidad antirradicálica respecto a la muestra procedente de Santa Rosa.

Los estudios realizados permitieron establecer diferencias en cuanto al color, el pH, porcentaje de humedad, la conductividad, densidad relativa, por ciento de azúcar invertido, la composición química, tanto de minerales como de compuestos fenólicos y ácidos y en la capacidad secuestradora de radicales libres para ambas muestras. No se encontraron diferencias en cuanto a los valores de índice de refracción, grados Brix y por ciento de cenizas.

Palabras claves: *Apis Mellifera*, composición química, compuestos fenólicos, CLAE.

ABSTRACT

Honey has been used since ancient times for its therapeutic benefits. It has antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer properties, among others, which have already been scientifically proven.

In the initial stages of the marketing of honey, these were produced by bees of the species *Apis mellifera* (European); however, as time went by, they mixed with other subspecies, in particular the *Apis mellifera scutellata*, of African origin.

The adulteration of the honey has been a serious problem that man has faced historically and to the present. That is why many world organizations, and in particular in most countries, have created a set of regulations, to declare the honey as suitable for marketing and consumption. These consist of evaluating a set of parameters that demonstrate their authenticity, and that lead to physical-chemical and chemical determinations. They also allow assessing their age and stability.

It has been shown that the potency of the pharmacological effects of honey, including the diversity of its activities, depends directly on the particular chemical composition it presents. It is therefore essential to develop. Together the chemical studies with the biological ones. Added to this is the fact that there are no studies on chemical composition in honey in Ecuador.

Therefore, this work aims to evaluate physical-chemical, chemical and biological properties of honey bees of the species *Apis Mellifera Africanizada*, from different geographical environments, through methods recommended in the specialized literature, for the determination of similarities and differences between them.

The physicochemical parameters that were determined were: color, moisture percent, refractive index, relative density, Brix degrees, percent sugar inverted, pH, conductivity and ash. All measurements were based on methods recommended in the specialized literature. Their determination allowed us to recognize that they were within the ranges established

according to the regulations reported for honey, with discrete differences between the samples.

Chemical analyzes were developed through spectroscopic methods and through High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Studies were conducted to detect some minerals present in the samples, as well as substances of phenolic and acidic nature. The main minerals detected were: potassium, phosphorus, calcium and magnesium. The studies through HPLC coupled to mass spectrometry (MS) allowed to identify the presence of fatty acids, phenolic compounds and flavonoids in the two samples. Differences were also detected between both samples under study.

The Folin-Ciocalteu method was used for the quantification of phenolic compounds and the antioxidant capacity of the honey was evaluated by the DPPH method. The sample from Zaruma showed a higher content of phenolic compounds and a better anti-radical capacity compared to the sample from Santa Rosa.

The studies carried out allowed to establish differences in color, pH, moisture percent, conductivity, relative density, percent sugar invested, chemical composition, both minerals and phenolic compounds and acids and the sequestration capacity of Free radicals for both samples. No differences were found in terms of refractive index values, Brix degrees and percent ash.

Keywords: *Apis Mellifera*, chemical composition, phenolic compounds, HPLC.

CONTENIDO

	Pag.
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN.....	14
PROBLEMA CIENTÍFICO	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	17
I.1 Producción de miel en Ecuador	17
I.2 Generalidades miel abeja	17
I.3 Propiedades físico-químicas de la miel de abeja.	18
I.3.1 Color.....	19
I.3.2 Contenido de humedad.....	20
I.3.3 Índice de refracción.....	21
I.3.4 Densidad.....	21
I.3.5 pH.....	21
I.3.6 Conductividad eléctrica.....	22
I.3.7 Cenizas totales y minerales	22
I.4 Composición química	23
I.5 Métodos de detección y cuantificación de fenoles	24

I.5.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)	24
I.5.2 Cromatografía gaseosa (CG).....	24
I.5.3 Cromatografía en capa delgada (CCD)	25
I.6 Usos – propiedades de las mieles	25
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.	27
II.1 Recolección y procesamiento de la muestra.....	27
II.2 Parámetros químico-físicos	27
II.2.1 Determinación de color.....	27
II.2.2 Contenido de humedad, índice de refracción, grados Brix y por ciento de azúcar invertido.....	28
II.2.3 Determinación de densidad.....	28
II.2.4 Determinación de pH y conductividad eléctrica.....	28
II.2.5 Determinación de cenizas totales.....	29
II.3 Determinación de minerales	29
II.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE-EM)	29
II.5 Cuantificación de compuesto fenólicos.....	30
II.5.1 Preparación del patrón	30
II.6 Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH	30
II.7 Análisis estadístico	31
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO V. RECOMENDACIONES	57
CAPÍTULO VI. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	58
ANEXOS	72

LISTA DE TABLA

	Pag.
Tabla 1. Diferentes tipos de color en miel según la escala mm Pfund ^{23,24}	19
Tabla 2. Relación entre los valores de humedad ambiental y contenido de humedad en las mieles ^{30,31}	20
Tabla 3. Composición química general que se presenta en las mieles de la especie <i>Apis mellifera</i>	23
Tabla 4. Resultados correspondientes a las determinaciones de los parámetros químico-físicos ensayados.	32
Tabla 5. Minerales identificados en muestras de miel de Zaruma y Santa Rosa.	37
Tabla 6. Minerales más abundantes encontrados en las muestras objeto de estudio y reportados por algunos autores.	39
Tabla 7. Compuestos sugeridos a partir del análisis CLAE-EM/ESI para la muestra 1.	41
Tabla 8. Compuestos sugeridos a partir del análisis CLAE-EM/ESI para la muestra 2.	44
Tabla 9. Compuestos reportados en mieles de diferentes orígenes.	47
Tabla 10. Resultados de la correlación entre la absorbancia y el ácido gálico.	52

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1: Cromatogramas CLAR obtenidos para las muestras de mieles	40
Figura 2. Curva de calibración obtenida para el ácido gálico.....	51
Figura 3. Relación actividad antioxidante / % de fenoles totales para las muestras objeto de estudio.....	54

INTRODUCCIÓN

Existen en el mundo más de 20 000 especies de abejas. Difieren en numerosas características anatómicas, morfológicas e incluso en su comportamiento social. Sin embargo, todas comparten el hábito de visitar flores para coleccionar alimento, de ahí que se les conozca como antófilos (Anthophila); “que aman las flores”. Las abejas pueden localizarse en todos los continentes, excepto en la Antártida; dondequiera que habiten plantas con flores. Se alimentan fundamentalmente de polen y néctar. La especie más conocida es la *Apis mellifera*, conocida también como abeja doméstica o abeja. Esta especie es social, vive en enjambres y en ella existen tres clases: reinas, obreras y zánganos ¹.

Existen numerosos productos que se elaboran en las colmenas: jalea real, miel, polen (pan de abejas), propóleos y cera. Los primeros son utilizados directamente para su alimentación, el propóleos como material de defensa y la cera como material de construcción. De los productos para la alimentación, el que se produce en mayor cantidad es la miel ^{2,3}.

Las mieles se clasifican desde varios puntos de vistas, por ejemplo, tomando en consideración su color pueden ser claras, ámbar claro, oscuras etcétera. Según su origen pueden considerarse como uniflorales, multiflorales, de mielada ⁴.

La adulteración de las mieles ha sido un grave problema al cual se ha enfrentado el hombre históricamente y hasta la actualidad. Por eso numerosas organizaciones mundiales y de forma particular en la mayoría de los países, han creado un conjunto de reglamentaciones, para declarar como aptas para la comercialización y el consumo a las mieles. Estas consisten en evaluar un conjunto de parámetros que demuestren la autenticidad de las mismas y que conllevan a determinaciones físico-químicas y químicas. También permiten evaluar la edad y estabilidad de las mismas ⁵.

La miel es conocida por sus propiedades nutricionales, y posee, entre otras, actividad antiinflamatoria y analgésica debido a su composición química. Esta varía dependiendo de la fuente del néctar, el clima, la ubicación geográfica de las colmenas y la especie de la abeja.

Dentro de su composición se encuentran enzimas, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales ⁶.

La composición química de la miel ha sido estudiada utilizando métodos analíticos instrumentales convencionales y de alta precisión, siendo los más utilizados los métodos cromatográficos (CLAE) y espectroscópicos. Esto ha permitido conocer la composición química de la miel de diferentes países, tomando estos como referente para el estudio de la composición química de otras mieles ^{7,8}.

Estudios actuales mencionan que la miel también ejerce propiedades antibacterianas, anti mutagénicas, anticancerígenas e inmunosupresoras encargadas de fortalecer y proteger al sistema inmunitario ⁹.

Según estudios realizados desde el 2012 hasta el 2016, la exportación de mieles en el Ecuador ha generado muchas ganancias. Son varios los países que importan la miel, siendo Estados Unidos el principal consumidor de mieles ecuatorianas ^{10,9}.

Tomando en consideración todos los aspectos presentados, se impone la necesidad de desarrollar estudios de caracterización de mieles del Ecuador por lo que en este trabajo se propone:

PROBLEMA CIENTÍFICO

¿Existen variaciones en las propiedades físico-químicas, químicas y biológicas de las mieles cuando son colectadas en diferentes entornos geográficos?

HIPÓTESIS

Las diferentes localizaciones geográficas de las mieles condicionan diferencias en las propiedades físico-químicas, químicas y biológicas de las mismas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar propiedades físico-químicas, químicas y biológicas de mieles de abejas de la especie *Apis Mellifera Africanizada*, de diferentes entornos geográficos, a través de métodos recomendados en la literatura especializada, para la determinación de semejanzas y diferencias entre ellas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer parámetros físico-químicos de las muestras objeto de estudio.
2. Aplicar métodos para la determinación de la composición química presente en las muestras de mieles.
3. Examinar la capacidad secuestradora de radicales libres de las muestras.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Producción de miel en Ecuador

El Ecuador es un país que se dedica mayormente a la producción agrícola y a la acuicultura. Sin embargo, la exportación de mieles de abeja, se ha impuesto al ser un producto con mucha demanda en el mercado europeo y estadounidense ¹⁰.

Según estudios realizados desde el 2012 hasta el 2016, la exportación de mieles en el Ecuador ha generado muchas ganancias. Son varios los países que importan la miel, siendo Estados Unidos el principal consumidor de mieles ecuatorianas ^{10,11}.

Estudios afirman que la obtención de la miel proviene mayormente de la apicultura transhumante entre la costa y la sierra, el cual es el traslado de la colmena de una localización a otra ^{10,11}.

La mayoría de los apicultores artesanales distribuyen sus productos en mercados regionales y nacionales y para su autoconsumo. En cuanto a los materiales que estos poseen para la obtención de miel, muchos cuentan con salas de cosecha propias, en cambio los apicultores que no tienen la maquinaria necesaria, emplean un método más artesanal el cual consiste en el escurrimiento de los panales desoperculados ^{11,12}

1.2 Generalidades de la miel de abeja

La miel, desde tiempos ancestrales, ha formado parte de la vida del ser humano. Ha sido reconocida por sus propiedades curativas y nutricionales ¹³. En las etapas iniciales de la comercialización de las mieles, estas eran producidas por abejas de la especie *Apis mellifera* (europea); sin embargo, al decursar del tiempo, estas se han mezclado con otras subespecies, en particular la *Apis mellifera scutellata*, de origen africano. Esta hibridación (abejas africanizadas) se desarrolló con vistas a generar especies con mayor reproductibilidad así como mayor producción de miel ¹⁴.

Existen indicios que en 1956 se introdujeron las primeras abejas africanas al continente sudamericano, con el fin de adaptar estas dos especies de abejas (*Apis mellifera europea* y *Africana*) y generar una mejor adaptación de las mismas al clima tropical, lograr mayores niveles de reproducción entre ellas, así como una productividad mayor de miel ³. El país donde se produjo esta introducción fue Brasil, que contiene abundante flora y vegetación exuberante. En esta región se acoplaron rápidamente a sus condiciones climáticas y entorno geográfico, ocurriendo la hibridación de las mismas ¹².

La miel es una sustancia viscosa, gelatinosa, formada a partir del néctar de flores, secreciones de plantas silvestres vivas y excreciones de animales colectores de néctar. Estas son recolectadas, transformadas, deshidratadas y almacenadas por las abejas en colmenas, para la obtención y posterior maduración de la miel ^{12,15,16}.

Existen numerosas variedades de miel que se caracterizan y se diferencian por una serie de rasgos, entre los que se encuentran: olor, sabor, pH, humedad. Estos varían y dependen del hábitat de las abejas, de las diferentes fuentes de plantas, flores, así como la zona (suelos), clima y entornos geográficos donde la abeja visita y recolecta el néctar necesario para la producción de miel. También los métodos de recolección que utilizan los apicultores influyen en las características de las mieles ^{17,18}.

1.3 Propiedades físico-químicas de la miel de abeja.

Las propiedades físico-químicas, al igual que la calidad de la miel y sus componentes dependen específicamente del entorno geográfico, suelos, condiciones climáticas, plantas silvestres y flores nativas de cada región, entre otros ¹⁸.

Los parámetros físico-químicos que se las determinan a las mieles para evaluar su calidad o para clasificarlas son: contenido de humedad, índice de refracción, densidad, pH, conductividad, cenizas totales, entre otros. El anexo 1 muestra la información de los parámetros que constituyen controles de calidad de las mieles, así como los límites establecidos en algunas normativas.

1.3.1 Color

El color de la miel depende de muchos factores, como es el origen botánico, la composición floral, la época de recolección y el almacenamiento, la edad de la miel, entre otras ¹⁹. La miel posee una variedad de tonalidades, desde los más claros hasta oscuros como ámbar y marrón oscuro ^{19,20,21}.

Estudios afirman que la presencia de cantidades mayoritarias de flavonoides y fenoles totales son los responsables del color más oscuro en mieles ²². Otros plantean que son los minerales los responsables o que es la presencia de hidroximetilfurfural, o que son las proteínas ²³. Por otra parte, se considera que las variaciones en el color de la miel son debido a la presencia de pigmentos (carotenoides, clorofilas y xantofilas) y que son estos los que diferencian entre una miel clara y otra oscura ^{22,24}. En muchas ocasiones, si las colmenas son muy viejas u oscuras, aumentan el color natural de la miel, al disolverse en ella los pigmentos retenidos en las celdas ²⁵. Por tanto, tomar en consideración el color de las mieles como parámetro determinante del origen botánico y geográfico de las mieles es controvertido dada su naturaleza multifactorial ²⁶.

Paralelamente a la descripción del color en términos sensoriales, la clasificación de las mieles según esta propiedad se realiza mediante el comparador colorimétrico visual “Pfund”, atendiendo a una escala que comprende los colores desde el blanco agua hasta el ámbar oscuro tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Diferentes tipos de color en miel según la escala mm Pfund.

Valores mm	Coloración
0 - 8 mm	blanco agua
9 - 17 mm	blanco extra
18 - 34 mm	blanco
35 - 48 mm	ámbar extra claro
49 - 83 mm	ámbar claro

84 - 114 mm	ámbar
> 114 mm	ámbar oscuro
Fuente	23,24

1.3.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad se define como la cantidad de agua que presenta una muestra (miel). Es uno de los indicadores de calidad más importantes que se exigen para las mieles, dado que un alto contenido de agua provoca la aparición de procesos fermentativos en las mismas. Los valores que se exigen en cuanto al contenido de humedad en las mieles se encuentran entre un 13 y un 25,4 %, existiendo algunos países que exigen sólo valores menores al 20% ^{25,26,27}.

Los factores que fundamentalmente inciden en los contenidos de agua en las mieles son la falta de maduración de las mismas y los problemas tecnológicos durante su recolección, en particular los envases, que juegan un papel preponderante dado la alta higroscopicidad de las mieles ²⁸. La humedad ambiental también es un factor que incide en este parámetro ²⁹. La tabla 2 muestra la relación existente entre estos.

Tabla 2. Relación entre los valores de humedad ambiental y contenido de humedad en las mieles.

Humedad relativa (%)	Contenido de agua en la miel (%)
50,0	15,9
55,0	16,8
60,0	18,3
65,0	20,9
70,0	24,2
75,0	28,3

80,0	33,1
Fuente	<i>30,31</i>

1.3.3 Índice de refracción

El índice de refracción es una magnitud relacionada indirectamente con el contenido de agua de las mieles, siendo esto el valor máspreciado que se le da a este parámetro.

Los valores más frecuentes de índice de refracción en mieles, oscilan entre 1,4861 y 1,5044 para mieles florales ²⁹. A mayor contenido de sólidos (menos agua), aumenta el valor de los índices de refracción. Este parámetro no está relacionado con el origen botánico de las mieles. El anexo 2 muestras la relación entre el contenido de agua en las mieles y el índice de refracción a diferentes temperaturas.

1.3.4 Densidad

La densidad en las mieles constituye un parámetro de calidad para las mismas. Los valores establecidos para este parámetro oscilan entre 13900 y 14220 Kg/m³. Es un parámetro que se encuentra muy relacionado al por ciento de humedad y la viscosidad. Las mieles con un mayor por ciento de agua presentarán menores valores de densidad relativa y menor viscosidad ³².

1.3.5 pH

El pH que normalmente se encuentra en la miel es ácido. Los componentes químicos a los cuales se les atribuye la acidez en las mieles son fundamentalmente los ácidos orgánicos y en menor cuantía las vitaminas. Depende específicamente de la flora nativa de cada región y entorno botánico ^{21,33}.

El rango de pH de las mieles florales oscila entre 3,2 y 5,5 ¹⁵. La acidez en la miel contribuye a la actividad antimicrobiana, pues a bajos valores de pH, se inhibe el crecimiento bacteriano ³². Estos bajos valores de pH también contribuyen a aumentar la compatibilidad de la miel con productos alimenticios ³⁴.

1.3.6 Conductividad eléctrica

La conductividad es un parámetro que, desde el punto de vista experimental, resulta muy sencillo de determinar. Sus valores, en el caso de las mieles, están muy relacionados con el contenido de minerales, con la acidez de las mismas (presencia de ácidos orgánicos e inorgánicos) y con la presencia de proteínas, azúcares complejos y polioles²⁶. Por tanto, está estrechamente vinculado con las especies vegetales que visitan las abejas y los suelos donde éstas se desarrollan^{32,35}.

Aunque en la actualidad no constituye un parámetro de calidad dentro de las normas INEN³⁶, otras normativas internacionales (Codex Alimentarius)³⁷, si la toman en cuenta, e incluso proponen tomar en consideración este parámetro y sustituir la determinación de cenizas²⁷. Actualmente este parámetro se utiliza para identificar mieles uniflorales por lo que se está insistiendo en que su determinación se incluya dentro de los parámetros de calidad. Se propone que las mieles florales y sus mezclas tengan valores de conductividad eléctrica menores de que $0,8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ y que las mieles de mielada y de castaña posean valores mayores (hasta $2,17 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)^{23,29,38}.

1.3.7 Cenizas totales y minerales

El contenido de cenizas totales o también conocido como contenido de minerales en las mieles no debe sobrepasar el 0,6 %. Está relacionado con el tipo de miel, contenido en polen y sólidos insolubles, lo cual a su vez está muy relacionado con el método de extracción que se utiliza. Este aspecto se acrecienta en la medida en que la miel es más viscosa^{23,26}.

Los minerales que con más frecuencia se encuentran en las mieles son: calcio, potasio, cobre, sodio, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, entre otros; siendo el potasio el más abundante^{23,39,40,41}. Estos provienen del terreno donde habita y se desarrolla la planta de donde se obtuvo la miel; por lo que, si la miel es de la misma especie floral, pero proviene de terrenos diferentes, puede tener elementos minerales diferentes o al menos en cantidades diferentes¹².

Algunos autores relacionan este parámetro con el valor nutricional de las mieles (a pesar del bajo por ciento de cenizas y minerales que poseen) y con el color de las mismas. Se plantea que las mieles más oscuras presentan un mayor contenido de minerales y por tanto mayor

valor alimenticio que las mieles más claras. La presencia de potasio lo relacionan además con la acción bactericida que poseen las mieles ⁴².

1.4 Composición química

La miel es una disolución que está formada principalmente por glucosa y fructosa (alrededor del 70 %) ⁴². En ella también se encuentran presentes otros carbohidratos en forma de monosacáridos y disacáridos fundamentalmente, entre los que se encuentran: maltosa, sacarosa, turanosa, isomaltosa. La presencia de cantidades excesivas de azúcares en la miel, significa una adulteración en su composición química, debido a jarabes, jaleas, miel de caña o una sobrealimentación de las abejas, lo que presenta un valor excesivo de sacarosa (>8%) ⁴³.

Adicionalmente se pueden encontrar proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, compuestos de naturaleza fenólica, minerales, vitaminas y otras sustancias ^{43,44}. La tabla 3 muestra la composición química general que presenta las mieles.

Tabla 3. Composición química general que se presenta en las mieles de la especie *Apis mellifera*.

Compuesto o familia	Por ciento (%)
Fructosa	32 - 44
Glucosa	23 - 38
Agua	12 - 23
Sacarosa	27 - 36
Proteínas y enzimas	01 - 0,5
minerales y vitaminas	0.02 - 1
Fuente	45,46, 19,31, 23,47

La composición química de la miel varía dependiendo de la zona geográfica, el clima, la vegetación, el suelo, las diferentes clases de plantas que la abeja recolecta, el néctar y secreciones de plantas vivas ⁴⁸. Sin embargo, se ha reportado la presencia de algunos metabolitos con cierta frecuencia, entre los que se encuentran los ácidos caféico, gálico, flavonoides como acacetina, hesperidina, rutina además tocoferoles, ácido ascórbico, ácidos amino, entre otros ^{43,49}. Existen reportes que plantean la presencia en las mieles de: biotina, polifenoles, ácido fólico, tiamina y niacina ⁵⁰.

1.5 Métodos de detección y cuantificación de fenoles

Los compuestos fenólicos constituyen componentes minoritarios (%) de las mieles. Su contenido varía significativamente dependiendo de la flora y vegetación de cada región, por lo que en ocasiones se han utilizado para determinar el origen geográfico de las mieles ⁵¹. Los compuestos fenólicos están presentes en pigmentos vegetales y floraciones, siendo estos los responsables de su presencia en las mieles ⁵². El anexo 3 muestra algunos de los compuestos fenólicos identificados en estas.

1.5.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

Existen varias técnicas aplicadas al estudio de la composición química de las mieles. La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), es la técnica más usada para la determinación y cuantificación de compuestos químicos en mieles, ya que brinda resultados puntuales y precisos ^{47,53}. Con esta técnica se logran obtener los diferentes compuestos fenólicos que se encuentran en las mieles, separando cada uno de los componentes detectados. Los detectores más usuales empleados son detectores UV, detector de índice de refracción y a partir de espectrometría de masas (EM) ^{45,54,55}.

1.5.2 Cromatografía gaseosa (CG)

La cromatografía de gases (CG), al igual que la CLAE, también brinda resultados cualitativos y cuantitativos, separa los compuestos exactos de mezclas e identifica el peso molecular de cada compuesto y algunas características estructurales derivadas del análisis de sus fragmentaciones. Para esta técnica se debe derivatizar la muestra previamente para poder detectar los compuestos fenólicos ⁵².

1.5.3 Cromatografía en capa delgada (CCD)

La cromatografía en capa delgada (CCD) también ha sido una técnica muy utilizada en el estudio de la composición química de las mieles mediante el uso de diversas fases móviles y reveladores. La determinación de los pigmentos de las mieles ha sido uno de las aplicaciones que ha tenido la CCD. El estudio de la composición de carotenoides, clorofilas y xantofilas, responsables, entre otros de las coloraciones de las mieles, se han desarrollado utilizando CCD preparativa con posterior análisis en un espectrofotómetro ultravioleta UV ^{56,57}.

Dentro de los métodos utilizados para cuantificar compuestos fenólicos se encuentra el método de Folin - Ciocalteu. Este método se basa en observar la absorbancia a 765 nm del producto de la reacción que se produce entre la muestra, el reactivo de Folin - Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) y carbonato de sodio, luego de dos horas de reacción. Los resultados que se obtiene a partir de este método se expresan como equivalentes a ácido gálico, previa realización de una curva de calibración con dicha sustancia. Los resultados que se obtienen al aplicar este método ha sido cuestionado por algunos autores, sin embargo, otros plantean excelentes correlaciones en los resultados obtenidos sobre todo para muestras del mismo tipo ^{57,58}.

1.6 Usos – propiedades de las mieles

Durante mucho tiempo las mieles han sido utilizadas simplemente como alimento, no fue sino hasta el año 1500 A.C que descubrieron su poder medicinal. La miel se distingue por poseer muchas propiedades terapéuticas, de las cuales la más importante es la cicatrización de heridas ⁵⁹. Para ello, colocaban directamente la miel en la herida y ésta actuaba de manera rápida, logrando en poco tiempo que la herida sanara. Esto se debe a que posee actividad antimicrobiana, debido a que en su composición se encuentran enzimas que son propias de las abejas que impiden el crecimiento de las bacterias ^{59,60}. También contribuyen su capacidad antioxidante y su capacidad antiinflamatoria. Esta última se justifica por varios mecanismos entre los que se encuentran: infiltración de leucocitos, producción de citoquinas inflamatorias e inhibición de producción de óxido nítrico y fagocitosis. Existen numerosas referencias que plantean que las mieles poseen muy buena actividad antioxidante, en particular su contribución a la eliminación de radicales libres, lo cual evita el envejecimiento prematuro y numerosas enfermedades degenerativas ⁹.

Actualmente se ha demostrado que la miel es capaz de actuar sobre más de sesenta bacterias tanto gram positivas como gram negativas, por lo que al momento de actuar como cicatrizante logra en el paciente que la herida quede libre de hedor, humedad, incita el desarrollo del tejido y reduce el edema ^{9,61}.

Gracias a su potente acción como antioxidante, se pueden prevenir múltiples enfermedades, como problemas en el sistema circulatorio y desórdenes inflamatorios. Ayuda además al sistema inmunitario, por ende, es recomendado para curar otras enfermedades como la gripa, resfriados, inflamaciones a la garganta, etc ⁶¹.

Hoy en día la miel además de uso médico, se la adiciona en los diferentes alimentos que consumimos a diario, ya sean té, cereales, etc. Se lo hace con el fin de evitar la azúcar refinada debido a la capacidad que tiene la miel como edulcorante ⁶¹.

Todos los componentes que posee la miel forman una fuente primordial de barrera contra enfermedades, pudiéndose utilizar como antiinflamatoria, anti fúngica, antimicrobiana y antioxidante. También se aprovechan por sus propiedades nutricionales, vitamínicas. La combinación de sus efectos, ayudan a la mejora de la calidad de salud ⁶¹.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Recolección y procesamiento de la muestra.

Las muestras de mieles que fueron objeto de estudio en este trabajo se colectaron en la provincia de EL Oro, Ecuador. La muestra 1 se obtuvo del cantón Zaruma, parroquia Güizhagüiña y la muestra 2 se adquirió del cantón Santa Rosa, parroquia La Avanzada.

Ambas mieles se elaboraron por abejas de la especie africanizada. La muestra 1 fue colectada en el mes de julio del año 2018 y la muestra 2 en febrero del 2019.

Ambas muestras fueron obtenidas previo proceso de des operculación de los panales. En la muestra 1, el método de extracción fue por escurrida mientras que la muestra 2 fue mediante centrifugación y posterior filtración a través de un colador artesanal. Las mieles fueron almacenadas en recipientes correctamente cerrados y a temperaturas de alrededor de 24 grados Celsius.

2.2 Parámetros químico-físicos

Los parámetros químico-físicos que se evaluaron en las muestras de miel fueron: color, contenido de humedad, índice de refracción, densidad, grados Brix, % de azúcar invertida, pH, conductividad y cenizas totales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.2.1 Determinación de color

La determinación del color se desarrolló mediante el procedimiento descrito por White, 1984^{62, 63}. Se preparó una disolución al 50% de miel en agua destilada, se filtró por papel de filtro de filtración lenta y se midió la absorbancia a partir de la lectura a 650 nm en un espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC EVOLUTION 201/220 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETERS). La conversión a la escala de Pfund se realizó a partir de la aplicación de la siguiente fórmula²⁴.

$$\text{mmPfund} = -38,70 + 371,39 \cdot \text{abs } 650 \text{ nm}$$

2.2.2 Contenido de humedad, índice de refracción, grados Brix y por ciento de azúcar invertido

El contenido de humedad, el índice de refracción, los grados Brix y el por ciento de azúcar invertido se determinaron directamente sobre la miel (una gota). Los valores de cada uno de estos parámetros se obtuvieron a partir de la información directa en el display de un refractómetro de marca (ANTÓN PAAR ABBETMAT 200).

2.2.3 Determinación de densidad

En cuanto a la determinación de la densidad, esta se realizó con la ayuda de un picnómetro. Se realizaron tres pesadas en una balanza (RICE LAKE TA-220), la primera al picnómetro vacío, la segunda al picnómetro con agua destilada y finalmente al picnómetro con cada una de las muestras. Los cálculos se desarrollaron a partir de la siguiente ecuación ⁶⁴:

$$Densidad = \frac{M3 - M1}{M2 - M1}$$

Donde:

m₁= Picnómetro vacío

m₂= Picnómetro más agua destilada

m₃= Picnómetro más muestra

2.2.4 Determinación de pH y conductividad eléctrica

Para las mediciones del pH y de la conductividad eléctrica se preparó una disolución a partir de 10g de miel y 75 ml de agua destilada. Se utilizó un potenciómetro multiparamétrico (BANTE 900P) y se realizó la lectura a una temperatura de 24,6 °C.

El valor de conductividad obtenida bajo esas circunstancias, se multiplicó por 1,50 para hacerlo equivalente a la conductividad de una disolución de miel al 20% en materia seca. Se expresó en mS.cm⁻¹ ²⁸.

2.2.5 Determinación de cenizas totales

La determinación de cenizas totales se realizó mediante método gravimétrico. Se calentaron previamente los crisoles en una estufa (MEMMERT a 110°C). Se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente, y se pesaron 5 gramos de cada muestra en la balanza analítica descrita. Se calcinaron en la plancha de calentamiento (UMCO UM0537) y, posteriormente se introdujeron a la mufla (MAGRICO 007) a una temperatura de 650 °C por dos horas. Se enfriaron posteriormente en desecadora y se pesaron en la balanza analítica. El procedimiento de la introducción en la mufla, el enfriamiento y la pesada se repitió hasta peso constante para ambas muestras.

El porcentaje de cenizas totales se calculó mediante la siguiente fórmula ²⁶.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso en g (crisol + ceniza)} - \text{peso en g (crisol vacío)}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

2.3 Determinación de minerales

Se determinó mediante las normas establecidas por el Laboratorio NemaLab S.A. Utilizando la técnica de digestión por vía húmeda con mezcla de ácido nítrico y perclórico para la determinación de los minerales K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn, y Na.

En el caso del fósforo su determinación se realizó, mediante la técnica de espectrofotometría UV y finalmente para la determinación del nitrógeno total por microkjeldahl utilizando también espectrofotometría UV.

2.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE-EM)

Se preparó 1L el agua ácida con un pH de 2, posteriormente se pesaron 100 g de cada una de las muestras de miel y se diluyeron con 500 ml de esa agua. Se filtró esta dilución con papel filtro y micro filtros de 0,2 y 0,45 µm, eliminando toda presencia de impurezas mecánicas en las mieles.

Se procedió a colocar las muestras sobre columnas RP-18, previamente acondicionadas, primero con metanol y después con agua ácida. Una vez colocadas, la elusión se desarrolló primero con agua ácida seguido de agua ultrapura. Finalmente, se eluyeron las columnas con

metanol y las fracciones metanólicas se concentraron en un rotaevaporador (HEILDOLPH – LABORATA 2001) hasta sequedad. Todos los disolventes utilizados fueron grado CLAE.

2.5 Cuantificación de compuesto fenólicos

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se preparó una disolución al 20% utilizando 2 g de miel para cada muestra.

curva de calibración se realizó a partir del ácido gálico a concentraciones 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 y 0,9; se trabajaron por triplicado cada una de las muestras de miel.

2.5.1 Preparación del patrón

Para el ensayo se tomaron 50 μ L de disolución madre de miel o patrón, luego se tomaron 2,5 mL de Folin-Ciocalteu y por último 450 μ L de agua destilada, esta mezcla se agitó en el Vortex (THERMO SCIENTIFIC FISHERBAND), una vez agitado se dejó en reposo durante 5 min.

A esta mezcla se adicionaron 2 mL de Na_2CO_3 , así mismo se agitó en el Vortex y se esperó a que reposara por 2 h. La lectura de la absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrofotómetro descrito en el acápite II.2.

2.6 Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante presente en las muestras de miel se realizó mediante el método modificado de Brand-Williams ⁶⁵. Para ello se preparó una disolución madre al 20% m/v y de la misma manera una dilución del DPPH. Para esta última se pesaron 0.0018 g en la balanza analítica y se disolvieron con 50 mL de etanol.

Se trabajó por triplicado, para ello utilizamos 8 tubos de ensayo, 6 con las muestras, reaccionando 100 μ L de disolución madre y 3,9 mL de DPPH, mientras que para el control de DPPH se agregó en el tubo 3,9 de DPPH y 100 μ L de etanol. Como blanco se utilizaron 100 μ L disolución madre y 3,9 mL de etanol.

Con la ayuda de un vortex se homogeneizaron las diluciones y se almacenaron en la oscuridad, a temperatura ambiente por un tiempo, límite de 30 min. Finalmente se midió la absorbancia a 517 nm en el un espectrofotómetro UV.

La fórmula utilizada para determinar el % de captación de radicales libres fue:

$$\%DPPH = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 =$$

Dónde:

A₀= Control de DPPH

A₁= Absorbancia de las muestras

A₂= Blanco

2.7 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con la ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion versión XVII.I. Se aplicó un Análisis de Varianza unifactorial (ANOVA SIMPLE). Además, se estableció la media y desviación estándar mediante el programa IBM SPSS Statistics versión 22.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de los parámetros físico-químicos se desarrolló a partir de la evaluación de: color, porcentaje de humedad, índice de refracción, densidad, grados Brix, por ciento de azúcar invertido, pH, conductividad y cenizas. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados correspondientes a las determinaciones de los parámetros químico-físicos ensayados.

Parámetros	Media ± Desviación Estándar	
	M1 (Zaruma)	M2 (Santa Rosa)
Color	46,5760 a ± 0,9980	52,2315 a ± 0,9411
Humedad	20,0433% a ± 0,3164	19,2200% b ± 0,2357
Índice de refracción	1,4846 a ± 0,0006	1,4870 a ± 0,0017
Densidad relativa	1461 Kg/m ³ a ± 0,0000	1423 Kg/m ³ b ± 0,0002
° Brix	78,1067 a ± 0,1941	78,8967 a ± 0,4389
Azúcar Invertida	80,2300 a ± 0,3235	81,1233 b ± 0,2684
pH	3,9693 a ± 0,0023	4,0317 b ± 0,0064
Conductividad Eléctrica	0,7975 mS.cm-1 a ± 0,0023	0,7080 mS.cm-1 b ± 0,0040
Cenizas Totales	0,2140 a ± 0,0459	0,1893 a ± 0,0040

Nota: los parámetros que presentan la misma letra (a), no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Como se observa en la tabla 4 la miel procedente de Santa Rosa presenta mayor valor de milímetros (mm) de Pfund que la miel procedente de Zaruma. Estos mm, equivalen a clasificar la miel M1 como ámbar extraclara y la M2 como ámbar claro ^{24,44}. Se pudo constatar que la muestra zarumeña resulta más traslúcida (menos partículas en suspensión) que la muestra procedente de Santa Rosa (más opaca), lo que podría incidir en las diferencias de absorbancia. Se conoce que las partículas en suspensión provocan dispersión de la luz y de esa forma pueden influir en los valores de absorbancia ²². Se recomienda obtener los valores para este parámetro a partir de otros métodos, para de esa manera asegurar la veracidad de los resultados ¹². La diferencia observada para este parámetro resulta lógica dada la condición multifactorial que presupone el color de las mieles. Las diferencias podrían estar dadas por diferencias en cuanto a ^{19,46}.

- Origen floral y por tanto contenido de flavonoides, contenido de carotenoides, xantofilas y clorofilas.
- Contenido de minerales, lo cual está relacionado con el tipo de suelo.
- Contenido de sustancias de naturaleza proteica, incluidos los granos de polen.
- Tiempo desde la recolección (edad).
- Conservación y almacenamiento.
- Tipo de madera utilizada para las cajas donde se disponen los panales.

Este parámetro no se encuentra normado, solo se utiliza para clasificar las mieles y por razones estrictamente comerciales, aunque algunos autores recomiendan incluirlo dentro de las normas ¹⁸.

Las normas internacionales establecen que el contenido de humedad de las mieles debe encontrarse entre el 13 y 25,4% (anexo 1). Como se puede observar, ambas muestras se encuentran dentro de los límites establecidos, aunque la miel originaria de Santa Rosa presenta un valor de humedad menor que la procedente de Zaruma. Para el caso particular de las normas INEN, ambas mieles cumplen con los valores normados para este parámetro, sin embargo, se clasifican de manera diferente. La miel procedente de Santa Rosa sería una miel tipo I pues su % de humedad es menor al 20%. Por otra parte, la miel procedente de Zaruma

sería una miel tipo II pues su % de humedad se encuentra entre 20 y 23%, aunque en el límite inferior (anexo 1).

El parámetro analizado cumple con lo normado, aunque las diferencias obtenidas para ambas muestras resultaron significativas desde el punto de vista estadístico.

Esto podría sustentarse por varias causas:

- La humedad ambiental es elevada para ambas regiones (entre 70 y 90% para la región de la costa ecuatoriana), aunque no es exactamente la misma.
- La manipulación durante el proceso de extracción por parte de los apicultores (grado de operculación del panal, grado de madurez de las mieles, método de extracción y procesamiento) fue correcta, pero diferente.
- El sellado de los envases de las muestras fue adecuado, pero tampoco fue igual para ambos.

Se debe aclarar que, aunque ambas mieles cumplen con lo normado por el INEN, algunos países no aceptan mieles que posean una humedad superior al 20% de contenido de agua, por lo que la miel procedente de Zaruma sería rechazada ³⁶. Esto es muy importante pues la cantidad de agua que presente una muestra de miel tributa directamente a la posibilidad de contaminación microbiológica y la consecuente fermentación de la misma, contribuyendo además a la variación de otros parámetros de calidad como la viscosidad, la densidad y el índice de refracción. También esto tributaría en un daño económico importante para el apicultor.

Respecto a los valores obtenidos para el índice de refracción, se puede observar en primer lugar, que no existen diferencias estadísticamente significativas para ambas muestras de miel. En ambos casos los valores se encuentran dentro de los esperados dados los por cientos de humedad que mostraron (1,4860 para un 20,2% de agua reporta la literatura ⁶⁶, anexo 2). Este parámetro no constituye un requisito de calidad de acuerdo a las normas INEN, solo es un parámetro de caracterización de las mismas; sin embargo, si lo es para otras normas internacionales. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos (anexo 1).

La mayoría de los autores y las normas plantean que la densidad de las mieles debe presentar valores entre 13900 y 14600 Kg/m³ ^{64,23}. En el caso particular de las normas INEN, tienen como requisito valores de densidad mínimo de 13900 para las mieles clase I y de 13700 para la clase II. Las muestras trabajadas cumplen con estos requerimientos. La diferencia estadísticamente significativa que muestran las densidades de ambas mieles y la “aparente” contradicción que muestran respecto a los contenidos de humedad y el índice de refracción nos permite sugerir errores en la determinación de este parámetro ⁶⁷. El método utilizado tiene muchos posibles puntos de errores al ser un método gravimétrico. Recomendamos repetir el procedimiento con un mayor número de réplicas para poder disminuir los posibles errores.

Respecto a los grados Brix, la literatura plantea que estos deben encontrarse entre 75 y 92% ^{68,69}. Se plantea que valores menores al rango indican que la miel presenta menos viscosidad y por tanto mayor contenido de agua ¹⁵. Si, por el contrario, los valores exceden el rango, es indicativo de la adición de otras sustancias. En cualquiera de los dos casos, es indicativo de adulteración. Valores más elevados de grados Brix indican que la miel es más propensa a la cristalización. Como se observa, las muestras trabajadas cumplen con lo reportado en la literatura y se encuentran más cercanos al límite inferior lo cual sugiere que no sean propensas a la cristalización, lo cual es señal de calidad desde ese punto de vista ^{29,70,71}.

La mayoría de las normas establecen que el por ciento de azúcar invertido en las mieles no debe ser menor al 63% ^{37,72}. Para ambas muestras, los resultados que se obtuvieron cumplen con este requerimiento.

Muchos autores plantean que el porcentaje total de carbohidratos en las mieles se encuentra alrededor del 80%. De este, aproximadamente el 38% corresponde a fructosa, el 31% a glucosa, alrededor del 1% a sucrosa y el resto a otros minoritarios. El porcentaje de sacarosa no debe ser mayor al 8% en las mieles ^{12,17,25}. Uno de los problemas que históricamente se ha confrontado en la comercialización de las mieles es la autenticidad de las mismas. Las adulteraciones generalmente se producen por la adición de jarabes, jaleas, miel de caña o una sobrealimentación de las abejas, lo que produce un valor excesivo de sacarosa. Se ha recomendado entonces, no solo determinar el porcentaje de azúcar invertido sino además los porcentajes de sacarosa, de glucosa, de fructosa y la relación fructosa-glucosa ¹⁹. Por tanto,

con la determinación realizada, sólo es posible afirmar el cumplimiento de las normas respecto al por ciento de azúcar invertido, pero queda incompleto el análisis del resto de las determinaciones.

En cuanto a los valores de pH, en este caso sí se observaron diferencias estadísticamente significativas. Se observa que la miel proveniente de Zaruma mostró menores valores que la procedente de Santa Rosa, aunque ambos cumplen con los rangos habituales esperados (anexo 1). Según la literatura, los principales responsables de los bajos valores de pH que muestran las mieles son los ácidos orgánicos. Los más comunes resultan el ácido glucónico, cítrico, málico, succínico, fórmico, acético, butírico, láctico, oxálico y tartárico. El más abundante se plantea es el ácido glucónico, derivado de la acción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa, por lo que se toma este como el ácido predominante en la miel. Sin dudas la diferencia de los valores de pH entre estas muestras responde a diferencias en la composición química de sustancias ácidas, lo cual a su vez responde a diferencias en la fuente botánica desde donde se obtuvieron ambas mieles. Se debe comprobar la presencia de estos ácidos en cada una de las muestras objeto de estudio, para justificar la diferencia entre ellas.

Los valores de conductividad eléctrica, por su parte, mostraron también diferencias significativas entre ambas mieles, tomando el mayor valor la muestra proveniente de Zaruma. En principio podría valorarse la existencia, en esta muestra, de mayor cantidad de aquellos elementos responsables de este parámetro (minerales, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, azúcares complejos y polioles). Esto también permite sugerir diferencias que podrían estar desde el origen botánico hasta de los suelos donde estas se encuentran. Realizando una comparación con los valores de pH obtenidos, se puede comprobar que también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas y que resultó ser la miel zarumeña la de menor valor de pH y presumiblemente la que podría tener mayor cantidad o diversidad de compuestos ácidos, condicionando, a partir de estos metabolitos, a un mayor valor de conductividad ²⁹. A pesar de estas diferencias, ambas mieles muestran valores de conductividad que cumplen con los requisitos establecidos y permiten clasificarlas dentro de mieles de origen floral (valores de conductividad menores a 0,8 mS.cm-1).

La determinación de cenizas se encuentra también en correspondencia con lo planteado anteriormente. Como se describe en la tabla 4 la muestra zarumeña mostró mayores valores

de cenizas que la proveniente de Santa Rosa, aunque no se evidenciaron diferencias significativas en este caso. Estos valores permiten sugerir mayor cantidad de contenido de compuestos de naturaleza inorgánica (minerales) en la muestra proveniente de Zaruma. No obstante, los resultados obtenidos para ambas muestras, se encuentran dentro de los rangos establecidos para las normativas vigentes (1 % máximo, anexo 1). Este parámetro se encuentra directamente relacionado con el tipo de suelo donde crecen las especies vegetales que visita la abeja. A pesar de esto, y de las diferencias en cuanto a los tipos de minerales que puedan presentar las mieles, los valores de cenizas no sobrepasan, en la mayoría de las mieles el 0,2% ^{32,72}.

Los resultados obtenidos para las cenizas, apoyan los determinados para conductividad. Como ya se mencionó, muchos autores relacionan los valores de conductividad con el contenido de minerales, aunque no se descarta la influencia que podrían tener los otros factores que influyen este parámetro.

Resumiendo, los parámetros químico-físicos realizados permiten afirmar que ambas muestras de mieles cumplen con lo establecido en la mayoría de las normas respecto al % de humedad, de azúcar invertido, el índice de refracción, la densidad, conductividad eléctrica, el pH y las cenizas.

Tomando en consideración la relación que guarda el contenido de minerales con algunos parámetros de calidad, con el valor nutritivo y la acción bactericida que poseen las mieles, se desarrolló un estudio para determinar qué minerales y en qué proporción se encontraban en ambas muestras objeto de estudio. Estos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Minerales identificados en muestras de miel de Zaruma y Santa Rosa.

Minerales	(mg/kg)	
	M1 (Zaruma)	M2 (Santa Rosa)
Fósforo	343,53	245,32
Potasio	925,39	489,88
Calcio	308,21	175,75
Magnesio	169,19	105,90

Zinc	1,36	0.63
Cobre	0	0
Hierro	4,38	2,52
Manganeso	2,32	1,40
Sodio	65,70	102,24

Como se observa en la tabla 5, a excepción del sodio, la muestra proveniente de Zaruma presenta mayor contenido en cada uno de los minerales evaluados, con respecto a la muestra obtenida del cantón Santa Rosa, a excepción del sodio. Esto se encuentra en total concordancia con los parámetros cenizas y conductividad, anteriormente comentados. El alto contenido de sodio en la muestra proveniente de Santa Rosa denota una elevada salinidad en los suelos donde crece la vegetación que visita la abeja. Este aspecto se ha señalado anteriormente por otros autores ⁴⁰. En nuestro caso recomendamos realizar, en estudios posteriores, un análisis para comprobar la salinidad de los suelos.

Se ha planteado que el contenido de minerales constituye un parámetro discriminatorio y de caracterización para cada miel, dependiendo de la especie, el tipo de suelo y hasta el nivel de contaminación que pueda existir en cada lugar ⁷³. Las diferencias observadas para ambas muestras apoyan lo planteado.

La literatura plantea que, dentro de los minerales, el más abundante resulta el potasio y que la cantidad de este se encuentra entre el 45 y el 85% del total de minerales ⁷³. En ambas mieles, el mineral más abundante fue el potasio, constituyendo alrededor del 50% del total de los minerales para la muestra zarumeña y el 43,6% para la proveniente de Santa Rosa. Otros autores plantean que el contenido de potasio, en ocasiones, resulta 10 veces superior a los contenidos de sodio y magnesio ^{40,41,74,75}. En la muestra procedente de Zaruma, el contenido de potasio fue alrededor de 10 veces más abundante respecto al sodio mientras que con respecto al magnesio fue 5 veces mayor. En el caso de la muestra de Santa Rosa, esta proporción fue de 5 respecto a ambos minerales.

El resto de los minerales estudiados, según su abundancia, se ubicaron después del potasio, el fósforo, calcio y magnesio. Los menos abundantes, por su parte resultaron el manganeso, el hierro y el cobre, siendo este último no detectado en las muestras objeto de estudio ²⁷.

Trabajos realizados con muestras de mieles multiflorales provenientes de diversos países, muestran una elevada diversidad en cuanto a la composición de minerales entre ellos y con nuestros resultados. La tabla 6 demuestra lo anterior, tomando en consideración los minerales más abundantes en cada caso.

Tabla 6. Minerales más abundantes encontrados en las muestras objeto de estudio y reportados por algunos autores.

Localización de las muestras	Minerales más abundantes (orden creciente)
Zaruma	K, P, Ca, Mg
Santa rosa	K, P, Ca, Mg
Brasil	K, Mg, Na, Ca
Islas canarias (Tenerife y palma)	K, Na, Ca, Mg
Egipto	Ca, P, Si, Mg
Grecia	Ca, P, Si, Mg
Polonia	K, Ca, Na, Mg
Malasia	K, Na, Ca, Fe
Fuente	76, 77, 78, 39, 40

Por otro lado, en nuestras mieles, se presentan mayores contenidos de calcio, magnesio y sodio respecto a todas las mieles mostradas y menores contenidos respecto al cobre ^{39,40,74,76}. Esto se puede observar en la tabla 6 y demuestra lo anteriormente comentado acerca de la

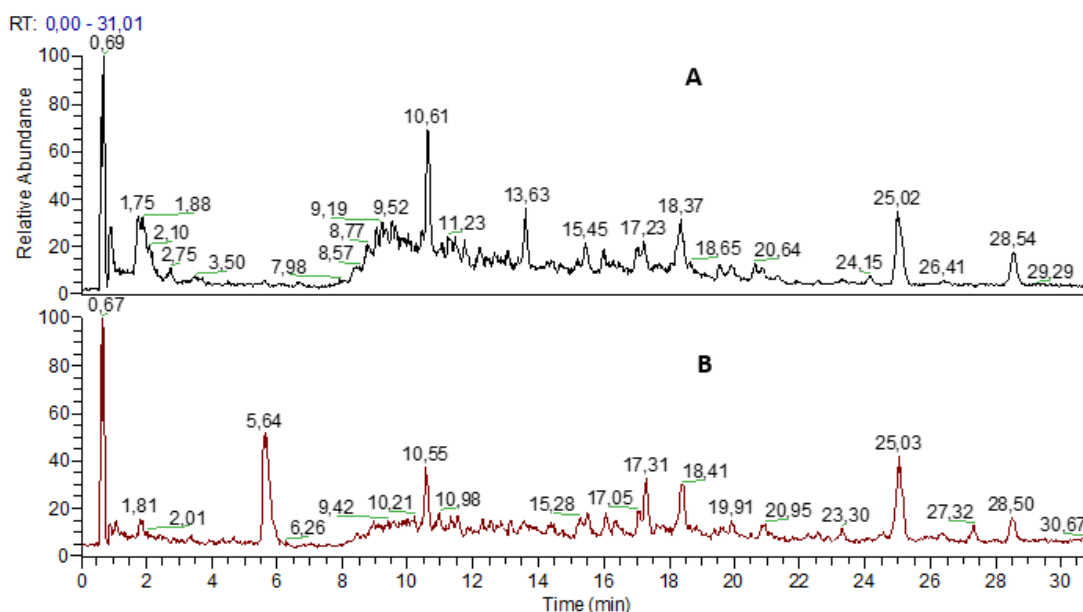
tendencia a la tipificación de las mieles, tomando como patrón el contenido de minerales y la influencia multifactorial (la presencia de estos se encuentra condicionada por la composición del suelo, la cual afecta a la absorción de los mismos por las plantas y de ahí su paso a las mieles) que tiene este parámetro y que lo hace específico para cada muestra o región ¹².

Los minerales que comúnmente presentan las mieles tienen funciones reguladoras en el organismo y son de gran valor nutricional. También se plantea que, algunos de ellos potencian la actividad bactericida de las mieles. Los minerales hierro, calcio, cobre, magnesio, manganeso y zinc resultan los de mayor biodisponibilidad ⁷⁹.

Tomando como punto de partida que las diferencias observadas entre ambas muestras en cuanto a los valores de pH y conductividad, pueden ser causadas también por la diferencia en el contenido de ácidos y fenoles, se determina desarrollar estudios cualitativos y cuantitativos para valorar los mismos.

El estudio cualitativo se desarrolló utilizando CLAE acoplada a un espectrómetro de masas. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 1.

Figura 1: Cromatogramas CLAE obtenidos para las muestras de mieles



A: muestra 1, **B:** muestra 2

Como se observa, estos resultan muy complejos, caracterizados por un elevado número de señales. Esta situación se esperaba dado el origen multifloral de las mieles que se trabajan, lo cual se encuentra descrito en la literatura especializada ⁴⁵. Estas señales deben corresponder con ácidos y/o compuestos fenólicos, dadas las condiciones de ionización utilizadas (modo negativo), además del tratamiento previo realizado a las muestras, los resultados experimentales anteriores y los reportes de estudios similares realizados en mieles ⁸⁰.

La identificación se desarrolló a partir de la comparación de los iones pseudomoleculares y los iones fragmentos observados en sus espectros MS/MS con lo reportado en la literatura y se resumen en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Compuestos sugeridos a partir del análisis CLAE-ESI/ EM para la muestra 1.

No.	Tr (min)	Compuesto Estructura	Clasificación	[M-H]- (intensidad relativa)	Espectros MS/MS	Citas
1	1,28	acacetina	flavona	283	151	81
2	2,36	ácido siríngico	ácido fenólico	197	153	82,83
3	3,51	ácido 3-O cafeicoquínico (clorogénico)	ácido fenólico	353	191 179	81-84
4	4,20	ácido salicílico	ácido fenólico	137	93	85
5	4,22	ácido 4-hidroxi benzoico	ácido fenólico	137	93	82,85
6	7,65	ácido caféico	ácido fenólico	179	135	81,82,85-86

7	10,47	ácido 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero	ácido fenólico	165	147	86
8	10,61 *	ácido 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero	ácido fenólico	165	147	86
9	15,24	glicósidos (hexosa) del ácido láurico	glicósido de ácido monocarboxíli co	361	199 155	
10	15,44					
11	16,03					
12	16,34					
13	17,05					
14	17,21					
15	18,45					
16	19,48	glicósidos (hexosa) del ácido sebácico	glicósido de ácido dicarboxílico	363	201 139	
17	20,84					
18	21,15					
19	21,37	tricetina	flavona	301	151	84
20	25,02	ácido láurico	ácido monocarboxíli co	199	181 155	87,88

21	26,43	ácido trans-trans abscisico o el isómero cis- trans	Ácido monocarboxíli co	263	219 153	81
22	28,54	ácido sebácico	ácido dicarboxílico	201	183 139	
23	29.22	luteolina	flavona	285	213 151	81-83,84

Tr: tiempo de retención; *: señal de mayor intensidad dentro del cromatograma

Como se observa en la tabla 7, en la muestra 1 se pudo sugerir la presencia de 3 flavonas, 7 ácidos fenólicos, 2 ácidos monocarboxílicos, uno dicarboxílico y presumiblemente 7 glicósidos isómeros del ácido láurico y 3 del sebácico. Las estructuras químicas de cada uno de ellos se muestran en el anexo 4.

Las tres flavonas se encuentran relacionadas estructuralmente, como lo demuestra la existencia de un mismo ion fragmento de m/z 151. Este corresponde al fragmento del anillo A producto de la retrociclización típica de los flavonoides (RDA) que apoya la identidad de este anillo en estos tres compuestos⁸⁹. La luteolina presentó además un ion fragmento de m/z 213 correspondiente a $[M-H-CO-CO]$ ^{56,81-83,84}.

Los ácidos detectados presentaron las fragmentaciones típicas que describe la literatura para este tipo de compuestos: pérdidas de 44 uma correspondiente a $[M-H-CO_2]^-$, de 18 uma debido a $[M-H-HO]$ y de 62 debida a $[M-H-CO-H_2O]$. Los ácidos siríngico, salicílico, 4-hidroxi benzoico y caféico mostraron sólo las pérdidas de 44 uma. Los ácidos 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero, en cambio, presentaron la pérdida de agua, el ácido láurico presentó * la pérdida simultánea de ambas moléculas además de por 44 uma y el sebácico además de esta última, la de agua^{81,82,85,86}.

Los glicósidos del láurico y el sebácico se comportaron como sus agliconas correspondientes, mostrando adicionalmente la pérdida de 162 uma presumiblemente de una hexosa $[M-H-C_6H_{10}O_5]$ ^{87,88}.

El ácido 3-O cafeicoquínico, se caracterizó por presentar dos iones fragmentos que se identificaron como m/z 191 [M-H-H₂O]⁻ y m/z 179 (resto de ácido cafeico a partir de reordenamiento de McLafferty). El ácido trans-trans abscisico o el isómero cis-trans, por su parte, mostraron los iones fragmentos m/z 219 [M-H-CO₂] y m/z 153 [M-H-C₆H₆O₂]⁻ ^{81-84,90,91}.

Tabla 8. Compuestos sugeridos a partir del análisis CLAE-EM/ESI para la muestra 2.

No.	Tr (min)	Compuesto Estructura	Clasificación	[M-H] ⁻ (intensidad relativa)	Espectros MS/MS	Citas
1	2,40	ácido 3,4-dihidroxi benzoico (ácido protocatético)	ácido fenólico	153	109	81,82,85
2	10,57	ácido 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero	ácido fenólico	165	147	86
3	13,95	rutina, hesperidina o hesperitina	glicósido de flavonol (quercetina)	609	301	81-84
4	15,26	glicósidos (hexosa) del ácido láurico	glicósido de ácido monocarboxílico	361	199	
5	15,44				155	
6	16,03					
7	17,05					
8	17,21					

9	17,33 *					
10	18,34					
11	18,4 *					
12	19,38	glicósidos (hexosa) del ácido sebácico	glicósido de ácido dicarboxílico	363	201 139	
13	20,84					
14	21,15					
15	25,05 *	ácido láurico	ácido monocarboxílico	199	181 155	87,88
16	28,54	ácido sebácico	ácido dicarboxílico	201	183 139	

Tr: tiempo de retención; *: señales de mayor intensidad dentro del cromatograma

En la muestra procedente de Santa Rosa se lograron sugerir 16 compuestos: 2 ácidos fenólicos, un glicósido de flavonol, 1 ácido monocarboxílico, uno dicarboxílico y presumiblemente 8 glicósidos isómeros del ácido láurico y 3 del sebácico. De estos, solo 2 resultan diferentes a los sugeridos para la muestra 1, el ácido protocatético y el glicósido de flavonol. Las estructuras químicas de cada uno de ellos se muestran en el anexo 5.

Los ácidos láurico, sebácico, sus posibles glicósidos y el ácido 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero, se comportaron de manera semejante en cuanto a Tr y fragmentaciones constatadas respecto a la primera muestra.

El ácido protocatético mostró la pérdida de CO₂ característica de ácidos carboxílicos, [M-H-CO₂]- y para el glicósido del flavonol se sugieren tres compuestos que pierden 162 uma correspondiente a una hexosa [M-H-C₆H₁₀O₅], obteniéndose un ion fragmento de m/z 301 uma. Esto sugiere como aglicón un flavonol de con ese valor para el [M-H]-, tal y como lo presentan la rutina, la hesperidina o la hesperitina^{81-84,85} (anexo 5).

Las principales diferencias, tomando como base principalmente los compuestos sugeridos, estuvieron en:

- La presencia, para la muestra 1, de tres flavonas (acacetina, tricetina, luteolina) y los ácidos siríngico, 3-O cafeicoquínico, 4-hidroxi benzoico, caféico, fenil láctico, salicílico y trans trans abscisico (cis trans), que no se detectaron en la muestra 2.
- La presencia, para la muestra 2, del ácido protocatético y el glicósido de flavonol (rutina, hesperidina o hesperitina) que no se detectaron en la muestra 1.
- El cromatograma obtenido para la muestra 1 presenta una señal mayoritaria que se sugiere se trate del ácido fenil láctico, la señal que le sigue se sugiere sea del ácido láurico.
- El cromatograma de la muestra 2 está dominado por varias señales de intensidad semejante, pudiéndose identificar, dentro de ellas, solamente al ácido láurico y dos de sus glicósidos.

Las semejanzas entre ambas muestras, estuvieron en la presencia de los ácidos láurico, sebácico, sus posibles glicósidos y el ácido 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero. También en la existencia de otros, que no pudieron ser identificados, pero que por su patrón de fragmentación y por sus Tr, debían coincidir. Estos se detectaron a Tr de alrededor de 1,8 min y de 10,6 min. Los iones fragmentos que dominaron ambos espectros fueron m/z 326 y 236 para el primer caso y m/z 165 y 147 para el segundo ⁹².

La comparación con la literatura arrojó coincidencias de compuestos detectados en este trabajo, con otros realizados en mieles de otras latitudes. La información resumida respecto al origen de las mieles donde estos aparecieron y los datos de publicaciones donde se reportaron, se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Compuestos reportados en mieles de diferentes orígenes.

Compuesto	Origen de la miel	Referencia bibliográfica	Compuesto	Origen de la miel	Referencia bibliográfica
Acetina	Miel (Serbia)	81	Acido 4-hidroxi benzoico	Mieles (Polonia) de acacia, eucalipto, castaño, brezo, lavanda, romero, naranja, girasol, colza. Mieles (Europa) de castaño.	93,94
Ácido siríngico	Mieles multiflorales (Perú). Mieles (Polonia) de acacia, eucalipto, lima, castaño, brezo, lavanda, romero,	93,95,96	Ácido caféico	Miel (Chile) de quillaja, saponaria. Mieles (Europa) de castaño, brezo, lavanda. Mieles (Polonia) de	93,94,97,

	naranja, girasol, colza, tilo, manuka.			acacia, eucalipto, castaño, brezo, lavanda, romero, naranja, girasol, colza.	
Acido 3-O cafeicoquínico o clorogénico	Miel (Serbia) de flores albahaca, trigo sarraceno, colza, vara de oro	81	Ácido protocatéquico	Miel (Brasil). Mieles (Polonia) de acacia, eucalipto, lima, castaño, brezo, lavanda, romero, naranja, girasol, colza. Mieles (Europa) de castaño, brezo.	51 ,93,94

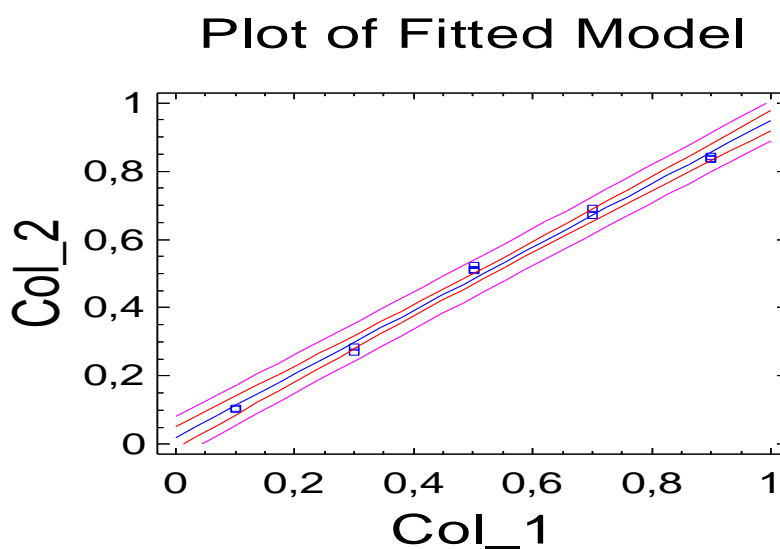
Ácido feniláctico	Mieles (Europa) de castaño, brezo. Miel (Italia) de cardo	94,98	Ácido láurico	Miel (Italia)	99
Ácido sebácico			Ácido salicílico	Mieles (Europa) de castaño. Miel (Chile) de quillaja, saponaria.	94,97
Tricetina	Miel (Polonia) Leptospermum Miel (Australia) de arbusto gelatina.	93,100	Ácido abscísico	Miel (Serbia) de acacia y tilo. Miel (Chile) de quillaja, saponaria. Miel (Eslovenia) de tilo, florales, castaña, acacia.	81,97,101
Luteolina	Mieles multiflorales (Chile).	93,102,100	Rutina	Mieles (Perú).	93,95,97,

	Miel (Polonia) de eucalipto, leptospernum, tunecina, melaleuca, banksia, lophostemon, guioa, helilianthus. Miel (Nueva Zelanda y Australia) de manuka, eucalipto y arbusto gelatina.			Miel (Chile) de quillaja. Miel (Polonia) de tilo, brezo.	
Hesperidina	Mieles de manuka, melón rumano de coníferas, brezo.	96	Hesperitina	Mieles multifloralde (Chile). Miel (Polonia) de tunecina.	93,102

En esta contrastación no se encontraron reportes de la presencia del ácido sebácico, ni de los glicósidos de los ácidos láurico y sebácico. Esto resulta muy interesante pues sería la primera vez que se detectan estos compuestos en muestras de mieles. Por otro lado, no se constataron reportes sobre composición química de mieles ecuatorianas, por lo que este trabajo representa un aporte importante a este conocimiento en mieles del Ecuador. Se debe realizar otros estudios para confirmar la estructura de los posibles compuestos novedosos.

El estudio químico cuantitativo involucró la determinación de fenoles totales a partir del método de Folin-Ciocalteu. Los valores se calcularon a partir de la extrapolación de la absorbancia obtenida a la curva de calibración desarrollada con ácido gálico (figura 2).

Figura 2. Curva de calibración obtenida para el ácido gálico



Como se observa en la figura 2, los parámetros estadísticos obtenidos para la regresión lineal se encuentran adecuados, a partir de la correlación entre absorbancia y concentración de ácido gálico. El coeficiente de correlación R y determinación R² fueron 0,99668 y 99,33% respectivamente; encontrándose ambos dentro de los límites recomendados (aproximadamente 1 y el porcentaje superior al 98 %, respectivamente). La ecuación de regresión obtenida fue:

$$\text{Col}_2 (\text{absorbancia}) = 0,0200528 + 0,92912 * \text{Col}_1 (\text{concentración})$$

Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la correlación entre la absorbancia y el ácido gálico

Muestra	mg EAG/100 g de muestra Media ± Desv. Estándar
Zaruma	107,97a ± 8,55
Santa Rosa	51,83 b ± 3,41

Nota: los parámetros que presentan la misma letra (a), no presentan diferencias estadísticamente significativas. EAG: equivalente a ácido gálico.

En esta ocasión la muestra zarumeña presentó mayor contenido de compuestos fenólicos, a partir del método de Folin -Ciocalteu, que la muestra proveniente de Santa Rosa. Se conoce que el contenido y diversidad de compuestos fenólicos que poseen las mieles está directamente relacionado con el origen botánico de las mismas, y que existe gran variabilidad en cuanto a la concentración de los mismos, ya sean por las diferencias en la localización geográfica o por variabilidad de la fuente vegetal ^{103,104}. La diferencia observada entre ambas muestras resulta lógica, si se toma en consideración que provienen de zonas geográficas diferentes (altitud, localización, temperatura, tipo de vegetación presente en el lugar e incluso posibilidad de, siendo especies comunes, que su composición varía por estas causas). Numerosos autores consideran a los compuestos fenólicos como los componentes de mayor interés farmacológico dentro de las mieles. Se les atribuyen la responsabilidad de las actividades antioxidantes y antimicrobianas de las mismas ^{6,105}. La muestra de Zaruma resulta entonces, desde el punto de vista de la cantidad de compuestos fenólicos, la más interesante.

La variabilidad en las concentraciones de fenoles ha sido observada en mieles de varios países. Miel proveniente de Túnez exhibieron valores que oscilan entre 32,17 mg EAG/100 g para mieles provenientes de eucalipto, 63 mg EAG/100 g para provenientes de

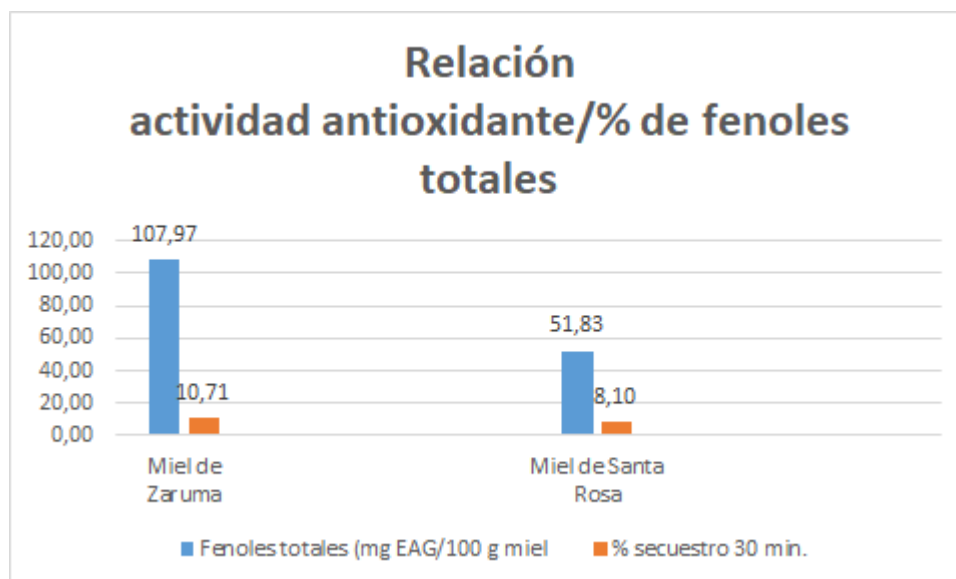
naranjos y 119,42 mg EAG/100 g para provenientes de menta ¹⁰⁶. En un estudio desarrollado en mieles monoflorales chilenas se mostraron valores que oscilaron entre 84,97 mg EAG/100 g y 181 mg EAG/100 g ⁵⁰. Otros autores que desarrollaron un estudio en mieles argentinas reportaron valores que oscilan desde 40,30 mg EAG/100 g y 193,03 mg EAG/100 g, aunque plantean que las mieles provenientes de eucalipto presentaron valores por encima de 142,7 mg EAG/100 g, de tréboles menores a 100,4 mg EAG/100 g y de alfalfa de alrededor de 112 mg EAG/100 g ¹⁰⁷. En ese mismo país Patrignani y col (2016), reportaron valores entre 39,5 y 61,6 mg EAG/100 g ⁴². En estudios desarrollados con 70 mieles colombianas los valores se comportaron entre 21,3 y 115,1 mg EAG/100 g, sobre mieles peruanas mostraron rangos entre 53,39 y 88,77 mg EAG/100 g, bolivianas entre 115,04 y 190 mg EAG/100 g, checas 47,4-265,49 mg EAG/100 g y de Burkina Faso entre 32,59 y 114,75 mg EAG/100g ^{108,109,110,111,112}. Respecto a estudios desarrollados en Ecuador, se revisaron trabajos que reportan contenidos de compuestos fenólicos en mieles provenientes de Chimborazo y de la red comercial de la provincia Pichincha, los cuales exhibieron valores de alrededor de 141 mg EAG/100 g y entre 60,95-131,75 mg EAG/100 g respectivamente ^{113,70}.

Para el caso de mieles uniflorales, se trabajaron muestras provenientes de aguacate y eucalipto en la provincia de Pichincha y mieles de nabo en la provincia de Bolívar. Las muestras, en ambos estudios fueron donadas por todos los apicultores registrados como productores de estos tipos de mieles en ambas provincias. Los resultados mostraron valores de alrededor de 68,23 mg EAG/100 g para las mieles provenientes de aguacate; 47,71 mg EAG/100 g para las obtenidas de eucalipto y de alrededor de 34,33 mg EAG/100 g para las de nabo ^{114,115}.

Al comparar los valores de mg EAG/100 g que se obtuvieron en el ensayo, con los estudios antes citados, podemos observar que se encuentran dentro de los amplios rangos que se reportan. En el caso de la muestra de Zaruma, los resultados son comparables, tomando en consideración los estudios desarrollados en Ecuador, a los obtenidos en la red comercial de Pichincha, inferiores a los devenidos de mieles del Chimborazo y muy superiores a los estudios desarrollados sobre mieles uniflorales ¹¹⁴. En el caso de la muestra 2, los valores son semejantes a los obtenidos para las mieles de eucalipto, superiores para las de nabo e inferiores para el resto de los estudios.

La relación directa que guarda el contenido de fenoles con la capacidad antioxidante de los productos naturales, ha sido el mayor interés que ha centrado este tipo de estudios en las mieles. En este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de ambas muestras a través del ensayo con DPPH. Los resultados obtenidos y la relación que guardan con el contenido de fenoles se muestran en la figura 3.

Figura 3. Relación actividad antioxidante / % de fenoles totales para las muestras objeto de estudio.



Como se muestra en la gráfica y tal como se esperaba, la muestra zarumeña, al contener mayor contenido de fenoles totales, presenta mayor capacidad antioxidante (por este mecanismo) que la muestra de Santa Rosa para un tiempo de 30 min, existiendo diferencias estadísticamente significativas.

Estudios realizados en otras muestras de miel muestran resultados muy dispersos respecto a este parámetro. Lo que sí resulta sistemático es el hecho de que existe una correlación, entre

el contenido de fenoles y la capacidad de secuestro de radicales libres, obtenido por esta metodología ¹¹⁶. Otros trabajos muestran los resultados en función del valor de concentración inhibitoria media (CI50). Se recomienda entonces realizar esta determinación para poder tener un criterio comparativo con otros trabajos realizados.

Al integrar los resultados obtenidos hasta el momento, la recomendación realizada con anterioridad respecto a determinar el color de las mieles por otro método o variar la metodología empleada se ve apoyada. Como ya se comentó, el color de la miel se relaciona a factores como: contenido de minerales, edad de la muestra, contenido de compuestos fenólicos, pigmentos, madera con que están fabricados los paneles, almacenamiento de las mismas, entre otros ¹¹⁷. La literatura plantea que existe una relación entre el contenido de hierro y el color de las mieles. Las mieles claras presentan menos de 2,79 mg/kg de hierro, las ámbar más de 2,87 mg/kg y las oscuras más de 4,26 mg/kg. En nuestro caso la miel proveniente de Zaruma responde, tomando en consideración el contenido de hierro, a una miel oscura y no a ámbar extraclara. Por otra parte, esta muestra de miel es más antigua, los paneles se encuentran fabricados de una madera más oscura (canelo respecto al laurel con que están fabricados los de Santa Rosa), tiene mayor contenido de minerales y de fenoles por lo que debía estar clasificada como más oscura que la miel de Santa Rosa ¹¹⁸. Solo podría justificarse la clasificación tomando en cuenta el contenido de pigmentos dado que las condiciones de almacenamiento son las mismas. Se recomienda, por tanto, realizar un estudio para determinar el contenido de pigmentos en ambas muestras de miel.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

- La determinación de color en las mieles, a partir de la comparación de los mm de Pfund, permitió clasificar las mismas de acuerdo a este parámetro
- Las muestras de mieles analizadas presentaron por cientos de humedad, índices de refracción, densidades relativas, por ciento de azúcares invertidos, pH, grados brix, conductividad y por ciento de cenizas que se encuentran dentro de los parámetros de calidad establecidos.
- Los estudios realizados permitieron establecer diferencias en cuanto al color, el pH, por ciento de humedad y la conductividad, entre ambas muestras.
- No se encontraron diferencias en cuanto a los valores de índice de refracción, densidad relativa, grados Brix, por ciento de azúcar invertido y por ciento de cenizas entre las mieles estudiadas.
- Los estudios de detección de minerales desarrollados demostraron que la muestra procedente de Zaruma presenta mayor cantidad de los mismos, a excepción del sodio, respecto a la muestra originaria de Santa Rosa
- Los cromatogramas (CLAE) obtenidos para ambas muestras evidenciaron una alta complejidad cromatográfica y diferencias, en cuanto a la composición de compuestos ionizables en las condiciones ensayadas.
- Se sugirió la existencia de ácidos fenólicos, ácidos mono y dicarboxílicos y flavonoides en las mieles ensayadas; resultados novedosos para mieles de Ecuador

- La muestra 1 presentó mayor contenido de compuestos fenólicos y en consecuencia mayor capacidad secuestradora de radicales libres (método de DPPH) que la muestra 2

CAPÍTULO V. RECOMENDACIONES

- Establecer otros parámetros de calidad recomendados para el estudio de mieles
- Repetir, utilizando un mayor número de réplicas, la determinación de las densidades relativas en ambas muestras
- Determinar contenidos de otros minerales y correlacionarlos con las características de los suelos originarios de las muestras
- Continuar trabajos de identificación de las señales presentes en los cromatogramas de ambas muestras.
- Profundizar los estudios de capacidad antioxidante de las muestras.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- (1) Urbina-romero, R. A.; Utrera-quintana, F.; Castillo-gonzález, F.; Livera-muñoz, M.; Benítez-riquelme, I.; Villa-mancera, A. E.; Silva-rojas, J. E. H. H. V. Valoración del origen africanizado en la integración de una población *Apis mellifera* L. *Rev. Fitotec.* **2019**, *42* (2), 111-118.
- (2) Brodschneider, R.; Brus, J.; Danihlík, J. Comparison of apiculture and winter mortality of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Austria and Czechia. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2019**, *274* (July 2018), 24-32.
- (3) Faita, M. R.; Maria, R.; Colman, M. Defensive behavior of africanized honeybees (*Hymenoptera : Apidae*) in Dourados-Mato Grosso do Sul , Brazil. *Revista Colombiana de Entomología* **2014**, *40* (2), 235-240.
- (4) Bentabol, A.; Hernández, Z.; Rodríguez, B.; Rodríguez-rodríguez, E. M.; Díaz, C. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of monofloral honeys from Tenerife, Spain. *Food Chemistry* **2017**, *228*, 441-446.
- (5) Al-ghamdi, A.; Eldin, S.; Mohammed, A.; Javed, M.; Adgaba, N. Comparison of physicochemical properties and effects of heating regimes on stored *Apis mellifera* and *Apis florea* honey. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2019**, *26* (4), 845-848.
- (6) Luiza, D.; Baird, A.; Ferreira, B.; Cristina, M.; Lorenzon, A.; Luis, R.; Berbara, L.; Castro, R. N.; Luiza, D.; Baird, A.; et al. Correlation of total phenolic and flavonoid contents of Brazilian honeys with colour and antioxidant capacity. *International Journal of Food Properties* **2014**, *17*, 65-76.
- (7) Martos, I.; Ferreres, F.; Radovic, B. S.; Anklam, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2001**, *81*, 485-496.
- (8) Guo, P.; Deng, Q.; Lu, Q. Anti-alcoholic effects of honeys from different floral origins and their correlation with honey chemical compositions. *Food Chemistry*

2019.

- (9) Rodríguez, I. lavandera. Curación de heridas sépticas con miel de abejas. *Revista Cubana de Cirugía* **2011**, 50 (2), 187-196.
- (10) Alfredo, A.; González, M. La apicultura en el Ecuador como opción exportable. *Observatorio de la Economía Latinoamericana* **2017**.
- (11) Masaquiza, D. A. Caracterización de sistemas apícolas en la zona centro del Ecuador. **2018**, 23, 118-127.
- (12) De-melo, A. A. M.; Almeida-muradian, L. B. De; Sancho, M. T.; Pascual-maté, A.; Pascual-mate, A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey : A review. *Journal of Apicultural Research* **2017**, 1-33.
- (13) Meo, S. A.; Al-Asiri, S. A.; Mahesar, A. L.; Ansari, M. J. Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2017**, 24 (5), 975-978.
- (14) Soares, S.; Grazina, L.; Mafra, I.; Costa, J.; Pinto, M. A.; Oliveira, M. B. P. P.; Amaral, J. S. Towards honey authentication: Differentiation of *Apis mellifera* subspecies in European honeys based on mitochondrial DNA markers. *Food Chemistry* **2019**, 283 (2019), 294-301.
- (15) Pérez, A.; Alexander, H.; Chamorro, M. Análisis comparativo de la calidad fisicoquímica , microbiológica y organoléptica de la miel de abeja (*Apis mellifera*) producida en diferentes regiones de Perú. *Revista de investigación universitaria* **2014**, 1, 1-8.
- (16) Moguel, Y.; Echazarreta, C.; Mora, R. Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. **2005**, 43 (215), 323-334.
- (17) Balcázar, L.; Valadez, A.; López, J.; Ochoa, A.; Rodríguez, L.; López, E. Relación del contenido de flavonoides y color en miel de abeja (*Apis mellifera*) originaria del estado de Tabasco, México. **2019**, 4, 818-825.
- (18) Sodré, G. da S.; Marchini, L.; De Camargo Carmelo Moreti, A.; Pozar, I.; Lopes de

- Carvalho, C. Caracterización físico-química de muestras de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae) del Estado de Ceará. *Ciencia rural* **2007**, *37*, 1139-1144.
- (19) Pereyra, A.; Burin, L.; Buera, P. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International* **1999**, *32*, 185-191.
- (20) Ciappini, M. C.; Gatti, M. B.; Vito, M. V. Di. El color como indicador del contenido de flavonoides en miel. *Rev. Cienc. Tecnol* **2013**, *19*, 15-19.
- (21) Dias, F.; Abadio, B.; Moura, L. L.; Silva, I. G. Propiedades físicas y químicas de la miel de *Apis mellifera* L. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* **2010**, *30* (3), 706-712.
- (22) González, M.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Fernandez, M.; Heredia, F. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, 2574-2580.
- (23) Fattori, S. "LA MIEL" Propiedades, composición y análisis físico - químico. En *Comisión de tecnología apícola y productos apícolas*; 2004; pp 1-243.
- (24) Delmoro, J.; Muñoz, D.; Nadal, V.; Pranzetti, V. El color de los alimentos: Determinación de color en mieles. **2010**, *13* (25), 145-152.
- (25) Alqarni, A. S.; Owayss, A. A.; Mahmoud, A. A. Physicochemical characteristics , total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, *9* (1), 114-120.
- (26) Urrego, J. Caracterización de mieles de abeja *Apis mellifera*, colectadas de diferentes regiones de Antioquia, de acuerdo con los parámetros establecidos por la legislación colombiana y demás criterios que contribuyen a la calidad, Universidad Nacional de Colombia, 2017.
- (27) Warui, M. W.; Hansted, L.; Gikungu, M.; Mburu, J.; Kironchi, G.; Bosselmann, A. S. Characterization of Kenyan honeys based on their physicochemical properties , botanical and geographical origin. *International Journal of Food Science* **2019**, *2019*, 1-10.

- (28) Sanz, S.; Sanz, M. M. Humedad, ceniza y conductividad eléctrica de mieles de la rioja. Logroño 1994, pp 143-158.
- (29) Ulloa, J. A.; Cortez, P.; Rodríguez, R.; Resénderez, J.; Ulloa, P. La miel de abeja y su importancia. **2010**, N.º 4, 11-18.
- (30) Manresa, A. Clasificación de mieles de abeja uniflorales mediante propiedades químicas, físicas y sensoriales, Universidad de la Habana, 2005.
- (31) Chirife, J.; Zamora, M.; Motto, A. The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of food engineering* **2006**, 72, 287-292.
- (32) Suescún, L.; Vit, P. Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. *Fuerza Farmacéutica* **2008**, I, 1-10.
- (33) Ndife, J.; Abioye, L.; Dandago, M. Quality assessment of nigerian honey sourced from different floral locations. *Nigerian Food Journal* **2014**, 32 (2), 48-55.
- (34) Alam, F.; Islam, A.; Gan, S. H.; Khalil, I. Honey : A potential therapeutic agent for managing diabetic wounds. *Corporacion editorial Hindawi* **2014**, 2014, 16.
- (35) Venskutonis, P. R.; Ceksteryte, V.; Kaskoniene, V. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT-Food Science and Technology* **2010**, 43, 801-807.
- (36) Instituto Ecuatoriano de Normalizacion, I. Miel de abeja, requisitos NTE INEN 1572. 1988, pp 1-8.
- (37) OMS. Comisión del codex alimentarius. *Alimentación, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación* **2000**, N.º Apéndice 1, 1-38.
- (38) Bogdanov, S.; Lullmann, C.; Martin, P.; Von der ohe, W.; Russmann, H.; Vorwohl, G.; Persano, L.; Sabatini, A.; Marcazzan, G.; Piro, R. Calidad de la miel de abejas y estándares de control: revision realizada por la comisión interamericana de la miel. pp 1-14.

- (39) Kedzierska, M.; Florek, M.; Wolanciuk, A.; Barłowska, J.; Litwinczuk, Z. Concentration of minerals in nectar honeys from direct sale and retail in Poland. *Biological Trace Element Research* **2018**, 579-588.
- (40) Moniruzzaman, M.; Chowdhury, M. A.; Rahman, M. A.; Sulaiman, S. A.; Gan, S. H. Determination of mineral, trace element and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to manuka. *BioMed Research International* **2014**, N.º May.
- (41) Szefer, P.; Grembecka, M. Evaluation of honeys and bee products quality based on their mineral composition using multivariate techniques. **2013**, 4033-4047.
- (42) Patrignani, M.; Lupano, C.; Conforti, P. Color, cenizas y capacidad antioxidante de mieles de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía* **2016**, 115 (1), 77-82.
- (43) Aljohar, H. I.; Maher, H. M.; Albaqami, J.; Al-mehaizie, M.; Orfali, R.; Orfali, R.; Alrubia, S. Physical and chemical screening of honey samples available in the Saudi market: An important aspect in the authentication process and quality assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2018**, 26 (7), 932-942.
- (44) Tapia-campos, E.; Castañeda-saucedo, M. C.; Ramírez-anaya, J. P.; Macías-macías, J. O.; Barajas-pérez, J. S.; Tapia-gonzález, J. M.; Alaniz-gutierrez, L. Caracterización fisicoquímica, contenido fenólico y preferencias de los consumidores de miel de Apis mellífera en el sur de Jalisco, México. *Inverciencia* **2017**, 42, 603-609.
- (45) Gómez-Caravaca, A.; Gómez-Romero, M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, 41, 1220-1234.
- (46) Peng Kek, S.; Ling Chin, N.; Wei Tan, S.; Aniza Yusof, Y.; Suan Chua, L. Classification of honey from its bee origin via chemical profiles and mineral content. *Food Analytical Methods* **2016**.

- (47) Monroy-Benitez, E. 25 años de experiencia en la evaluación comparativa de la determinación de sacarosa por polarimetría y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en miel final. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar* **2015**, 49 (3), 37-40.
- (48) Sohaimy, S. A. El; Masry, S. H. D.; Shehata, M. G. Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Sciences* **2015**, 60 (2), 279-287.
- (49) Visweswara, P.; Thevan, K.; Salleh, N.; Hua, S. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees : a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2016**, 26 (5), 657-664.
- (50) Montenegro, G.; Santander, F.; Jara, C.; Nuñez, G.; Fredes, C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **2013**, N.º 3, 257-268.
- (51) Souza, K.; Gaparotto, J.; Lauer, L.; Serna, C.; Pereira, I.; Da Silva, E.; Granato, D.; Sattler, A.; Bicudo de Almeida, L. Phenolic compounds , antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. *LWT - Food Science and Technology* **2018**, 91 (January), 85-94.
- (52) Bueno-costa, F. M.; Zambiazzi, R.; Wendt, B.; Clasen, F.; Padilha, W. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul , Brazil. *LWT - Food Science and Technology* **2016**, 65, 333-340.
- (53) Pascual-maté, A.; Osés, S. M.; Fernández-muiño, M. A.; Teresa, M.; Osés, S. M.; Fernández-muiño, M. A.; Teresa, M.; Ose, S. M.; Ferna, M. A.; Pascual-mate, A. Methods of analysis of honey. *Journal of Apicultural Research* **2018**, 57 (1), 38-74.
- (54) Luykx, D.; Van Ruth, S. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry* **2008**, 107, 897-911.
- (55) Mattonai, M.; Parri, E.; Querci, D.; Degano, I.; Ribechini, E. Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 method for the determination of

- polyphenols in monofloral honeys from Tuscany (Italy). *Microchemical Journal* **2015**.
- (56) Truchado, P.; Ferreres, F.; Tomas-barberan, F. A. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey , and their potential as floral origin markers. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 7241-7248.
- (57) Alvarez-suarez, J. M.; Giampieri, F.; Brenciani, A.; Mazzoni, L.; Gasparri, M.; González-paramás, A. M.; Santos-buelga, C.; Morroni, G.; Simoni, S.; Forbes-hernández, T. Y.; et al. Apis mellifera vs Melipona beecheii Cuban polifloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT - Food Science and Technology* **2017**.
- (58) Negri, G.; Carelli, L.; Lugli, F.; De Carvalho, C.; Ribeiro, M. de G. Phytochemical analysis and botanical origin of Apis mellifera bee pollen from the municipality of Canavieiras , Bahia State , Brazil. *Food Technology Brazilian Journal* **2018**, *21*.
- (59) Shencke, C.; Vásquez, B.; Sandoval, C.; Del Sol, M. El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas. **2016**, *34* (1), 385-395.
- (60) Siedentopp, U. La miel: producto alimenticio y medicinal eficaz contra la inflamacion, la tos y la ronquera. *revista internacional de acupuntura* **2010**, 4-7.
- (61) Delgado, A. Uso de la miel para curaciones quirurgicas quirúrgicas infectadas en niños. *Centro de información y gestión tecnológica de Santiago de Cuba* **2009**.
- (62) Huidobro, J. F.; Simal, J.; Araquistain, J. Parametro de calidad de la miel - determinación de la intensidad de color. 1983, pp 391-394.
- (63) Huidobro, J. F.; Simal, J. Determinación del color y de la turbidez en mieles. 2014, pp 225-245.
- (64) 1632, I. Instituto Ecuatoriano de Normalización - determinación de la densidad relativa a 27°C y de la humedad. 1989.
- (65) Cuvelier, M. E.; Berset, C.; Brand-Williams, W. Use of a free radical method to

- Evaluate antioxidant activity. **1995**, 30, 25-30.
- (66) Simal, J.; Huidobro, J.; Araquistain, J. Parametros de calidad de la miel: determinación del contenido en agua. En *Bromatología*; 2014; pp 343-349.
- (67) Goetschel, L.; Velásquez, D. Determinación de la calidad físico-química de la miel de abeja comercializada en Quito y comparación con la miel artificial. *Enfoque UTE* **2019**, 52-62.
- (68) Benítez, R.; Tandioy, A.; Astaiza, P. Comparación del contenido de azúcares entre la miel natural y la miel express leche de soya (*Glycine max*); Colombia, 2005; pp 75-78.
- (69) Montoya-bonilla, B. P.; Baca-gamboá, A. E.; Bonilla, B. L. Flora melífera y su oferta de recursos en cinco veredas del municipio de piendamó, Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* **2017**, N.º 1, 20-28.
- (70) Arguello, A.; Banda, V. Estudio de las propiedades físicas, químicas y antimicrobiana de cinco mieles de abeja (*Apis mellifera* L.) comercializada en la provincia de pichincha, Universidad Politécnica Salesiana, 2016.
- (71) Kumar, A.; Paul, J.; Gill, S.; Bedi, J. S.; Manav, M.; Ansari, M. J.; Walia, G. S. Sensorial and physicochemical analysis of Indian honeys for assessment of quality and floral origins. *Food Research International* **2018**, 1-46.
- (72) Dirección general de normas, E. U. M. Norma mexicana - miel de abeja, especificaciones. Mexico 1980, pp 1-5.
- (73) Bagci, Y.; Arslan, D.; Özcan, M. M.; Dursun, N. Determination of the mineral content of bee honeys produced in Middle Anatolia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **2009**, 7486, 567-575.
- (74) Insuasty, E.; Martínez, J.; Jurado, H. Identificación de flora y análisis nutricional de miel de abeja para la producción apícola. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* **2016**, 14 (1), 37-44.
- (75) Desmouli, A. La miel, origen y composición. *Dossier* **2013**, 18-21.

- (76) Marchini, C.; De Camargo, A.; Moreti, C.; Otsuk, I. P. Análisis de grupo, basado en la composición fisico-química de muestras producido por *Apis mellifera* L. en el estado de Sao Paulo. *Cienc. Tecnol. Aliment* **2005**, *25* (1), 8-17.
- (77) Hernández, O. M.; Fraga, J. M.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Arias, J. Characterization of honey from the Canary Islands : determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry* **2005**, *93*, 449-458.
- (78) Karabagias, I. K.; Louppis, A. P.; Kontakos, S.; Drouza, C.; Papastephanou, C. Characterization and Botanical Differentiation of Monofloral and Multifloral Honeys Produced in Cyprus , Greece , and Egypt Using Physicochemical Parameter Analysis and Mineral Content in Conjunction with Supervised Statistical Techniques. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2018**, *2018*, 1-10.
<https://doi.org/10.1155/2018/7698251>.
- (79) Quirós, A. E.; Palafoz, H.; Robles, R.; Gustavo, G. Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Revista de ciencias biológicas y de la salud* **2011**, *XIII* (3), 3-11.
- (80) Oroian, M.; Sorina, R. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. *Computers and Electronics in Agriculture* **2017**, *138*, 148-156.
- (81) Keckes, S.; Gasic, U.; Cirkovic, T.; Milojkovic, D.; Natic, M.; Tesic, Z. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry* **2013**, *138*, 32-40.
- (82) Ciucure, C. T.; Geana, E. I. Phenolic compounds profile and biochemical properties of honeys in relationship to the honey floral sources. *Phytochemical Analysis Wiley* **2019**, N.º November 2018, 1-12.
- (83) Biesaga, M.; Pyrzynska, K. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 6620-6626.

- (84) Sergiel, I.; Pohl, P.; Biesaga, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **2014**, *145*, 404-408.
- (85) Shen, S.; Wang, J.; Chen, X.; Liu, T.; Zhuo, Q.; Zhang, S. Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship. *Food Chemistry* **2019**, *293*, 169-177.
- (86) Oelschlaegel, S.; Gruner, M.; Wang, P.; Boettcher, A.; Koelling-speer, I.; Speer, K. Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012**, *60*, 7229-7237.
- (87) Grossert, J. S.; Fancy, P. D.; White, R. L. acyclic dicarboxylic acids and derivatives Fragmentation pathways of negative ions produced by electrospray ionization of acyclic dicarboxylic acids and derivatives 1. **2015**, N.º February. <https://doi.org/10.1139/v05-214>.
- (88) Lachman, J.; Hejtmánková, A.; Sýkora, J.; Karban, J.; Orsák, M.; Rygerová, B. Contents of major phenolic and flavonoid antioxidants in selected Czech honey. *Food Sciencs* **2010**, *28* (5), 412-426.
- (89) Fabre, N.; Rustan, I.; Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Elsevier Science Inc* **2001**, *12* (01), 707-715.
- (90) Almeida de Silva, I.; Sarmiento da Silva, T.; Amorim, C.; Queiroz, N.; Magnani, M.; Santos de Novais, J.; Baston, L.; Lima, E.; DeSouza, A.; Gouveia, A. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 3552-3558.
- (91) Sarmiento, T. M.; Pereira, F.; Evangelista-Rodrigues, A.; Sarmiento, E.; Sarmiento, G.; Santos de Novais, J.; Riveiro, F. de A.; Amorim, C. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis* **2013**, *29*,

10-18.

- (92) Abu-reidah, I. M.; Ali-shtayeh, M. S.; Jamous, R. M.; Arráez-román, D.; Segura-carretero, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry* **2015**, *166*, 179-191.
- (93) Pyrzynska, K.; Biesaga, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28* (7), 893-902.
- (94) Dimitrova, B.; Gevrenova, R.; Anklam, E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid. *Phytochemical Analysis* **2007**, *32* (18), 24-32.
- (95) Muñoz, A. M.; Alvarado-Ortíz, C.; Blanco, T.; Castañeda, B.; Ruiz, J.; Alvarado, Á. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Revista de la Sociedad Química del Perú* **2014**, *80* (4), 287-297.
- (96) Godlewska, M.; Swislocka, R. Propiedades físico-químicas y antibroústicas de la miel de la región de Podlasia. *Kosmos* **2015**, *64* (2), 347-352.
- (97) Montenegro, G.; Salas, F.; Peña, R. C.; Pizarro, R. Actividad antibacterial y antifúngica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria, especie endémica de Chile. *Revista internacional de botánica experimental* **2009**, N.º 78, 141-146.
- (98) Tuberoso, C.; Bifulco, E.; Caboni, P.; Sarais, G.; Cottiglia, F.; Floris, I. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, N.º 59, 364-369.
- (99) Europea, C. *Mi comida - Mi medicina*.
- (100) Yao, L.; Datta, N.; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F.; Martos, I.; Singanusong, R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry* **2003**, *81*, 159-168.
- (101) Kropf, U.; Korošec, M.; Golob, T.; Bertoneclj, J.; Polak, T. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the

- classification of Slovenian honey. *Food Chemistry* **2011**, *127*, 296-302.
- (102) Muñoz, O.; Copaja, S.; Speisky, H.; Peña, R.; Montenegro, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Artigo Quim. Nova* **2007**, *30* (4), 848-851.
- (103) Muñoz, A. M.; Alvarado-Ortíz, C.; Blanco, T.; Cstañeda, B.; Ruiz, J.; Alvarad, Á. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Rev Soc. Quím Perú* **2014**, *80* (4), 287-297.
- (104) Ferreira, I.; Aires, E.; Barreira, J.; Estevinho, L. Antioxidant activity of Portuguese honey samples : Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry* **2009**, *114* (4), 1438-1443.
- (105) Morroni, G.; Alvarez-suarez, J. M.; Brenciani, A.; Simoni, S.; Fioriti, S.; Pugnaroni, A.; Giampieri, F.; Mazzoni, L.; Gasparini, M.; Marini, E.; et al. Comparison of the antimicrobial activities of four honeys from three countries (New Zealand, Cuba and Kenya). *Frontiers in microbiology* **2018**, *9*, 1-9.
- (106) Boussaid, A.; Chouaibi, M.; Rezig, L.; Hellal, R.; Donsi, F.; Ferrari, G.; Hamdi, S. Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arabian Journal of Chemistry* **2018**, *11*, 265-274.
- (107) Ciappini, M.; Stoppani, F.; Martinet, R.; Alvarez, M. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Rev. Cienc. Tecnol.* **2013**, *19* (July), 45-51.
- (108) Castro, E. M. Evaluación de indicadores para la diferenciación de mieles provenientes de la zona cafetera de la sierra nevada de Santa Marta, Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- (109) Meda, A.; Euloge, C.; Romito, M.; Millogo, J.; Germaine, O. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* **2005**, *91*, 571-577.
- (110) Quino, M. L.; Alvarado, J. A. Capacidad antioxidante total de mieles de abeja

- cosechada en diferentes regiones de Bolivia. *Revista Boliviana de Química* **2017**, 34 (3), 65-71.
- (111) Vit, P.; Guitiérrez, M. G.; Titera, D.; Bednar, M.; Rdríguez-Malaver, A. Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **2008**, 42 (2), 237-244.
- (112) Arroyo, O. R.; Arroyo, J. R. Estudio comparativo de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de la miel de abeja procedentes del departamento de Junín, Universidad Nacional del Centro del Peru, 2017.
- (113) Hernández, L. S. Determinación del potencial nutracéutico y la actividad antioxidante de la miel propolizada elaborada por la empresa Apicare, Riobamba-Chimborazo, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2013.
- (114) Pozo, G. M. Análisis de polifenoles totales y capacidad antimicrobiana de mieles de abeja de aguacate, alfalfa y eucalipto como tratamiento alternativo de infecciones de interés veterinario causadas por *Staphylococcus Epidermidis* y *Aureus.*, UDLA-Universidad De Las Americas, 2016.
- (115) Navarrete, E. S. Caracterización físico-química, determinación de la capacidad antioxidante y capacidad antimicrobiana de la miel monofloral de nabo, UDLA-Universidad De Las Americas, 2018.
- (116) Imtara, H.; Elamine, Y.; Lyoussi, B. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Science & Nutrition* **2018**, 2056-2065.
- (117) Kadri, S. M.; Zaluski, R.; Orsi, R. D. O. Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. *Food Chemistry* **2017**, 218, 237-241.
- (118) Rodríguez, S. M.; Escudero, O.; Seijo, C. M. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. *Food Chemistry* **2015**, 166, 101-106.
- (119) INEN. Instituto Ecuatoriano de Normalización - miel de abejas. Determinación de

las cenizas. Quito 1989.

- (120) Codex. Norma del codex para la miel - Codex Stan. 1987.
- (121) COVENIN. Norma venezolana - metodos de ensayo. 2136-84. Fondonorma: Caracas pp 1-43.
- (122) COVENIN. Norma venezolana - miel de abeja. 2191-84. Fondonorma: Caracas pp 1-9.
- (123) Ranneh, Y.; Ali, F.; Zarei, M.; Md Akim, A.; Abd.Hamid, H.; Khazaai, H. Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology* **2017**, 1-40.

ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de control de calidad en mieles y límites establecidos.

Normas Parámetros	INEN	MEXICANA	CODEX	COMISIÓN EUROPEA	VENEZOLANA
Humedad % m/m	13 – 25 %	14 – 20%	< 21%		13 – 25,4%
Índice de Refracción %	-	-	-	1,4861 - 1,5007	1,4730 – 1,5044
Densidad Kg/m³	1,39 clase I 1,37 clase II	-	-	1,4220 g/cm ³	-
pH	-	-	-	3,5 - 4,5	-
Conductividad Eléctrica mS.cm⁻¹	-	-	< 0,8 mS.cm ⁻¹	0,1 - 0,7 mS.cm ⁻¹	-
Cenizas Totales % m/m	0,5%	0,2 – 1%	< 0,6 g/100 ml	-	Max 0,5 %
Azúcar Invertida	-	> 63,88 %	> 65 g/ 100 ml	-	-
FUENTE	36, 64, 119	72	37,120	23	121,122

Anexo 2. Relación entre el contenido de agua en mieles y el índice de refracción a diferentes temperaturas

Contenido de agua en mieles (%)		índice de refracción (20°C)	
13,0	19,2	1,5044	1,4885
13,2	19,4	4,5038	1,4880
13,4	19,6	1,5033	1,4875
13,6	19,8	1,5028	1,4870
13,8	20,0	1,5023	1,4865
14,0	20,2	1,5018	1,4860
14,2	20,4	1,5012	1,4855
14,4	20,6	1,5007	1,4850
14,6	20,8	1,5002	1,4845
14,8	21,0	1,4997	1,4840
15,0	21,2	1,4992	1,4835
15,2	21,4	1,4987	1,4830
15,4	21,6	1,4982	1,4825
15,6	21,8	1,4975	1,4820
15,8	22,0	1,4971	1,4815
16,0	22,2	1,4966	1,4810
16,2	22,4	1,4961	1,4805
16,4	22,6	1,4956	1,4800

16,6	22,8	1,4951	1,4795
16,8	23,0	1,4946	1,4790
17,0	23,2	1,4940	1,4785
17,2	23,4	1,4935	1,4780
17,4	23,6	1,4930	1,4775
17,6	23,8	1,4925	1,4770
17,8	24,0	1,4920	1,4765
18,0	24,2	1,4915	1,4760
18,2	24,4	1,4910	1,4755
18,4	24,6	1,4905	1,4750
18,6	24,8	1,4900	1,4745
18,8	25,0	1,4895	1,4740
19		1,4890	
FUENTE		66	

Anexo 3. Compuestos fenólicos, masas moleculares, iones pseudomoleculares, fragmentos tales de los espectros hijos, presentes en mieles de diferentes países.

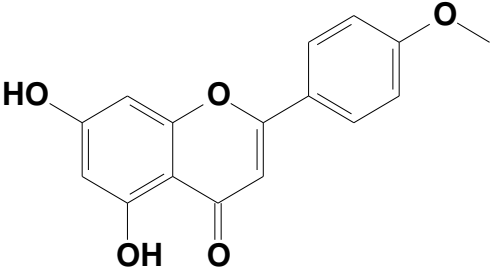
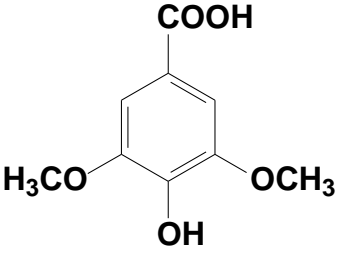
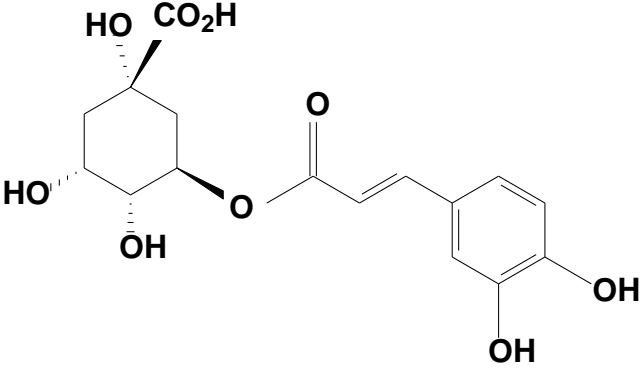
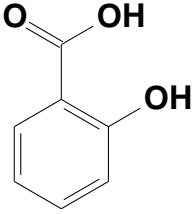
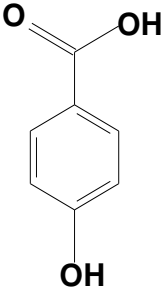
<i>Compuestos</i>	Masa (p.m)	Ion pseudomodo (-)	Iones fragmento MS/MS ions, mz	Referencia
<i>Fenólicos</i>				
<i>Ácido gálico</i>	170	169	125 – 79 – 81	81,82,83,85,86
<i>Ácido protocatequico</i>	154	153	109	81
<i>Acido p-coumarico</i>	164	163	119 – 93 – 163	81,82,83,85
<i>Acido 3,4 di-hidroxi benzoico</i>	154	153	109	82,85
<i>Acido 4-hidroxi benzoico</i>	138	137	93	85
<i>Acido p-hidroxi benzoico</i>	138	137	93	82,83
<i>Ácido criptoclorogénico</i>	354	353	173	85
<i>Ácido clorogénico</i>	354	353	191 – 179 – 146 – 85	81,82,83,85
<i>Ácido caféico</i>	180	179	161 – 135 – 107	81,82,83,85,86
<i>Acido 3-O-cafeicoquinico</i>	354	353	191 – 179 – 146	81
<i>Ácido di-cafeicoquinico</i>	516	515	191 – 179	81
<i>Ester feniletílico del ácido caféico (CAPE)</i>	284	283	179 – 135	81
<i>Ácido cinámico</i>	148	147	103 – 118 – 129	81
<i>Ácido trans-cinámico</i>	148	147	119 – 103 – 62	82
<i>Acido 2-hidroxi cinámico o ácido feniláctico</i>	166	165	147 – 119	86,123
<i>Ácido abscísico</i>	264	263	179 – 191	82

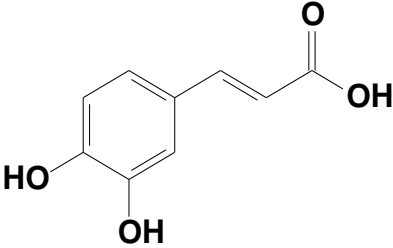
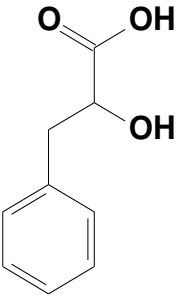
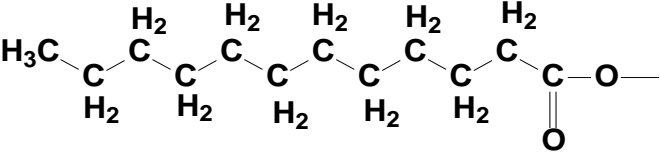
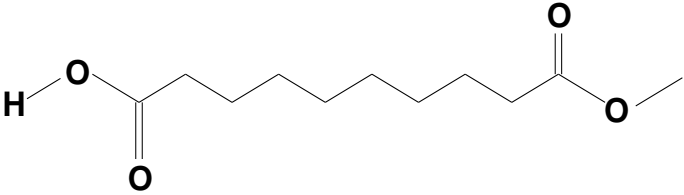
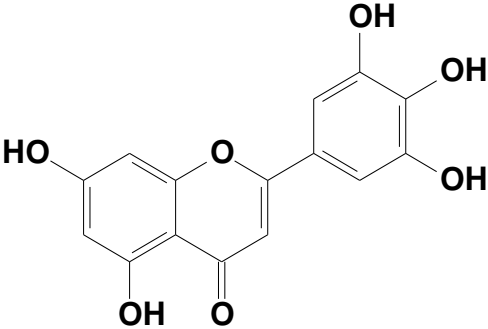
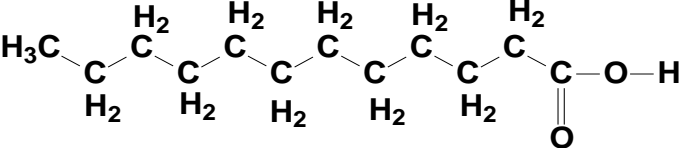
<i>Ácido trans, trans- abscísico</i>	264	263	219 - 201	81
<i>Ácido cis, trans- abscísico</i>	264	263	219 - 201	81
<i>Ácido ferúlico</i>	194	193	134 – 149 – 178 – 137	82,83
<i>Ácido salicílico</i>	138	137	93	85
<i>Ácido siríngico</i>	198	197	182 – 121 – 153 – 167 – 138 – 123 – 147 – 131	82,83
<i>Ácido sinápico</i>	224	223	164 – 149 - 121	83
<i>Ácido vanílico</i>	168	167	91 – 123 – 108 – 152	83
<i>Ácido feniláctico</i>	166	165	101 – 119 – 147	86
<i>Acido 4-metoxi- feniláctico</i>	196	195	133 – 149 – 177	86
<i>Flavonoles</i>				
<i>Quercetina 3-O- rutinósido. Rutina (quercetina-3-O- rutósido)</i>	610	609	301 - 151	81
<i>Miricetina</i>	318	317	179 – 151 – 137 - 109 – 317	81,82,83
<i>Quercetina</i>	302	301	179 – 151 – 107 - 121 - 301	81,82,83
<i>Quercetrina</i>	448	447	300	85
<i>Ramnetina</i>	316	315	300 – 165 – 121	81,82
<i>Hesperidina</i>	610	609	301	85
<i>Hesperitina</i>	610	609	300 – 271 – 151	82
<i>Kaemferol</i>	286	285	161 – 151 – 135 – 93 – 175	81,82,83

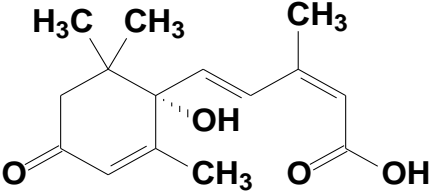
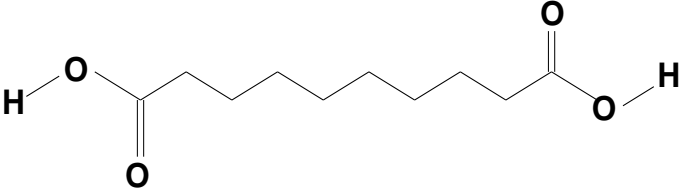
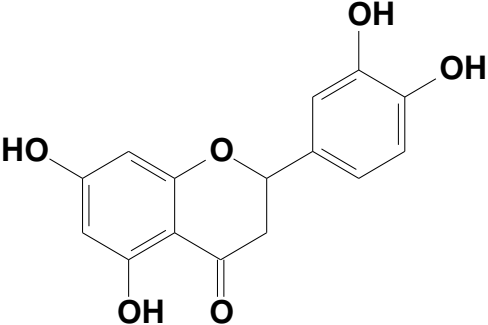
<i>Isoramnetina</i>	316	315	300 – 255 - 199 - 151 – 107	81,82,83,85
<i>Kaempferide</i>	300	299	284 – 228 – 212 – 151 – 132	81
<i>Quercetina bis-metilada</i>	330	329	315 - 165	81
<i>Galangina</i>	270	269	227 – 197 – 183 – 151	81,82
<i>Naringenina</i>	272	271	151 – 119 – 107	83
<i>Naringina</i>	580	579	151 – 271 – 119 – 107	82,83
Flavonas				
<i>Luteolina</i>	286	285	213 - 133 – 151 – 107	81,82,83
<i>Apigenina</i>	270	269	183 – 151- 149 – 117 – 107	81,82,83
<i>Crisina</i>	254	253	181 – 151 – 101 – 63 – 253 – 143 – 193 – 209	81,82
<i>Acacetina</i>	284	283	268 – 151 – 133 – 107	81
<i>Tectocrisina</i>	268	267	252 – 165	81
<i>di-hidroxiflavona</i>	254	253	197 – 181 – 133 – 117	81
<i>Metoxi-crisina</i>	284	283	268 – 239 – 211	81
<i>Rutina</i>	610	609	300 – 271 – 301 – 255 – 151	82,83
<i>Tricetina</i>	302	301	151	
Flavononas				
<i>Eriodictyol</i>	288	287	135 – 125 – 107	81,82
<i>Sakuranetin</i>	286	285	165 – 133	81,82,85

<i>Isosakurametín</i>	286	285	164	85
<i>Alpinetina</i>	270	269	197 – 133	81,82
<i>Pinostrobina</i>	270	269	254 – 165 – 135 – 179	81,82
<i>Pinocembrina</i>	256	255	213 – 211 – 151 – 107 – 65	81,82
<i>Flavanonoles</i>				
<i>Pinobanksin</i>	272	271	253 – 243 – 165 – 151 – 107	81,82,85
<i>Pinobanksin -5- metiléter-3-O-acetato</i>	328	327	285 – 271 – 253 – 165	81
<i>Pinobanksin -5- metiléter</i>	286	285	271 – 253 – 179 – 165 – 139	81
<i>Pinobanksin -3-O- acetato</i>	314	313	271 – 253	81,82
<i>Pinobanksin -3-O- propionato</i>	328	327	271 – 253	81
<i>Pinobanksin -3-O- butirato o isómero</i>	342	341	272 – 253	81
<i>Pinobanksin -3-O- penteonato o isómero</i>	356	355	271 – 253	81
<i>Pinobanksin -3-O- penteonato o isómero</i>	354	353	271 – 253	81
<i>Pinobanksin -3-O- hexanoato o isómero</i>	370	369	271 – 253	81

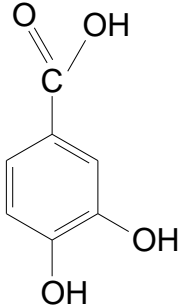
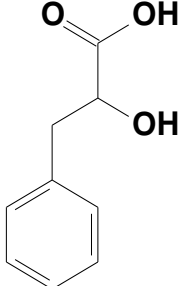
Anexo 4. Estructuras de compuestos fenólicos y flavonoides identificados en muestra 1

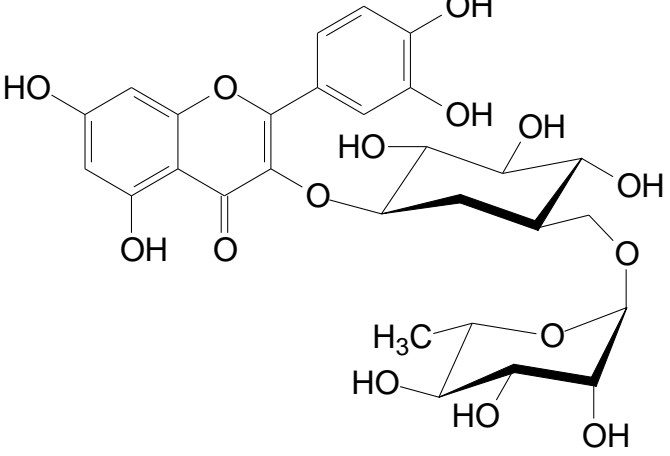
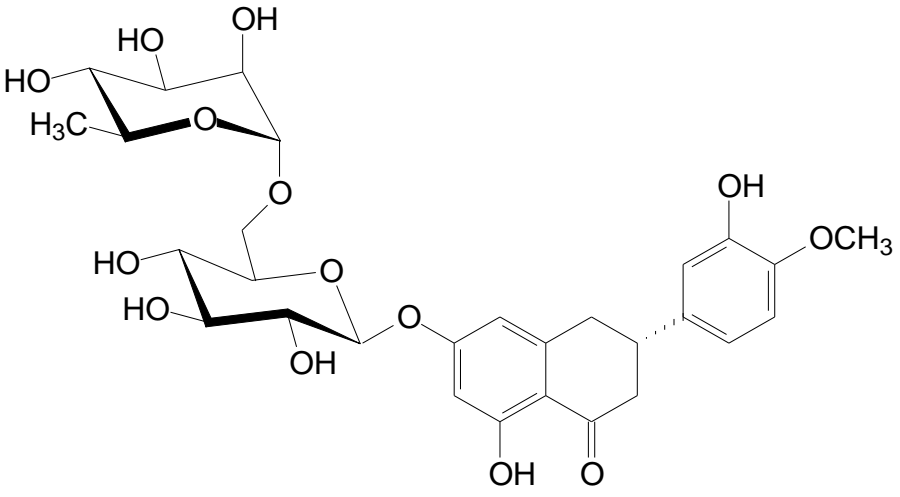
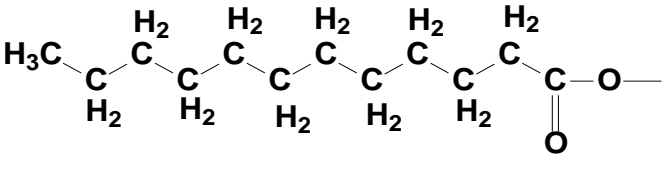
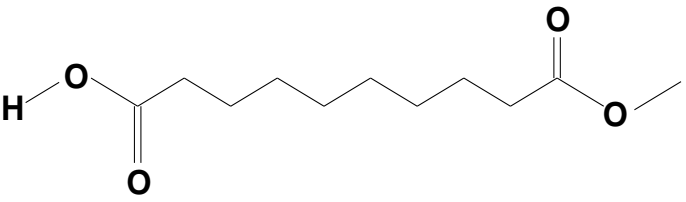
NOMBRE	ESTRUCTURA
Acacetina	
Ácido siríngico	
Acido 3-O cafeicoquínico o clorogénico	
Ácido salicílico	
Acido 4-hidroxi benzoico	

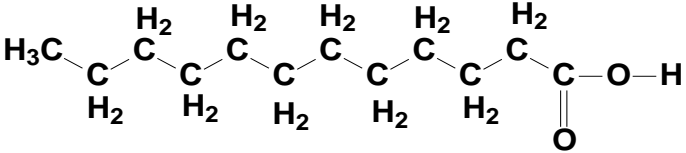
<p>Ácido caféico</p>	
<p>Acido 2-hidroxi cinámico (feniláctico) o isómero</p>	
<p>Glicósidos (hexosa) del ácido láurico</p>	
<p>Glicósidos (hexosa) del ácido sabático</p>	
<p>Tricetina</p>	
<p>Ácido láurico</p>	

<p>Ácido trans-trans abscísico o el isómero cis-trans</p>	
<p>Ácido sebácico</p>	
<p>Luteolina</p>	

Anexo 5. Estructuras de compuestos fenólicos y flavonoides identificados en muestra 2

NOMBRE	ESTRUCTURA
<p>ácido 3,4-dihidroxi benzoico (ácido protocatéquico)</p>	
<p>ácido 2-hidroxi cinámico (fenil láctico) o isómero</p>	

<p>rutina, hesperidina o hesperitina</p>	 <p style="text-align: center;">Rutina</p>  <p style="text-align: center;">Hesperidina</p>
<p>glicósidos (hexosa) del ácido láurico</p>	
<p>glicósidos (hexosa) del ácido sebácico</p>	

ácido láurico	
ácido sebácico	