

Artículo original

# Estudio preliminar de la calidad nutraceutica y autenticidad de la miel con base a características bioquímicas y capacidad antioxidante.

Preliminary study of nutraceutical quality and authenticity of honey based on biochemical parameters and antioxidant capacity.

Pérez-Pérez Elizabeth<sup>1</sup>, Daboin María<sup>1</sup>, Pérez Mariel<sup>1</sup>, Peña-Vera María<sup>1</sup>, Dávila Juan<sup>2</sup>, Sulbarán-Mora Miguel<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) "Prof. Guillermo López Corcuera", Departamento de Bioanálisis Clínico, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Sección de Biotecnología, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

Recibido: febrero de 2021 –Aceptado: mayo de 2021

## RESUMEN

La miel es uno de los productos más comercializados y falsificados, por lo que es importante establecer estándares de calidad y autenticidad. En el presente estudio se evaluó la calidad nutraceutica y autenticidad de la miel con base a parámetros bioquímicos (polifenoles, flavonoides y proteínas) y capacidad antioxidante. Se seleccionaron 8 mieles comercializadas en el Mercado Periférico de Mérida (Venezuela) (muestras C), así como 8 muestras auténticas (A) y una miel artificial (AR). A todas las muestras se les midió la concentración de proteínas, polifenoles y flavonoides; y se determinó la capacidad antioxidante de las mieles empleando los métodos capacidad antioxidante total (CAT), % de inhibición del radical hidroxilo (RH) y actividad antioxidante (AOA). Se encontró una importante correlación entre la concentración de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante para cada uno de los métodos usados. Se elaboró un dendograma utilizando el método clúster, lo que permitió agrupar a las mieles por propiedades comunes. El análisis de clúster permitió determinar

que la concentración de flavonoides y polifenoles, así como la capacidad antioxidante determinada a través de los métodos CAT y AOA son parámetros útiles para determinar la calidad nutraceutica y autenticidad de las muestras de miel. No son útiles en este sentido la concentración de proteínas y la actividad antioxidante medida por el método de inhibición del radical hidroxilo. En resumen, estos parámetros podrían ser incluidos en los estándares de calidad de las muestras de miel, valorizando este tipo de productos como alimentos nutraceuticos.

## PALABRAS CLAVE

Miel, *Apis mellifera*, capacidad antioxidante, calidad nutraceutica, autenticidad, polifenoles, flavonoides, proteínas.

## ABSTRACT

Honey is considered one of the most commercialized products, therefore it's important an authentic product with high quality characteristics. The objective of this study was to assess the nutraceutical quality and authenticity of honey based on biochemical parameters

(polyphenols, flavonoids and proteins) and antioxidant capacity. Eight honeys marketed in the Peripheral Market of Merida (Venezuela) (samples C) were selected, as well as 8 authentic samples (A) and an artificial honey (AR). The concentration of proteins, polyphenols and flavonoids was measured in all the samples; and the antioxidant capacity of the honeys was determined using total antioxidant capacity (TAC) method, % inhibition of the hydroxyl radical (RH) and antioxidant activity method (AOA). An important correlation was found between the concentration of phenols and flavonoids and the antioxidant capacity for each of the methods used. A dendrogram was prepared using the cluster method, which allowed the honeys to be grouped by common properties. The cluster analysis allowed determining that the concentration of flavonoids and polyphenols, as well as the antioxidant capacity determined through the CAT and AOA methods, are useful parameters to determine the nutraceutical quality and authenticity of the honey samples. Protein concentration and antioxidant activity as measured by the hydroxyl radical inhibition method are not useful in this regard. In summary, these parameters could be included in the quality standards of honey samples, valuing this type of product as nutraceutical foods.

## KEY WORDS

Honey, *Apis mellifera*, antioxidant capacity, nutraceutical quality, authenticity, flavonoids, polyphenols, proteins.

## INTRODUCCIÓN

La miel es una sustancia natural producida por una amplia variedad de especies de abejas. Es un fluido dulce y viscoso, producido por las abejas *Apis mellifera* o por diferentes subespecies, a partir del néctar de las flores o plantas, y de otras secreciones extra florales que las abejas liban, transportan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, deshidratan y almacenan en panales. Constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre ha

aprovechado para nutrirse. Su composición es compleja y los carbohidratos representan la mayor proporción, dentro de los que destacan la fructosa y glucosa; contiene además una gran variedad de sustancias menores dentro de las que se encuentran enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales. La composición de la miel depende de diversos factores tales como la contribución de la planta, suelo, clima y condiciones ambientales, principalmente [1]. El principal uso de la miel es gastronómico, empleándose en la elaboración de alimentos y bebidas, esto debido a su alto valor nutritivo. También se han asociado a la miel otras funciones además de alimenticias, principalmente se le atribuyen propiedades medicinales basadas en observaciones empíricas, sin conocimiento preciso de los componentes que la convierten en un excelente agente terapéutico. Sin embargo, se continúan realizando estudios cuyo objetivo principal es determinar la relación existente entre los componentes de la miel y sus propiedades terapéuticas [2,3].

La literatura disponible referente a la miel se enfoca principalmente en la apicultura y sus productos, estudios sobre la problemática regional de la apicultura, la bioactividad de los productos de la colmena [4], y los problemas en la productividad asociados a la africanización de las colmenas [5]. Sin embargo, hay una dimensión menos explorada y que amplía cada día, el inconveniente de la adulteración de la miel. La miel es frecuentemente sujeta a prácticas fraudulentas que incluyen una falsa identidad acerca de su origen floral y/o geográfico, así como la mezcla con azúcares de menor calidad. Es por esto que la autenticación de la miel se ha hecho más importante y necesaria para los productores, consumidores y expendedores [6,7,8].

A nivel mundial, el Codex Alimentarius Commission establece como criterios de calidad de la miel los límites de ciertos parámetros fisicoquímicos, dentro de los que destacan el contenido aparente de azúcares reductores y los contenidos de sacarosa, glucosa, humedad, sólidos insolubles en agua, cenizas, acidez, hidroximetilfurfural, y el índice de diastasa [9,10]. En este sentido, algunos países o gobiernos regionales, tales como Estados Unidos y Argentina,

emiten estándares que exigen que se mencionen las sustancias agregadas a la miel. Otros no tienen ninguna ley en cuanto a la pureza de la miel o simplemente emiten pautas voluntarias sin poder hacerlas cumplir, entre los que se pueden mencionar Venezuela y Colombia. Por ejemplo, la legislación establece que todos los productos que se venden como miel en la Unión Europea no deben contener ningún aditivo, incluidos los antibióticos que se usan para tratar las enfermedades de las abejas, y toda miel que presente defectos que afecten considerablemente el sabor debe venderse como “miel de panadero” para que se utilicen en la fabricación de alimentos procesados. Por su parte, el gobierno de Estados Unidos no analiza la pureza de la miel y permite trazas de antibióticos, siendo Florida el único estado que exige que la miel enumere todos los aditivos que contenga siempre que haya sido fabricada y se venda dentro de ese estado [11].

Según las normas de la Comisión Venezolana de Normas Industriales, COVENIN (2191-84), la miel se puede definir como la sustancia dulce sin fermentar, producida por abejas obreras, a partir del néctar de las flores o de exudación de otras partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas, almacenan y maduran en los panales. La miel no deberá absorber sabor, aroma o color, adquirir materias extrañas durante su elaboración y conservación, ni contener toxinas naturales de plantas, en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud [12].

Recientemente, se han desarrollado métodos de vanguardia para la detección de mieles fraudulentas, especialmente para detectar la adulteración más común: la adición de azúcar. La técnica más aceptable utilizada es el perfil por resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución [7], y también técnicas como la espectroscopia de ruptura inducida por láser [13], Raman, infrarrojo cercano e infrarrojo medio [14]. A pesar de la excelencia de estos métodos de reciente aplicación en la apicultura, los mismos son extremadamente costosos y dependen de equipos altamente especializados, siendo muy poco accesibles para los pequeños productores [15].

Es por lo antes mencionado que algunos autores proponen el uso de nuevos parámetros de calidad

para mieles, de más fácil desarrollo y accesibilidad. Entre los propuestos se encuentra el análisis de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante para evaluar la calidad nutracéutica y autenticidad de la miel. Los compuestos fenólicos constituyen un grupo muy amplio de más de 500 sustancias vegetales repartidas en 5 clases y 31 subclases. Además de su impacto organoléptico (color, astringencia, aroma, amargor), sus propiedades antioxidantes aportan un beneficio potencial para la salud. Algunos de ellos, como los antocianos o los glicósidos flavonoides son muy específicos de algunas plantas, y sus perfiles pueden utilizarse en el marco de controles de autenticidad de productos procesados y no procesados. Para ello, se utilizan métodos no específicos que miden el contenido global de compuestos fenólicos, expresado en forma de índice, es decir, equivalentes de ácido gálico, ácido clorogénico o catéquino. Un enfoque más detallado que reside en la cromatografía permite cuantificar específicamente algunos compuestos de interés. Asimismo, un análisis adicional permite identificar y cuantificar otros compuestos que pertenecen a esta amplia familia [11].

De lo antes señalado, esta investigación tiene como objetivo establecer si las características bioquímicas tales como contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas, y actividad antioxidante pueden utilizarse como indicadores de la calidad nutracéutica y autenticidad de mieles comerciales de Mérida (Venezuela).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población y Muestra:** La muestra fue seleccionada al azar, entre diversas mieles que se comercializan en el Mercado Periférico del estado Mérida (Venezuela), considerándose ocho mieles (Tabla 1). Además, estas mieles comerciales fueron comparadas con ocho mieles auténticas conservadas en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) “Prof. Guillermo López Corcuera” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela); y con una muestra de miel artificial que fue procesada en el mismo

laboratorio con fines investigativos del trabajo en cuestión.

**TABLA 1.**

Muestras de miel usadas en el presente estudio.

Muestra	Lugar de origen	Descripción
<b>Mieles comerciales adquiridas en el Mercado Periférico de Mérida</b>		
C1	Venezuela	Fabricación 04/2014
C2	Venezuela	Fabricación 09/2015
C3	Venezuela	Fabricación 02/2014
C4	Venezuela	Fabricación 07/2014
C5	Venezuela	Fabricación 08/2014
C6	Venezuela	Fabricación 12/2015
C7	Venezuela	Fabricación 11/2015
C8	Venezuela	Fabricación 10/2015
<b>Mieles auténticas</b>		
A9	Mérida, Venezuela	No disponible
A12	Moromoro, Ecuador	No disponible
A13	Esmeralda, Ecuador	No disponible
A15	Mérida, Venezuela	No disponible
A18	Mérida, Venezuela	No disponible
A22	Coro, Venezuela	No disponible
A27	Mérida, Venezuela	No disponible
A31	Barinas, Venezuela	No disponible
<b>Miel Artificial</b>		
AR10	ANBIOMOL	Fabricación 05/2016

**Preparación de las muestras de miel:** A cada tubo de eppendorf se le añadió un total de  $100 \pm 10$  mg de cada muestra de miel, fueron colocados en un homogeneizador de vidrio (Thomas No. A3528, USA), se les agregó 1 mL de etanol 95% (v/v), y se homogenizaron en baño de hielo. Los homogenatos fueron centrifugados en una centrifuga BHG Optima II a 3000 rpm por 10 min, y los sobrenadantes fueron usados para los ensayos bioquímicos.

**Preparación de la miel artificial (AR10):** La miel artificial se utilizó como control y se preparó con 40 g de fructosa, 30 g de glucosa, 8 g de maltosa y 2 g de sacarosa, disueltos en 100 ml de agua estéril. La disolución se esterilizó por 30 min a 15 psi y 100 °C, y se llevó a cabo el procedimiento de extracción descrito anteriormente [16].

**Determinación de la Concentración de Grupos Fenólicos:** El contenido total de polifenoles fue determinado por espectrofotometría

a 765 nm usando el reactivo de Folin-Ciocalteu [17], y una solución de 0,1 g/L de ácido gálico como estándar (diluido a 0, 0,25, 0,05 y 0,1 g/L).

**Determinación del contenido de flavonoides:**

El método colorimétrico del cloruro de aluminio fue modificado del procedimiento reportado por Woisky y Salatino [18]. Fue usada la quercitina como estándar para construir una curva de calibración. Se disolvieron 10 mg de quercitina en etanol al 80% (v/v), y entonces diluidos hasta concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Las soluciones estándar diluidas (0,5 mL) fueron mezcladas por separado con 1,5 mL de etanol al 95% (v/v), 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10% (p/v), 0,1 mL de acetato de potasio 1 M y 2,8 mL de agua destilada. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, fue medida la absorbancia de la mezcla de reacción a 415 nm. La cantidad de cloruro de aluminio fue sustituida por agua destilada en el blanco. De modo similar, 0,5 mL de extractos etanólicos de las muestras en estudio se dejaron reaccionar con el cloruro de aluminio para la determinación del contenido de flavonoides.

**Determinación de la concentración de proteínas:** La determinación de proteínas consistió en una técnica colorimétrica basada en el método de Lowry y cols. [19], usando albúmina bovina como estándar.

**Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo (RH):** Se utilizó el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell y cols. [20], reportando el porcentaje de inhibición de formación del radical hidroxilo por cada 100 g de miel.

**Método de la actividad antioxidante (AOA):** El valor de la AOA fue determinado por el método de Koracevic y cols. [21], en comparación con ácido úrico como estándar.

**Método de la capacidad antioxidante total (CAT):** Se usó el método desarrollado por Re y cols. [22], usando una solución de 8 mM de Trolox, la cual se diluyó para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8  $\mu\text{M}$ , en buffer PBS 5 mM (pH 7,4). Se calculó el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical ABTS) a 734 nm después de 6 min de reacción, y se reportó el valor de capacidad antioxidante total (CAT) como el equivalente en concentración de Trolox

que produce el mismo porcentaje de disminución de color.

**Análisis estadístico:** Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado aplicando los test o pruebas paramétricas, para el análisis de distribución normal o diferencias significativas entre los grupos de muestra. Se empleó el sistema cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas, empleándose el análisis de la varianza por medio de la prueba ANOVA post hoc Scheffé [23, 24].

**Método de clúster:** El método de clúster fue utilizado para obtener grupos de mieles que sean semejantes entre sí, es decir, que el grupo esté unido en cuanto al parentesco de sus características bioquímicas, y por otro lado a su capacidad antioxidante. Si en los grupos formados se encuentran al mismo tiempo mieles comerciales y auténticas, se puede decir que ambas comparten características similares, y son por ende semejantes, por lo que las mieles comerciales serían además mieles auténticas. Además, se comparan las características bioquímicas y actividad antioxidante de las muestras en estudio con una miel artificial fabricada con una mezcla de azúcares, con la hipótesis de que la miel artificial forme un grupo independiente y único, si es que ninguna de las muestras usadas en este trabajo es una miel artificial constituida por una mezcla de azúcares. Esto permite discernir si existen mieles comerciales consideradas fraudes o que no son mieles genuinas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la concentración de flavonoides, polifenoles y proteínas de cada una de las muestras de miel usadas en este estudio. Los valores de concentración de flavonoides se encontraron entre 66,7 y 302,1 mg EQ/100 g de miel.

Por otra parte, las concentraciones de polifenoles se encontraron entre 268,2 y 1036,8 mg EAG/100 g, siendo la muestra A12 (Moromoro, Ecuador) la que presentó el menor valor de concentración de polifenoles y la muestra C5 de miel comercial la que presentó el mayor contenido de polifenoles; mientras que para la concentración

de proteínas la muestra A22 (Coro, Venezuela) fue la que presentó el menor valor de concentración de proteínas (56,4±1,1 mg de proteína/100 g de miel) y la muestra de miel artificial AR10 la que presentó el mayor valor de concentración de proteínas (450,8 ± 3,3 mg de proteína/100 g de miel). Un hecho interesante fue que la muestra de miel artificial presentó el mayor valor de concentración de proteínas, caso contrario a lo observado en las determinaciones de concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides. Para los tres parámetros bioquímicos descritos anteriormente se observan valores estadísticamente similares entre mieles comerciales y auténticas, siendo diferente la muestra de miel artificial (Tabla 2).

**TABLA 2.**

Caracterización química de las mieles en estudio.

Muestra	Flavonoides*	Polifenoles**	Proteínas***
C1	201,9 ± 0,3 <sup>h</sup>	602,7 ± 0,3 <sup>f</sup>	131,4 ± 0,2 <sup>e</sup>
C2	157,6 ± 1,4 <sup>f</sup>	806,5 ± 0,4 <sup>h</sup>	383,2 ± 0,3 <sup>g</sup>
C3	187,9 ± 2,4 <sup>g</sup>	702,2 ± 2,6 <sup>g</sup>	136,0 ± 0,7 <sup>e</sup>
C4	155,2 ± 2,6 <sup>f</sup>	952,1 ± 3,3 <sup>i</sup>	190,6 ± 1,1 <sup>f</sup>
C5	127,3 ± 0,9 <sup>e</sup>	1036,8 ± 7,4 <sup>j</sup>	57,3 ± 1,6 <sup>a</sup>
C6	302,1 ± 1,1 <sup>j</sup>	813,3 ± 9,3 <sup>h</sup>	80,5 ± 1,6 <sup>c</sup>
C7	183,2 ± 2,3 <sup>g</sup>	721,5 ± 2,4 <sup>g</sup>	96,2 ± 2,4 <sup>d</sup>
C8	85,3 ± 2,4 <sup>c</sup>	610,0 ± 2,9 <sup>f</sup>	106,4 ± 3,6 <sup>d</sup>
A9	201,9 ± 0,3 <sup>h</sup>	362,1 ± 3,3 <sup>c</sup>	86,0 ± 2,5 <sup>c</sup>
A12	111,0 ± 0,4 <sup>c</sup>	268,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	61,0 ± 0,5 <sup>b</sup>
A13	66,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	447,1 ± 0,9 <sup>d</sup>	62,9 ± 0,5 <sup>b</sup>
A15	241,5 ± 1,4 <sup>i</sup>	427,5 ± 1,1 <sup>d</sup>	65,6 ± 0,8 <sup>b</sup>
A18	176,2 ± 2,2 <sup>g</sup>	1017,9 ± 4,5 <sup>j</sup>	63,8 ± 2,2 <sup>b</sup>
A22	113,3 ± 2,3 <sup>c</sup>	602,7 ± 3,8 <sup>f</sup>	56,4 ± 1,1 <sup>a</sup>
A27	276,5 ± 0,6 <sup>i</sup>	298,7 ± 2,9 <sup>b</sup>	95,3 ± 1,6 <sup>d</sup>
A31	97,0 ± 0,8 <sup>d</sup>	581,9 ± 2,7 <sup>e</sup>	94,4 ± 1,3 <sup>d</sup>
AR10	0,002 ± 0,001 <sup>a</sup>	59,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	450,8 ± 3,3 <sup>h</sup>

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé (P <0.05). \*mg equivalentes quercetina/100g de miel (mg EQ/100 g); \*\* mg equivalentes ácido gálico/100g de miel (mg EAG/100 g); \*\*\*mg proteínas/100 g de miel.

Los valores de actividad antioxidante determinados por 3 métodos diferentes para las muestras de miel en estudio se presentan en la Tabla 3, así como la comparación con antioxidantes comerciales usados a una concentración de 1 µM. Los valores de AOA variaron entre 0,52 y 1,73 EAU/100 g, siendo la muestra A18 la que presentó el mayor valor de AOA (1,73 ± 0,06 mM EAU/100 g), y la que presentó el menor valor fue la muestra de miel artificial AR10. No se encontró correlación lineal entre el contenido de flavonoides (R2 = 0,170) y

concentración de proteínas ( $R_2 = 0,126$ ) con la actividad antioxidante medida por el método del AOA; mientras que se observa una fuerte correlación positiva entre el contenido de polifenoles y el valor de AOA ( $R_2 = 0,843$ ) (Tabla 4).

**TABLA 3.**  
Actividad antioxidante de las mieles en estudio.

Muestra	AOA*	RH**	CAT***
C1	1,48±0,08 <sup>g</sup>	76,2±0,5 <sup>c</sup>	161,4 ± 1,4 <sup>f</sup>
C2	1,25±0,06 <sup>e</sup>	35,3±1,3 <sup>b</sup>	137,1 ± 2,6 <sup>d</sup>
C3	1,24±0,02 <sup>e</sup>	50,9±0,4 <sup>c</sup>	143,4 ± 3,4 <sup>e</sup>
C4	1,53±0,01 <sup>h</sup>	77,9±0,6 <sup>c</sup>	300,3 ± 5,2 <sup>h</sup>
C5	1,66±0,05 <sup>i</sup>	64,8±1,3 <sup>d</sup>	300,1 ± 5,3 <sup>h</sup>
C6	1,55±0,06 <sup>h</sup>	37,1±0,7 <sup>b</sup>	163,0 ± 4,8 <sup>f</sup>
C7	1,61±0,03 <sup>i</sup>	69,2±0,5 <sup>d</sup>	168,3 ± 1,5 <sup>f</sup>
C8	1,70±0,05 <sup>j</sup>	49,3±2,2 <sup>c</sup>	146,4 ± 0,9 <sup>e</sup>
A9	1,41±0,05 <sup>g</sup>	89,1±3,5 <sup>f</sup>	107,7 ± 5,8 <sup>b</sup>
A12	1,71±0,07 <sup>j</sup>	90,6±1,5 <sup>f</sup>	123,1 ± 6,3 <sup>e</sup>
A13	1,31±0,04 <sup>f</sup>	86,2±0,6 <sup>f</sup>	127,8 ± 2,6 <sup>e</sup>
A15	1,41±0,06 <sup>g</sup>	23,3±1,3 <sup>a</sup>	128,0 ± 3,8 <sup>e</sup>
A18	1,73±0,06 <sup>j</sup>	43,7±2,7 <sup>c</sup>	114,2 ± 3,1 <sup>b</sup>
A22	1,14±0,08 <sup>d</sup>	46,1±3,3 <sup>c</sup>	103,2 ± 4,6 <sup>b</sup>
A27	1,44±0,01 <sup>g</sup>	57,8±4,2 <sup>c</sup>	108,9 ± 3,7 <sup>b</sup>
A31	1,24±0,05 <sup>e</sup>	83,7±0,4 <sup>f</sup>	206,4 ± 3,3 <sup>g</sup>
AR10	0,52±0,03 <sup>a</sup>	89,7±0,9 <sup>f</sup>	53,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
Quercitina+	0,86±0,03 <sup>c</sup>	53,0±1,1 <sup>c</sup>	100,6±1,7 <sup>b</sup>
Melatonina+	0,83±0,02 <sup>c</sup>	53,9±1,0 <sup>c</sup>	97,6±5,1 <sup>b</sup>
Ácido Lipoico+	0,71±0,07 <sup>b</sup>	27,9±0,9 <sup>a</sup>	124,7±3,1 <sup>c</sup>

Los datos se presentan como media ± Error Estándar (n=3). Las columnas que comparten la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba ANOVA post hoc Scheffé ( $P < 0,05$ ). \*mM equivalentes de ácido úrico/100g de miel (mM EAU/100 g); \*\*%inhibición/100g de miel; \*\*\*µmoles equivalentes de Trolox/100 g de miel (µmoles ET/100 g); +, antioxidantes comerciales usados a 1 µM de concentración. AR, miel artificial.

**TABLA 4**  
Correlación entre la actividad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos.

Parámetro	Pro	Fla	Pol	AOA	RH	CAT
Pro	1	0,056	0,029	0,126	0,105	0,096
Fla		1	0,034	0,170	0,065	0,043
Pol			1	<b>0,843</b>	<b>0,802</b>	<b>0,921</b>
AOA				1	0,192	0,098
RH					1	0,154
CAT						1

En cuanto al efecto de las muestras sobre el radical hidroxilo, los valores de porcentaje de inhibición de la formación del radical hidroxilo variaron entre 23,3 y 90,6 % de inhibición/100 g de miel, siendo la muestra A12 la que presentó mayor porcentaje de inhibición, y la muestra A15 la que

reportó el menor % de inhibición. Contrariamente a lo ocurrido con el método del AOA, la muestra de miel artificial fue estadísticamente similar a las mieles auténticas A9, A12, A13 y A31 (Tabla 3). No se encontró correlación entre la concentración de proteínas ( $R_2 = 0,105$ ) y el contenido de flavonoides ( $R_2 = 0,065$ ) con la actividad antioxidante sobre el radical hidroxilo; pero si existe una fuerte correlación entre el contenido de polifenoles y la capacidad de inhibición del radical hidroxilo (Tabla 4).

Para finalizar, los valores de CAT variaron desde 53,4 hasta 300,3 µmoles ET/100 g, siendo la muestra de miel artificial AR10 la que presentó el menor valor, y las muestras C4 y C5 las del mayor valor de CAT. La muestra de miel artificial AR10 es completamente diferente a todas las muestras de mieles comerciales y auténticas, presentando el menor valor de CAT de todo el ensayo (Tabla 3). Nuevamente, no se encontró correlación entre la concentración de proteínas ( $R_2 = 0,096$ ) y el contenido de flavonoides ( $R_2 = 0,043$ ) con los valores de CAT, pero si con el contenido de polifenoles de las muestras de miel ( $R_2 = 0,921$ ) (Tabla 4).

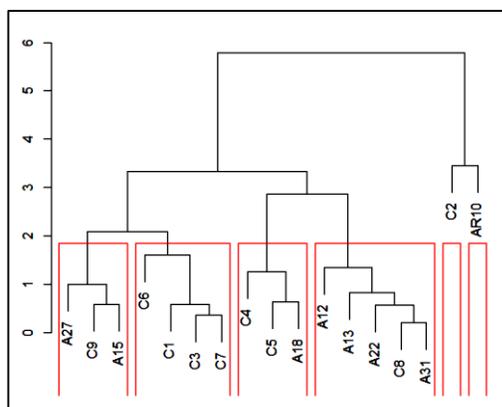
Si se comparan los valores de actividad antioxidante, por cualquiera de los métodos usados en este trabajo, de las mieles comerciales con las auténticas, se observa que muchas de ellas comparten la misma letra lo que significa que son estadísticamente iguales. Por ejemplo, si se compara la capacidad de inhibición de la formación del radical hidroxilo de las mieles comerciales, auténticas y artificial se puede observar que existen muestras de miel comercial que son estadísticamente similares a las mieles auténticas, tal es el caso de las muestras C3, C8, A18, A22 y A27 (Tabla 3). Al comparar la actividad antioxidante de las muestras de miel con la de antioxidantes comerciales, se observa que la mayoría de las muestras de miel presentaron valores superiores a los reportados para los antioxidantes comerciales usados en este estudio (Tabla 3).

Con las concentraciones de flavonoides, polifenoles y proteínas, se agruparon las mieles de acuerdo a la similitud de las concentraciones de los parámetros determinados, dando como resultado la Figura 1 y la Tabla 5.

Se observa que las muestras quedaron distribuidas en 6 grupos, siendo el Grupo 1 el conformado por las muestras C3, C4, C5, C7, y A18; el Grupo 2 conformada por la muestra C6; el Grupo 3, constituido únicamente por la muestra de miel artificial AR10; el Grupo 4, lo conforman las muestras C1, A9, A15 y A27; el Grupo 5 por la muestra C2 como miembro único del grupo; y finalmente el Grupo 6, en donde se encuentran las muestras C8, A12, A13 y A22.

Es de gran importancia destacar que la muestra de miel artificial (AR10) presentó concentraciones de polifenoles y flavonoides completamente diferentes a las muestras de mieles auténticas y

comerciales, resultando en un grupo único en respuesta a su comportamiento bioquímico; es decir, la muestra AR10, no guarda ninguna semejanza en cuanto a estos parámetros bioquímicos con respecto a las muestras comerciales y auténticas. Además, se observa en el análisis de clúster de las variables bioquímicas que existen grupos conformados tanto por mieles auténticas como por mieles comerciales, por ejemplo, los grupos 1 (C3, C4, C5, C7, A18) y 4 (C1, A9, A15, A27), lo que sugiere ciertas semejanzas entre estas muestras de miel (Figura 1, Tabla 5).



**Fig. 1.** Dendrograma de agrupamiento de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de miel por el método Clúster.

También fue llevado a cabo el análisis de clúster tomando como base los valores de actividad antioxidante, y los resultados se presentan en la Figura 2 y Tabla 6. Al igual que en el caso de las características bioquímicas, se formaron 6 grupos distintos de acuerdo a semejanzas en los valores de actividad antioxidante: Grupo 1, mieles C1, C7 y A31; Grupo 2, donde podemos encontrar las muestras C2, C3, A15 y A22; Grupo 3 cuyos integrantes son A9, A12 y A13; Grupo 4 conformado por la muestra AR10; Grupo 5, en donde se agruparon las mieles C4 y C5; y el Grupo 6, con las mieles C6, C8, A18 y A27.

Al igual que en el análisis de clúster de las características bioquímicas, la muestra de miel artificial AR10 forma un grupo independiente de miembro único; y existen grupos en los cuales se

pueden encontrar tanto mieles auténticas como mieles comerciales, tal es el caso del Grupo 6 (con las muestras C6, C8, A18 y A27), y todos los demás grupos formados a excepción de los Grupos 4 y 5 (Figura 2, Tabla 6).

Al analizar en detalle los grupos formados en cuanto a las semejanzas en los valores de actividad antioxidante, fue posible construir 5 categorías que caracterizan a las mieles en cuanto a su efectividad como antioxidantes, escala que va desde actividad antioxidante muy baja hasta muy alta, pasando por los valores bajo, medio y alto (Tabla 7). En este sentido, para el método de la capacidad antioxidante total (CAT) usando Trolox como patrón, la mayoría de las muestras de miel tiene valores de actividad antioxidante bajos, y pocas

**TABLA 5.**

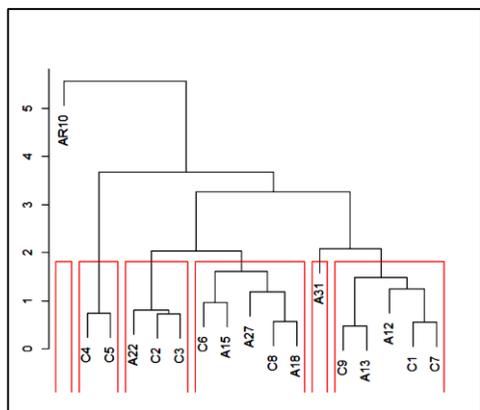
Valores medios resultantes del Análisis Clúster de las características bioquímicas.

Grupo	Muestras	Flavonoides*	Polifenoles**	Proteínas***
1	C3, C4, C5, C7, A18	165,960	886,10	108,780
2	C6	302,100	813,30	80,500
3	AR10	0,002	59,60	450,800
4	C1, A9, A15, A27	230,450	422,75	94,575
5	C2	157,600	806,50	383,200
6	C8, A12, A13, A22	94,660	501,98	76,220

\*mg equivalentes quercetina/100g de miel (mg EQ/100 g); \*\* mg equivalentes ácido gálico/100g de miel (mg EAG/100 g); \*\*\*mg proteínas/100 g de miel.

muestras tienen actividad antioxidante Media (3), Alta (2) o Muy alta (1); mientras que para el método del radical hidroxilo la mayoría de las

muestras presenta valores considerados Muy Altos (7) y para el método del AOA la mayor parte de las muestras entran en la categoría de Altos (10).



**Fig. 2.** Dendrograma de agrupamiento de los valores de actividad antioxidante de las muestras de miel por el método Clúster.

Se puede observar en la Tabla 7 que la muestra de miel artificial presenta valores muy bajos para los métodos CAT y AOA, mientras que para el radical hidroxilo puede ser incluida en la categoría Alta. En segundo lugar, la calidad en capacidad antioxidante de las muestras depende del método utilizado, por ejemplo, la muestra C2 presenta capacidad antioxidante baja medida con el método

CAT, pero media y alta con los métodos de radical hidroxilo y AOA, respectivamente. De manera similar ocurre con la muestra A12, la cual tiene una actividad antioxidante baja con el método CAT, pero muy alta con los otros dos métodos ensayados en este trabajo. Este comportamiento se repite con algunas variaciones en todas las muestras utilizadas en este estudio.

**TABLA 6.**

Valores medios resultantes del Análisis Clúster de la actividad antioxidante.

Grupo	Muestras	AOA*	RH**	CAT***
1	C1, C7, A31	1,260	38,900	127,925
2	C2, C3, A15, A22	1,504	82,260	137,660
3	A9, A12, A13	1,605	46,975	133,125
4	AR10	1,595	71,350	300,200
5	C4, C5	1,240	83,700	206,400
6	C6, C8, A18, A27	0,520	89,700	53,400

\*mM equivalentes de ácido úrico/100g de miel; \*\*% inhibición/100g de miel; \*\*\*μmoles equivalentes de Trolox/100 g de miel.

**TABLA 7.**

Muestras de miel pertenecientes a cada una de las categorías de actividad antioxidante generadas en este estudio.

Rango	CAT*		RH**		AOA***	
	Valor	Frec	Valor	Frec	Valor	Frec
Muy Baja	<60	AR10	<1	0	<0,50	AR10
Baja	61-150	C2, C3, C8, A9, A12, A13, A15, A18, A22, A27	1,00-25	A15	0,51-0,80	0
Media	151-200	C1, C6, C7	26-50	C2, C6, C8, A18, A22	0,81-1,20	A22
Alta	201-300	A31	51-75	C3, C5, C7, A27, AR10	1,21-1,60	C1, C2, C3, C4, C6, A9, A13, A15, A27, A31
Muy Alta	>300	C4, C5	76-100	C1, C4, A9, A12, A13, A31, AR10	1,61-1,90	C5, C7, C8, A12, A18

\*μmoles equivalentes de Trolox/100 g de miel.; \*\*% inhibición/100g de miel; \*\*\*mM equivalentes de ácido úrico/100g de miel

Se reportaron valores de concentración de polifenoles que variaron entre 268,2 y 1036,8 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de miel, mientras que la concentración de flavonoides se encontró entre 0,002 y 302,1 mg equivalentes de quercitina/100 g de miel, para las muestras de miel artificial y la miel comercial C6, respectivamente (Tabla 3). Estos valores son mucho mayores a los reportados en la bibliografía. Por ejemplo, Sosa y cols. [25] determinaron la concentración de polifenoles y flavonoides de diferentes mieles de la especie *Apis mellifera* provenientes de diversos apiarios y latitudes de la región central de la provincia de Villa Clara-Cuba, reportando valores medios de polifenoles comprendidos entre 6,1 y 44,0 mg EAG/100 g de miel, mientras que los valores de concentración de flavonoides se encontraron entre 1,17 y 2,39 mg EQ/100 g de miel. También son mucho mayores a los reportados por Fernandes y cols. [26] quienes obtuvieron concentraciones de flavonoides de  $28,27 \pm 9,40$  mg EQ/100 g y de polifenoles de  $92,34 \pm 13,55$  mg EAG/100 g en muestras de miel de *A. mellifera* procedentes del estado de Alagoas en el noreste de Brasil; y que los resultados de Liberato y cols. [27] en los que el contenido de polifenoles de miel *A. mellifera* de diferentes orígenes botánicos fue de  $108,50 \pm 3,52$  mg EAG/100 g miel.

En lo que se refiere a la concentración de proteínas, estos valores variaron entre 56,4 (muestra A22, Coro-Venezuela) y 450,8 mg de proteína/100 g de miel (muestra AR10) (Tabla 3). Al comparar estos resultados con los reportados por Moniruzzaman y cols. [28], se observa que los resultados de esta investigación son superiores a los encontrados por los autores antes mencionados, quienes obtuvieron concentraciones de proteínas entre 20,4 y 48,3 mg/100 g de miel, para mieles elaboradas en Malasia por *A. mellifera*, *A. dorsata* y *A. cerana*. Por otra parte, Hira y cols. [29] realizaron un análisis fisicoquímico y determinaron el potencial antimicrobiano de muestras de mieles provenientes de Pakistán conocidas como miel pequeña (*A. mellifera*), miel grande (*A. dorsata*) y miel siddar (*Ziziphus jujube*), reportando valores de concentración de proteínas entre 571,272 y 777,598 mg/100 g de miel. Los resultados de concentración de proteínas reportados por estos

autores son superiores a los obtenidos en esta investigación.

El análisis fisicoquímico de muestras de miel, especialmente la determinación de su contenido de polifenoles, flavonoides y proteínas, es de vital importancia para establecer el valor nutracéutico de una miel, ya que a estos compuestos se les atribuyen una gran variedad de actividades biológicas relacionadas con la prevención de diversos procesos patológicos. Desde el punto de vista de su actividad biológica, muchos polifenoles y flavonoides tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer [30].

La muestra de miel artificial (AR10) presentó una concentración de flavonoides de  $0,002 \pm 0,001$  mg EQ/100 g, y una concentración de polifenoles de  $59,6 \pm 1,1$  mg EAG/100 g, las cuales fueron estadísticamente diferentes al resto de las muestras de miel usadas en este estudio (Tabla 3). Son muy pocos los estudios en la literatura en los que se lleva a cabo una comparación de muestras de miel auténticas con muestras de miel artificial. Uno de ellos es el trabajo de Blasa y cols. [31], quienes midieron la concentración de flavonoides y polifenoles de las dos variedades de miel más comunes en Italia, Millefiori y Acacia, y la compararon con una muestra de miel artificial, encontrando una diferencia de más de 10 mg EQ/100 g y de 12 mg EAG/100 g para las concentraciones de flavonoides y polifenoles, respectivamente. Las diferencias en cuanto a la concentración de flavonoides y polifenoles de la miel artificial en comparación con las mieles comerciales (serie C) y auténticas (serie A) son superiores a 60 mg EQ/100 g para la concentración de flavonoides, y 200 mg EAG/100 g para la concentración de polifenoles (Tabla 4). Es importante destacar que el valor de concentración de polifenoles de la AR10 no es nulo, posiblemente debido a que a pesar de que el método utilizado es muy preciso y sensible, pueden encontrarse numerosas variaciones relacionadas a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, las concentraciones de los reactivos y el tiempo de reacción [32].

En cuanto a la concentración de proteínas medida para la muestra AR10, la misma fue de  $450,8 \pm 3,3$  mg proteínas/100 g de miel, el cual es el valor más alto reportado para las muestras analizadas en este estudio, resultado interesante al tratarse de una miel artificial, fabricada principalmente con azúcares que no deberían emitir señal positiva con el reactivo de Folin usado en este método (Tabla 7). No existen reportes en la literatura en los que se haya realizado la medición de la concentración de proteínas de muestras de miel artificial. Sin embargo, Mæhre y cols. [33] aclararon algunas de las fallas que se pueden presentar cuando se utiliza el método de Lowry y cols. [19] para la determinación de proteínas. En este sentido los autores exponen que a pesar de que el método es sensible, específico, y fácil de adaptar al análisis en pequeñas escalas; la cantidad del color producido varía con diferentes proteínas, y en algunos casos el color no es estrictamente proporcional a las concentraciones de proteínas presentes en la muestra. También pueden interferir otros macrocomponentes como lípidos y carbohidratos; y se ha demostrado que la prolongación de los tiempos para efectuar la medida también es un factor que interfiere en los resultados. Es posible que algunos de los carbohidratos presentes en la muestra AR10 interfieran con la técnica de Lowry para llevar a cabo la determinación de proteínas, por lo que sería recomendable realizar la medición de este parámetro usando otra técnica.

En cuanto a la capacidad antioxidante en método del AOA, el valor más bajo pertenece a la muestra A22 ( $1,14 \pm 0,08$  mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel), mientras que el valor más alto corresponde a la muestra A18 ( $1,73 \pm 0,06$  mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel) (Tabla 3). Varias muestras de la serie C presentan valores de AOA estadísticamente similares a los reportados por la serie A, por ejemplo, C1 y A9, o C8 y A18. Mondragón y Ulloa [34] determinaron la capacidad antioxidante de mieles comerciales, auténticas y miel artificial, estableciendo la relación entre las variables estudiadas y tomando en consideración el color de la miel. Rodríguez y cols. [35] encontraron resultados que oscilaban entre 0,26 y 2,73 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel, determinando que los valores

más bajos de AOA corresponden a las mieles más claras (entre 0,07 y 0,09 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel), mientras que los valores más altos se encontraron en las mieles más oscuras (oscilando entre 1,51 y 3,01 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel). Los resultados de este trabajo son superiores a los reportados por Rodríguez y cols. [35] quienes reportan valores de AOA entre 0,64 y 0,74 mM equivalentes de ácido úrico/100 g de miel. Lo mismo ocurre para las mieles de Mérida (Venezuela) estudiadas por Pérez y cols. [36] con valores de AOA de  $0,69 \pm 0,01$  mM equivalentes de ácido úrico/100 g. Otro ejemplo del comportamiento descrito anteriormente se puede observar al comparar con el trabajo de Colmenares y Carreño [37] quienes encontraron valores de AOA entre 0,85 y 1,12 mM equivalentes de ácido úrico/100 g en diferentes muestras de miel producidas por *A. mellifera* provenientes de Malasia, Grecia y Australia. También son superiores a los reportados por Steinbrück [38] para muestras de miel producidas por tres especies del género *Apis* (*A. mellifera*, *A. dorsata* y *A. cerana*) provenientes de Asia y Europa, con valores de AOA que oscilaron entre 0,89 y 0,92 mM equivalentes de ácido úrico/100 g.

El segundo método utilizado fue el efecto en la formación del radical hidroxilo, encontrando valores entre  $23,3 \pm 1,3$  (muestra A15) y  $90,6 \pm 1,5$  (muestra A12) % de inhibición/100 g (Tabla 3). Al igual que en el AOA, existen muestras entre las series A y C que comparten la misma letra, es decir que son estadísticamente similares, como lo son C8 y A18 y A22. Estos resultados se asemejan a los reportados por Rodríguez y cols. [35] donde encontramos % de inhibición/100 g entre 62,73 y 77,77, siendo estos mayores a la melatonina, ácido lipoico y quercetina. También son similares a los reportados por Colmenares y Carreño [37] para mieles fabricadas por *A. mellifera* de Malasia, Grecia y Australia (entre 36,7 y 68,3% de inhibición/100 g), y que los de Steinbrück [38] con muestras de miel de tres especies del género *Apis* (*A. mellifera*, *A. dorsata* y *A. cerana*) provenientes de Asia y Europa (entre 52,7 y 75,4% de inhibición/100 g). Es importante destacar que varias de las muestras procesadas en este estudio presentan valores de inhibición del radical

hidroxilo superior a los reportados en los trabajos citados anteriormente.

Las muestras analizadas en este estudio reportaron valores de CAT entre 107,7 y 300,3  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/100 g, siendo en todos los casos superiores a los encontrados para la melatonina y quercitina, y en algunos casos para el ácido lipoico (Tabla 3). Estos valores son superiores a los reportados por Muñoz y cols., [39] quienes determinaron la capacidad antioxidante de 18 tipos de mieles colectadas en supermercados de Perú, encontrando valores entre 28,75 (miel de zapote) y 68,45 (miel de eucalipto) CAT/100 g de miel. Lo mismo ocurre con los resultados de Ciappini y cols. [40] quienes indican valores de CAT de  $102,02 \pm 44,69$  TEAC/100 g de miel. Sin embargo, son inferiores a los encontrados por Colmenares y Carreño [37] con rangos de CAT de 309,5 y 563,1  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/100 g; o los encontrados por Steinbrück [38] cuyos valores de CAT variaron entre 319,5 y 545,0  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/100 g.

En lo que se refiere a la actividad antioxidante de la miel artificial (AR10), se observan los valores más bajos de actividad antioxidante medidos por los métodos de AOA ( $0,52 \pm 0,03$  mM equivalente de ácido úrico/100 g) y del catión radical ABTS $\bullet+$  ( $53,4 \pm 0,9$   $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/100 g) valores que son estadísticamente diferentes a todas las muestras analizadas en este trabajo, incluso menores a los reportados para la melatonina, quercetina y ácido lipoico. Sin embargo, para el porcentaje de inhibición del radical hidroxilo se registró un valor de  $89,7 \pm 0,9$  % de inhibición/100 g, el cual es estadísticamente similar a varias de las muestras de las mieles auténticas (Serie A, A9, A12, A13 y A31), y superior a los reportados para los antioxidantes comerciales usados como control en este trabajo (Tabla 3). Los valores observados para la miel artificial en cuanto a la inhibición del radical hidroxilo son similares a los reportados por Pérez y cols. [36] quienes midieron 40% de inhibición del anión superóxido/100 g de miel y 28,8% de inhibición del radical hidroxilo/100 g de miel, y un valor de AOA 0,35 mM equivalente de Trolox/100 g de miel. Este estudio in vitro en el que se utiliza como control una miel artificial elaborada con 40 g de fructosa, 30 g de glucosa, 8 g de maltosa y 2 g de sacarosa, composición de azúcares

sugerida por Taormina y cols. [16], se encontró que la miel artificial posee entre 40 y casi 60% de la actividad antioxidante de la miel de abejas evaluada con tres métodos (porcentaje de inhibición del anión superóxido y del radical hidroxilo, y degradación del benzoato) [35]. Con estas observaciones, parece necesario considerar que además de las correlaciones positivas entre la actividad antioxidante de la miel de abejas con su contenido de flavonoides y de polifenoles, existe un componente de base, conferido por los azúcares que representan aproximadamente el 80% de la miel, y el 20% de agua donde se disuelven.

En la Tabla 4 se evidencia una clara correlación positiva entre la actividad antioxidante medida por los 3 métodos usados en este trabajo y la concentración de polifenoles ( $p > 0,500$ ); más no se observa la misma correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de proteínas y contenido de flavonoides ( $p < 0,500$ ). Estos resultados concuerdan con el paradigma en el que se establece que la capacidad antioxidante está positivamente correlacionada con la concentración de polifenoles, del cual existen múltiples reportes en la literatura. Por ejemplo, Vit y cols. [41] evaluaron la actividad antioxidante total (AAT) de 50 mieles enviadas al servicio de Análisis Químico del Instituto de Investigaciones Apícolas en Dol, República Checa, con el método del catión radical ABTS $\bullet+$ , encontrando que la CAT no varió significativamente según el origen botánico de las mieles, pero fue directamente proporcional al color y al contenido de flavonoides y de polifenoles. Otro ejemplo lo constituye el trabajo de Pérez-Pérez y cols. [42] en el que se midió la actividad antioxidante de productos de la colmena de *Tetragonisca angustula* de Mérida (Venezuela), encontrando una fuerte correlación entre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante. Durante muchos años ha sido demostrada una correlación positiva entre la actividad antioxidante de la miel y su contenido de polifenoles en mieles de diferentes orígenes florales, geográficos y entomológicos tales como España [43], Australia [44], Perú [45] y México [46]. Todos estos autores proponen un efecto sinérgico entre los polifenoles de la miel y los más de 181 compuestos presentes en una muestra de

miel, tales como azúcares, aminoácidos y proteínas, carotenos, entre otros [47].

Los compuestos fenólicos de la miel actúan como antioxidantes naturales y se ha incrementado su uso debido a la contribución a la salud humana. En la miel se encuentran un amplio rango de polifenoles tales como ácido cafeico, quercetina, kaemferol, galangina, crisina, acacetina, pinocembrina, apigenina, entre otros. En general, la mayoría de los compuestos fenólicos que se encuentran en la miel se presentan en la forma de flavonoides y ácidos fenólicos [30, 48, 49, 50]. Las concentraciones de estos compuestos dependen de varios factores, incluyendo la especie de planta usada por las abejas, la salud de la planta, la estación, y factores ambientales [51].

En lo que se refiere al análisis de clúster, se puede observar la formación de grupos claramente diferenciados, en los que destaca que la miel artificial forma grupos únicos ya que no comparte características similares al resto de las muestras analizadas en este trabajo (Figuras 1 y 2, Tablas 5 y 6). El método de análisis de clúster ha sido empleado por otros autores para evaluar diferencias entre muestras de miel. Por ejemplo, Díaz [52] empleó el método clúster para la diferenciación física y química de las muestras de mieles de acuerdo con el origen floral, pudiendo clasificarlas en un dendograma según el análisis polínico. En esta investigación, las mieles lograron ser clasificadas en grupos de acuerdo con sus características bioquímicas a través del clúster, con información arrojada en un previo análisis de laboratorio.

Muchos autores han propuesto que los parámetros bioquímicos, tales como concentración de polifenoles, flavonoides y proteínas, así como la capacidad antioxidante, deberían ser incluidos dentro de los estándares de calidad para mieles nacionales (Normas COVENIN en Venezuela), e internacionales. Los autores sugieren que a través de estos parámetros se puede determinar la autenticidad de una muestra de miel, y se puede valorizar el producto incrementando su calidad nutracéutica. En concordancia con lo anterior, Vit y cols. [41] proponen que el estudio de la actividad antioxidante de las muestras de miel es de gran utilidad, y que podría en un futuro muy cercano servir como parámetro complementario para

caracterizar las mieles y detectar sus fraudes. Además, afirman que los valores bioquímicos y de capacidad antioxidante podrían indicarse en la etiqueta de la miel para informar al consumidor, al menos en mieles con uso medicinal.

En el caso de la presente investigación, se confirmó la autenticidad de la miel mediante la determinación de la concentración de polifenoles y flavonoides (Figura 1, Tabla 5), y la actividad antioxidante medida a través de los métodos CAT y AOA (Figura 2, Tabla 6), esta autenticidad está basada en que ninguna de las muestras de miel analizadas en este trabajo se agrupa con la muestra de miel artificial para estos parámetros, pudiendo afirmar que los mismos son de gran utilidad para determinar la autenticidad de una muestra de miel si se compara con una miel fraude elaborada con una mezcla de azúcares, la cual es la forma más común de fraude encontrada en el mercado. En el caso de la concentración de proteínas y la actividad antioxidante medida a través del radical hidroxilo no se observa este comportamiento, ya que existen muestras de miel auténticas y comerciales que se asemejan a la miel artificial en estos parámetros (Tablas 2 y 3, respectivamente).

En lo que se refiere a la calidad nutracéutica, la misma puede evidenciarse de acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 7, en la que se establecieron categorías de capacidad antioxidante, específicamente las categorías Muy baja, Baja, Media, Alta y Muy alta. Nuevamente queda demostrado que el método del RH no es viable para establecer la calidad de las muestras de miel ya que la miel artificial presenta valores similares a las mieles comerciales y auténticas, como por ejemplo dentro de los rangos altos se encuentra acompañada en el mismo grupo por las muestras C3, C5 y A27. Esto puede deberse a fallas o desventajas presentes en el método radical hidroxilo descrito por Halliwell y cols. [20], siendo la más resaltante que el efecto del secuestro de radicales se determina no sólo por la reactividad del antioxidante con el radical, sino también por su concentración. Aunque muchos antioxidantes reaccionan rápidamente con el radical hidroxilo, muchas moléculas biológicas, que son más abundantes que los antioxidantes, reaccionan rápidamente con ese radical. Por eso, es prácticamente imposible para algún antioxidante secuestrar el radical hidroxilo efectivamente. Otro

punto importante es saber dónde se producen los radicales libres, y si el antioxidante es capaz de alcanzarlos. Por ejemplo, la vitamina C es un potente secuestrador para radicales hidroxilos, pero pobre frente a otros radicales [53].

En líneas generales, se encuentra mayor frecuencia de mieles en el rango Bajo (10/16) en el caso del método CAT, mientras que son mayores en los rangos Muy alto (7/16) y Alto (10/16) para los métodos RH y AOA, respectivamente (Tabla 7). Lo anterior indica que la respuesta de cada miel a un método de determinación de actividad antioxidante es diferente, lo que hace suponer que cada muestra de miel posee mecanismos diferentes de acción frente a distintos radicales libres. En este sentido, el método CAT mide la capacidad de una muestra de revertir la formación de un radical que se ha generado previamente, de modo que mientras más se revierta el radical a su forma no radical, más antioxidante es esa muestra; mientras que en los métodos RH y AOA se mide la capacidad que tiene una muestra dada de inhibir la formación del radical hidroxilo.

Se puede observar en la Tabla 7 que, en líneas generales, las muestras de miel analizadas en este estudio tienen más capacidad de inhibición de la formación del radical hidroxilo que de revertir el radical ABTS, lo que se observa con las muestras A15, C1, C4, A9, A12, y A13, las cuales presentan una baja capacidad de reversión del radical ABTS y una alta capacidad de inhibición del radical hidroxilo. Pérez [43] y Cefali y cols. [53] mencionan que tales capacidades de inhibición y de reversión vienen dadas por acción del componente de mayor proporción en la miel, en este caso los polifenoles y flavonoides. La muestra A31 posee características de importancia en cuanto a su comportamiento en los tres métodos usados en este estudio, ya que se considera una muestra con buena capacidad de reversión y al mismo tiempo de inhibición, encontrándose en la categoría alta para los métodos CAT y AOA, y muy alta con respecto al RH (Tabla 7). Esto significa que es una muestra altamente versátil para inhibir y revertir un radical libre.

Existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes alimentarios pueden ejercer su acción, entre las que se tienen aquellos compuestos que reaccionan directamente con los

radicales libres, como pueden ser los polifenoles, deteniendo el proceso en cadena de oxidación lipídica. Esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET) aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar los métodos de medida de capacidad antioxidante [54].

El mecanismo más conocido, aunque no necesariamente el más relevante a la acción, se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como “estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas”. Esto último supone la conocida actividad secuestradora de radicales libres que tienen muchas moléculas antioxidantes. En el caso de los radicales libres, tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como SET, permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno [55].

Junto al mecanismo SET, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón), definido como HAT. En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente [55].

Los antioxidantes cuya acción es promovida a través de mecanismos SET y/o HAT son mayoritariamente los antioxidantes no-enzimáticos, sean estos normalmente biosintetizados por el organismo humano, o bien que ingresen al organismo a través de la dieta. La mayor parte de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su estructura química, como grupos funcionales, hidroxilos fenólicos (ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles). No obstante, otros antioxidantes, no fenólicos, como el glutatión, la melatonina, y los ácidos ascórbico, dihidro-lipoico y úrico, son también ejemplos de moléculas cuya acción es promovida por mecanismos SET y/o HAT [56].

Junto a los mecanismos SET y HAT, ciertos antioxidantes pueden actuar también estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica la adición directa del radical a su estructura. Ejemplo de este tipo de acción antioxidante es la promovida por carotenos como beta-caroteno. Como resultado de tal reacción, el radical libre, por ejemplo, peroxilo, pierde su condición, y el caroteno es modificado covalentemente, convirtiéndose en un radical libre que a través de reacciones sucesivas es oxidado y convertido en derivados epóxido y carbonilos de notablemente menor reactividad. Como es de esperar, la interacción directa entre un antioxidante y una especie reactiva prevendrá ya sea el inicio y/o la propagación de procesos oxidativos que afectan a los sustratos biológicos [56].

De este modo, por la vía SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. El método CAT, a pesar de ser métodos HAT es dependiente del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox. Algunos elementos trazas y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados [55].

La presencia de una variedad de mecanismos en una misma muestra de miel puede deberse a su misma naturaleza, ya que es importante recordar que las mieles están compuestas por una amplia variedad de moléculas, entre los que podemos contar proteínas, enzimas (catalasa, glucosa oxidasa), aminoácidos, metales, azúcares, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, entre otros. Cada uno de estos compuestos puede contribuir en cierta medida a la capacidad antioxidante de una muestra de miel. Esto pone en evidencia la necesidad de escoger de manera eficiente el método a utilizar de modo de poder medir de la mejor manera posible la contribución de cada elemento a la capacidad antioxidante total de la miel. Los resultados presentados en este trabajo hacen evidente que un porcentaje alto de la capacidad antioxidante se debe a la presencia de polifenoles y flavonoides, ya que se observa una correlación positiva entre las concentraciones de polifenoles y la actividad

antioxidante medida por los 3 métodos (Tabla 4), pero esto es evidente ya que los polifenoles y flavonoides se encuentran en grandes cantidades, más no son los únicos responsables de la actividad antioxidante de una muestra de miel. Se ha determinado que la cantidad y naturaleza de los polifenoles y flavonoides de una muestra de miel dependen de la fuente floral, el área geográfica, condiciones ambientales, origen botánico, e incluso zona geográfica, este último debido a que el suelo y el clima determinan el tipo de flora de una región determinada [57]. En este sentido, sería interesante conocer la composición de los diferentes elementos que conforman una muestra de miel y determinar en qué porcentaje contribuye cada componente a su capacidad antioxidante. Teniendo claro el enunciado anterior, se puede inferir que cada miel se comporta de una manera distinta, cada miel tiene su propia identidad, definida por una composición química única, lo que hace que se comporten de manera diferente una de las otras.

En virtud de que la determinación de autenticidad de las muestras de miel comparando con una miel artificial constituida por una mezcla de azúcares no fue posible a través del método RH, se propone utilizar otros métodos alternativos, tales como el método DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), en este método se sitúa el radical orgánico en presencia del antioxidante, y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm [58]. El mecanismo de reacción de este método no está aun totalmente claro. Se pensaba que era un mecanismo simultáneamente SET y HAT; sin embargo, un trabajo ha sugerido que el mecanismo fundamental es SET, y que la reacción de tipo HAT tendría una escasa contribución, dado que se produce lentamente en disolventes que son fuertes aceptadores de H, como el metanol o el etanol [59].

---

## CONCLUSIONES

En líneas generales, el análisis de clúster permitió concluir que los parámetros fisicoquímicos tales como concentración de polifenoles y flavonoides, así como la actividad antioxidante medida a través de los métodos del AOA y CAT son útiles para determinar la

autenticidad de una muestra miel, siempre y cuando se trate de una miel fraude consistente de una mezcla de azúcares. No son útiles para determinar la autenticidad la concentración de proteínas medida por medio del método de Lowry y la capacidad antioxidante medida a través de la capacidad de inhibición del radical hidroxilo. En lo que se refiere a la calidad nutracéutica, todos los parámetros medidos en este estudio resaltan el valor nutracéutico de las muestras de miel, incluso logrando establecer categorías de Muy Bajo a Muy alto de la capacidad antioxidante medida por los tres métodos distintos empleados en este estudio. Se sugiere que los valores de concentración de polifenoles y flavonoides, así como la capacidad antioxidante sean incluidos en los estándares de calidad nacionales e internacionales, valorizando de este modo la miel comercializada y permitiendo distinguirla de mieles fraude consistentes de mezclas de azúcares.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Centro de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto FA-602-17-08-F.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LM, Oliveira-Costa AC, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2016; 196: 309-323.
- [2] Cortés M, Vigil P, Montenegro G. The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation. *Cienc. Inv. Agr.* 2011; 38: 2-14.
- [3] Estrada H, Gamboa M, Chaves C, Arias L. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. *ALAN.* 2005; 55: 2-10.
- [4] Güemes FJ, Villanueva Rogel. Características de la apicultura en Quintana Roo y el mercado de sus productos. 1era ed. México: Chetumal, Quintana Roo, 2002. p. 36.
- [5] Urbina-Romero RA, Utrera-Quintana F, Castillo-González F, Livera-Muñoz M, Benítez-Riquelme I, Villa-Mancera AE, Hernández-Hernández JE, Silva-Rojas HV. Valoración del origen africanizado en la integración de una población experimental de *Apis mellifera* L. *Rev. Fitotec. Mex.* 2019; 42(2): 22-35.
- [6] Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G, Plessi M. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(15): 8495-8501.
- [7] He C, Liu Y, Liu H, Zheng X, Shen G, Feng J. Compositional identification and authentication of Chinese honeys by <sup>1</sup>H NMR combined with multivariate analysis. *Food Res Int.* 2020; 130: 108936. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108936.
- [8] Geana EI, Ciucure CT. Establishing authenticity of honey via comprehensive Romanian honey analysis. *Food Chem.* 2020; 306: 125595. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125595.
- [9] Codex Alimentarius Commission (CAC). Revised Codex Standard for Honey. CODEX STAN 12-1981. 2001. Rome, Italy: FAO/WHO.
- [10] Al-Farsi M, Al-Belushi S, Al-Amri A, Al-Hadhrani A, Al-Rusheidi M, Al-Alawi A. Quality evaluation of Omani honey. *Food Chem.* 2018; 262: 162-167.
- [11] Vit P, Enríquez E, Barth M, Matsuda A, Almeida-Muradian L. Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *MedULA, Revista de Facultad de Medicina.* 2006; 15(2): 89-95.
- [12] Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Miel de Abejas. Métodos de Ensayo. COVENIN 2191-84. Caracas: Fondonorma; 1984. p. 57.
- [13] Nespeca MG, Vieira AL, Júnior DS, Neto JAG, Ferreira EC. Detection and quantification of adulterants in honey by LIBS. *Food Chem.* 2020; 311: 125886. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125886.

- [14] Pita-Calvo C, Guerra-Rodríguez ME, Vázquez M. Analytical Methods Used in the Quality Control of Honey. *J Agric Food Chem*. 2017; 65(4): 690-703.
- [15] Arvanitoyannis IS, Chalboub C, Gotsiou P, Lydakis-Simantiris N, Kefalas P. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007; 45(3): 193-203.
- [16] Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microbiol*. 2001; 69: 217-225.
- [17] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. 1999; 299: 152-178.
- [18] Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res*. 1998; 37: 99-105.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
- [20] Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Annal Biochem*. 1987; 165: 215-219.
- [21] Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic, V. Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 356-361.
- [22] Re R, Pellegrini N, Protoggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*. 1999; 26: 1231-1237.
- [23] Sote A. Principios de Estadística. 2da ed. Caracas: Editorial Panapo de Venezuela; 2005. p. 143.
- [24] Devore JL. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 7ma ed. México: Cengage Learning, 2008. p. 285.
- [25] Sosa R; Tenori Borroto E, Marrero Chang O, Águila Gímenez E, Camacho Bordón S, Morales Montero A. Determinación de compuestos fenólicos, metales y su efecto sobre el potencial antioxidante y tóxico en mieles procedentes de la especie *Apis mellifera*. Proceedings III Congreso Cubano de Apicultura, 2009. La Habana, Cuba. p. 124.
- [26] Fernandes, A, Dos Santos M, Domarques A, Chagas S, Oda-Souza M, Queijeiro A. Composition and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless bees in Alagoas (Brazil): a multivariate analysis. *J Apicult Res*. 2012; 51: 23-35.
- [27] Liberato M, Morais S, Siqueira S, Menezes J, Ramos D, Machado L, Magalhães I. Phenolic content and antioxidant and antiacetylcholinesterase properties of honeys from different floral origins. *J Med Food*. 2013; 14(6), 63-74.
- [28] Moniruzzaman M, Md Ibrahim K, Siti Amrah S, Siew HG. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *BMC Complem Altern Med*. 2013; 23: 13:43.
- [29] Hira F, Javid D, Ihsan A, Safia A, Muhammad N. Physico-chemical analysis and antimicrobial potential of *Apis dorsata*, *Apis mellifera* and *Ziziphus jujube* honey samples from Pakistan. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014; 4(8): 633-641.
- [30] Tomás-Barberán F, Martos I, Ferreres F, Radovic B, Anklam E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric*. 2001; 81: 485-496.
- [31] Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini M, Albertini M, Piatti E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem*. 2006; 97: 217-222.
- [32] Martínez I, María P, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*. 2000; 50(1): 5-18.
- [33] Mæhre HK, Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen IJ. Protein Determination-Method Matters. *Foods*. 2018; 7(1): 5. doi: 10.3390/foods7010005.

- [34] Mondragón PM, Ulloa JA. Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopia de infrarrojo. *Revista Fuente*. 2015; (6): 5-9.
- [35] Rodríguez A, Pérez E, Vit P. Capacidad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. *Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel"* 2007; 38 (2): 13-17.
- [36] Pérez E, Rodríguez-Malaver A, Vit P. Antioxidant Capacity of Venezuelan Honey in Wistar Rat Homogenates. *J Med Food*. 2006; 9(4): 510–516.
- [37] Colmenares Y, Carreño J. Estudio de la capacidad antioxidante y antibacteriana de mieles de origen asiático [Tesis de pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Los Andes; 2015.
- [38] Steinbrück I. Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos etanólicos de mieles comerciales de origen Asiático y Europeo [Tesis de Pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Los Andes; 2017.
- [39] Muñoz AM, Alvarado-Ortíz C, Blanco T, Castañeda B, Ruiz J, Alvarado A. 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.
- [40] Ciappini M, Gatti B, Vito V. El color como indicador del contenido de flavonoides en miel. *Rev. Cien. Tecnol*. 2013; 19: 59-63.
- [41] Vit P, Gutiérrez M, Titera D, Bednar M, Rodríguez-Malaver A. Miele checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioq Clín Latin*. 2008; 42: 237-244.
- [42] Pérez-Pérez EM, Suárez E, Peña-Vera MJ, González AC, Vit P. Antioxidant activity and microorganisms in nest products of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 from Mérida, Venezuela. Vit P & Roubik DW, eds. *Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. 2013. pp. 1-8. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>
- [43] Pérez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes [Tesis de Pregrado]. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Madrid; 2007.
- [44] Oddo L, Heard T, Rodríguez A, Pérez R, Fernández M, Sancho M, Sesta G, Lusco L, Vit P. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *J Med Food*. 2008; 11: 789-794.
- [45] Rodríguez A, Rasmussen C, Gutiérrez M, Gil F, Nieves B, Vit P. Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *NPC*. 2009; 4: 1221-1226.
- [46] Rodríguez B, Mendoza S, Iturriga M, Castañón-Tostado E. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *J. Food Sci*. 2012; 77: C121-C127.
- [47] Erejuwa O, Sulaiman S, Ab Wahab M. Honey: a novel antioxidant. *Molecules*. 2012; 17: 4400-4423.
- [48] Cushnie T, Lamb A. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J. Ethnopharmacol*. 2005; 101: 243-248.
- [49] Fiorani M, Accorsi A, Blasa M, Diamantini G, Piatti E. Flavonoids from Italian multifloral honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54: 8328-8334.
- [50] Lianda R, Sant'Ana L, Echevarria A, Castro N. Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts. *J. Braz. Chem. Soc*. 2012; 23: 618-627.
- [51] Küçük M, Kolaylı S, Karaoğlu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem*. 2007; 100(2): 526-534.
- [52] Diaz C. Determinación del origen floral y caracterización física y química de mieles de abeja (*Apis mellifera* L.), etiquetadas como "miel de ulmo" (*Eucriphya cordifolia* Cav.) [Tesis de Pregrado]. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile, Chile: Biblioteca Central del INIA; 2003.
- [53] Cefali LC, de Oliveira Maia L, Stahlschmidt R, Ataide JA, Tambourgi EB, Rosa PCP, Mazzola

PG. Vitamin C in *Acerola* and Red Plum Extracts: Quantification via HPLC, In Vitro Antioxidant Activity, and Stability of their Gel and Emulsion Formulations. J AOAC Int. 2018; 101(5): 1461-1465.

[54] Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. Arch Biochem Biophys. 2010; 501(1): 23-30.

[55] Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. Curr Pharm Des. 2009; 15(26): 3063-3073.

[56] Romano AD, Serviddio G, de Mattheis A, Bellanti F, Vendemiale G. Oxidative stress and aging. J Nephrol. 2010; 23(Suppl 15): S29-S36.

[57] Peña-Vera M, Pérez-Pérez E, Vit P, Guerrero C, Sulbarán-Mora M. Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles de *Melipona favosa* (Fabricius 1798). En Avances y retos de la ciencia y la ingeniería. 1er ed. Publicaciones

Vicerrectorado Académico, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 2017. pp. 253-268.

[58] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 1995; 28: 25-30.

[59] Foti MC, Dasquino C, Geraci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methylesters with the DPPH radical in alcohol solutions. J Org Chem. 2004; 69: 2309-2314.

**Pérez-Pérez Elizabeth**, Orcid ID: 0000-0001-6288-302X

**Daboin María**, Orcid ID: 0000-0001-8432-0973

**Peña-Vera María**, Orcid ID: 0000-0002-7729-4401

**Dávila Juan**, Orcid ID: 0000-0002-1726-5289

**Sulbarán-Mora Miguel**, Orcid ID: 0000-0003-4230-6844