



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL NUTRACÉUTICO Y LA ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LA MIEL PROPOLIZADA ELABORADA POR LA  
EMPRESA APICARE, RIOBAMBA-CHIMBORAZO”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**LUIS SANTIAGO HERNÁNDEZ AGUIRRE**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*La Grandeza es un largo viaje que comienza con lo imposible y lo transforma en inolvidable, pero la Grandeza no se regala, debes perseguir, dominar y conquistar la Historia y entonces te conviertes en LEYENDA, y las LEYENDAS viven para siempre. Esta tesis se la dedico a todos aquellos que me ayudaron a lograr esa Grandeza. A mi madre por ser la razón de mi vida, a mi padre por enseñarme a ser quién soy, a mi hermano por compartir su alegría, a mi mascota por ser mi eterna compañía, a mis tías y tíos por confiar siempre en mí, a mis amigos por brindarme su sinceridad, a mis maestros por sus enseñanza, a todos quienes ayudaron en la ejecución de esta investigación.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y sus Autoridades por trabajar correctamente por el beneficio de la juventud.*

*A la empresa APICARE de Riobamba por el apoyo brindado en el desarrollo de la investigación y de manera especial al Ing. Raúl Llumiyinga Gerente General de la empresa por la confianza brindada para la elaboración del presente trabajo y a todos quienes forman parte de la misma.*

*A la Dra. Susana Abdo por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente tesis.*

*A la Dra. Olga Lucero por la guía y el aporte brindado como colaboradora en la elaboración del trabajo investigativo y experimental y al Bqf. Carlitos Pazmiño por su apoyo en las últimas etapas de la investigación.*

*A mi madre Gladys por haberme dado la fuerza para culminar la carrera, a mi tía Carmela por haberme apoyado en todo momento de mi estudio, a mi hermano Jonathan y a mi sobrino Juan Diego por ser mi inspiración al superar los obstáculos de la vida y a todos quienes me brindaron su amistad, confianza y comprensión.*

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL NUTRACÉUTICO Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MIEL PROPOLIZADA ELABORADA POR LA EMPRESA APICARE, RIOBAMBA-CHIMBORAZO”**, de responsabilidad del señor egresado Luis Santiago Hernández Aguirre, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Silvio Álvarez  
**DECANO FAC. CIENCIAS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Francisco Portero  
**DIRECTOR ESCUELA**  
**BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Susana Abdo  
**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bqf. Carlitos Pazmiño  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bqf. Fausto Contero  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tc. Carlos Rodríguez  
**DIRECTOR CENTRO**  
**DE DOCUMENTACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTA DE TESIS**

\_\_\_\_\_

Yo, **Luis Santiago Hernández Aguirre**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

**LUIS SANTIAGO HERNÁNDEZ AGUIRRE**

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	

<b>1</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Los Nutraceuticos.....	1
1.1.1	Definición.....	1
1.1.2	Características.....	2
1.1.3	Ventajas de los alimentos nutraceuticos.....	3
1.1.4	Papel terapéutico de los Nutraceuticos y sus efectos en la Salud Humana.....	3
1.1.5	Clasificación.....	4
1.2	Radicales Libres.....	5
1.2.1	Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	5
1.2.2	Fuentes de las Especies Reactivas de Oxígeno.....	6
1.2.3	Clasificación de los Radicales Libres.....	8
1.2.4	Efecto nocivo de los Radicales Libres (RL).....	8
1.2.5	Estrés Oxidativo.....	10
1.2.6	Enfermedades ocasionadas por los Radicales Libres (RL).....	11
1.3	Los Antioxidantes.....	13
1.3.1	Definición.....	13
1.3.2	Clasificación.....	14
1.3.2.1	Antioxidantes endógenos (Enzimáticos).....	15
1.3.2.2	Antioxidantes exógenos (No Enzimáticos).....	15
1.3.3	Sistemas de defensas antioxidantes.....	16
1.3.3.1	Terapias Antioxidantes.....	17
1.3.4	Capacidad Antioxidante Total de los Alimentos.....	18
1.3.4.1	Alimentos Antioxidantes.....	19
1.3.4.2	Métodos para medir la Capacidad Antioxidante.....	20
1.4	Compuestos Polifenólicos.....	21
1.4.1	Estructura de los Compuestos Polifenólicos.....	21

1.4.2	Fuentes de los Compuestos Polifenólicos.....	23
1.4.3	Efecto de los Compuestos Polifenólicos.....	23
1.5	Apicultura.....	24
1.5.1	Definición y Antecedentes.....	24
1.6	Productos Apícolas.....	25
1.6.1	La Jalea Real.....	26
1.6.2	El Polen.....	26
1.6.3	La Cera.....	26
1.6.4	La Apitoxina.....	27
1.6.5	La Miel.....	27
1.6.5.1	Definición.....	27
1.6.5.2	Origen y Formación.....	28
1.6.5.3	Cosecha o Recolección.....	29
1.6.5.4	Características Físicas.....	30
1.6.5.5	Composición Química.....	33
1.6.5.6	Clasificación.....	35
1.6.5.7	Valor Nutritivo.....	36
1.6.5.8	Valor Terapéutico.....	37
1.6.5.9	Calidad.....	38
1.6.6	El Propóleo.....	39
1.6.6.1	Definición.....	39
1.6.6.2	Origen y Formación.....	40
1.6.6.3	Fuentes de Propóleo.....	41
1.6.6.4	Recolección.....	42
1.6.6.5	El Propóleo en el Mercado Internacional.....	43
1.6.6.6	Características Físicas.....	44
1.6.6.7	Composición Química.....	44
1.6.6.8	Actividad Biológica.....	45
1.6.6.9	Calidad.....	46
1.7	El Jengibre.....	48
1.7.1	Generalidades.....	48
1.7.2	Origen y Cultivo.....	48
1.7.3	Descripción Botánica.....	49
1.7.3.1	Morfología.....	49
1.7.3.2	Taxonomía.....	50

1.7.4	Composición Química.....	50
1.7.4.1	Compuestos Volátiles.....	51
1.7.4.2	Compuestos No Volátiles.....	52
1.7.5	Usos y Aplicaciones.....	52
1.7.5.1	Propiedades Medicinales.....	52
<b>2</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>54</b>
2.1	Lugar de la Investigación.....	54
2.2	Muestras, Materiales, Equipos y Reactivos.....	54
2.2.1	Muestras.....	54
2.2.2	Materiales.....	55
2.2.3	Equipos.....	55
2.2.4	Reactivos.....	56
2.3	Técnicas y Métodos.....	57
2.3.1	Determinación de los Parámetros de Calidad de la Miel de Abeja ( <i>Apis mellifera</i> ).....	57
2.3.1.1	Determinación de las Características Organolépticas (Sensoriales)..	57
2.3.1.2	Determinación de la Densidad Relativa a 27 °C.....	57
2.3.1.3	Determinación de la Humedad.....	57
2.3.1.4	Determinación de Azúcares Reductores Totales.....	57
2.3.1.5	Determinación de Sacarosa.....	58
2.3.1.6	Determinación de la Relación Glucosa-Fructosa.....	58
2.3.1.7	Determinación de la Acidez Total.....	58
2.3.1.8	Determinación del Contenido de Sólidos Insolubles.....	58
2.3.1.9	Determinación de Cenizas.....	58
2.3.1.10	Determinación del Contenido de Hidroximetilfurfural (HMF).....	58
2.3.2	Determinación de los Parámetros de Calidad del Propóleo.....	59
2.3.2.1	Características Organolépticas (Sensoriales).....	59
2.3.2.2	Contenido de Cera.....	59
2.3.2.3	Porcentaje de Impurezas Mecánicas.....	59
2.3.2.4	Compuestos Fenólicos.....	59
2.3.2.5	Índice de Oxidación.....	59
2.3.2.6	Reacción cualitativa de Compuestos Fenólicos.....	59
2.3.2.7	Índice de Yodo.....	59
2.3.3	Determinación del Valor Nutracéutico de la Miel Propolizada.....	59
2.3.3.1	Determinación de las Características Organolépticas (Sensoriales)..	59

2.3.3.2	Determinación de Humedad.....	59
2.3.3.3	Determinación de Azúcares Totales.....	59
2.3.3.4	Determinación de la Proteína.....	60
2.3.3.5	Determinación de Cenizas.....	60
2.3.3.6	Determinación del Extracto Libre no Nitrogenado.....	60
2.3.3.7	Cálculo del Valor Calórico.....	60
2.3.3.8	Determinación de la Vitamina C.....	60
2.3.4	Control de Calidad del Propóleo y el Jengibre como drogas secas...	62
2.3.4.1	Determinación de la Humedad.....	62
2.3.4.2	Determinación de Cenizas Totales.....	62
2.3.4.3	Determinación de Cenizas Solubles en Agua.....	62
2.3.4.4	Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.....	62
2.3.5	Elaboración de los Extractos Etanólicos.....	62
2.3.6	Control de Calidad de los Extractos Etanólicos.....	62
2.3.6.1	Determinación de los Requisitos Organolépticos de los Extractos Etanólicos.....	62
2.3.6.2	Determinación del pH.....	63
2.3.6.3	Determinación del Índice de Refracción.....	63
2.3.6.4	Determinación de la Densidad Relativa.....	63
2.3.6.5	Determinación de los Sólidos Totales.....	63
2.3.6.6	Tamizaje Fitoquímico.....	63
2.3.7	Evaluación de la Actividad Antioxidante Total (AAT).....	65
2.3.7.1	Análisis Cromatográfico del marcador químico Flavonoides Totales expresados como porcentaje de Quercetina. ....	65
2.3.7.2	Cuantificación de Flavonoides Totales (Método del AlCl <sub>3</sub> ).....	67
2.3.7.3	Cuantificación de Compuestos Fenólicos (Micrométodo de Folin-Ciocalteu).....	68
2.3.7.3	Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el Método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidasas.....	70
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
3.1	Determinación de los parámetros de calidad de la miel de abeja ( <i>Apis mellifera</i> ).....	75
3.1.1	Características organolépticas (Norma Mexicana NMX – F– 036)...	75
3.1.2	Especificaciones físico – químicas (Norma NTE INEN 1 572).....	76
3.2	Determinación de los parámetros de calidad del propóleo.....	79

3.2.1	Características organolépticas (Norma Rusa RTS – RSFSR – 317 – 77).....	79
3.2.2	Especificaciones físico – químicas (Norma Rusa RTS – RSFSR – 317 – 77).....	80
3.3.	Determinación del valor nutracéutico de la miel propolizada.....	83
3.3.1	Características Organolépticas.....	83
3.3.2	Características físico – químicas.....	83
3.4	Control de calidad del propóleo y el jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> ) como drogas secas.....	87
3.4.1	Determinación de Humedad.....	87
3.4.2	Determinación de Cenizas.....	88
3.5	Control de calidad de los Extractos Etanólicos.....	89
3.5.1	Determinación de los requisitos organolépticos.....	89
3.5.2	Determinación de los parámetros físicos.....	90
3.5.3	Tamizaje Fitoquímico.....	91
3.6	Evaluación de la Actividad Antioxidante Total (AAT).....	92
3.6.1	Análisis cromatográfico del marcador químico flavonoides totales expresado como presencia de Quercetina.....	92
3.6.2	Cuantificación de Flavonoides totales (Método del AlCl <sub>3</sub> ).....	94
3.6.3	Cuantificación de compuestos fenólicos (micrométodo de Folin–Ciocalteu).....	97
3.6.4	Ensayo de la capacidad antioxidante según el método enzimático de inhibición de la Polifenoloxidasa.....	99
3.6.4.1	Determinación de la actividad enzimática de la Polifenoloxidasa (PPO).....	99
3.6.4.2	Actividad Antioxidante Total.....	101
3.6.5	Análisis Estadístico.....	105
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>5</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>°F</b>	Grados Farenjay
<b>µeq</b>	Microequivalente
<b>µL</b>	Microlitro
<b>AAPH</b>	2,2'-azobis (2-Amidinopropano) Dihidrocloruro
<b>AAT</b>	Actividad Antioxidante Total
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AG</b>	Ácido Gálico
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BHA</b>	Butil Hidroxi Anisol
<b>BHT</b>	Butil Hidroxi Tolueno
<b>CA</b>	Corriente Anódica
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CF</b>	Compuestos Fenólicos
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DAR</b>	Deshidroascorbato Reductasa
<b>EDE</b>	Energía de Disociación de Enlace
<b>EGA</b>	Equivalentes de Ácido Gálico
<b>ESCOF</b>	European Scientific Cooperative On Phytotherapy
<b>FDA</b>	Administración de Drogas y Alimentos
<b>g</b>	Gramo
<b>GPx</b>	Glutación Peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación Reductasa
<b>GSH</b>	Tripéptido Glutación
<b>GST</b>	Glutación Sulfhidril Transferasa
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de alta Eficiencia
<b>IDPc</b>	Deshidrogenasa Citosólica
<b>IFIC</b>	Consejo Internacional de Información sobre Alimentos
<b>IM</b>	Impurezas Mecánicas
<b>IMFs</b>	Alimentos de Humedad Intermedia
<b>INEN</b>	Instituto Ecuatoriano de Normalización
<b>IO</b>	Índice de Oxidación
<b>IY</b>	Índice de Yodo
<b>Kcal</b>	Kilo Calorías
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>Km</b>	Kilómetros

<b>L</b>	Litro
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de Baja Densidad
<b>m</b>	Metro
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min.</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mol</b>	Moles
<b>ms</b>	Milisiemens
<b>N</b>	Normalidad
<b>NAD</b>	Nicotina Amino Dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotina Amino Dinucleótido Fosfato Reducido
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NTE</b>	Norma Técnica Ecuatoriana
<b>PATAR</b>	Parámetro Antioxidante Total de Atrapamiento de Radicales
<b>PET</b>	Tetracloruro de Polietileno
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PVC</b>	Cloruro de Polivinilo
<b>RL</b>	Radicales Libres
<b>s</b>	Segundo
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>TEAC</b>	Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox
<b>TR</b>	Tiorreductasa
<b>URSS</b>	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas
<b>USA</b>	Estados Unidos de América
<b>v</b>	Voltio

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Clasificación de los antioxidantes según su origen.....	14
TABLA No. 2	Composición química de la Miel de abeja.....	35
TABLA No. 3	Composición básica de los Propóleos.....	45
TABLA No. 4	Composición química del Jengibre.....	51
TABLA No. 5	Muestras de material alimenticio usado en la investigación.....	54
TABLA No. 6	Técnicas para el Tamizaje Fitoquímico.....	64
TABLA No. 7	Esquema de reactivos para la cuantificación de flavonoides totales por el método del $AlCl_3$ .....	67
TABLA No. 8	Ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración del estándar de Rutina para la determinación del contenido de Flavonoides Totales.....	68
TABLA No. 9	Esquema de reactivos para la cuantificación de compuestos fenólicos por el micrométodo de Folin-Ciocalteau.....	69
TABLA No. 10	Ecuaciones de la recta obtenidas para las curvas de calibración del estándar de Ácido Gálico para la determinación del contenido de Compuestos Fenólicos Totales.....	70
TABLA No. 11	Esquema para la elaboración del búffer Acetato de Sodio/Ácido Acético a pH 5.....	71
TABLA No. 12	Esquema para el Ensayo de la Capacidad Antioxidante.....	73

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Características organolépticas determinadas para la miel de abeja ( <i>Apis mellifera</i> ) en base a la norma mexicana NMX-F-036. Laboratorio de bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Mayo del 2013.....	75
CUADRO No. 2	Especificaciones físico – químicas determinadas en la miel de abeja ( <i>Apis mellifera</i> ) en base a la norma NTE INEN 1 572. Laboratorio de bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013.....	76
CUADRO No. 3	Características organolépticas determinadas para el propóleo bruto en base a la norma rusa RTS-RSFSR-317-77. Laboratorio de bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013.....	79
CUADRO No. 4	Especificaciones físico – químicas determinadas en el propóleo en base a la norma rusa RTS-RSFSR-317-77. Laboratorio de bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013...	80
CUADRO No. 5	Características organolépticas determinadas para la miel propolizada. Laboratorio de bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013.....	83
CUADRO No. 6	Características físico – químicas determinadas para la miel propolizada contra la miel. Laboratorio de bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013.....	84
CUADRO No. 7	Resultados de la determinación de humedad del propóleo y el jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> ) como drogas secas. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Agosto del 2013.....	87
CUADRO No. 8	Resultados de la determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en HCl del propóleo y el gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> ) como drogas secas. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Agosto del 2013....	88
CUADRO No. 9	Resultados de la determinación de los requisitos organolépticos de los extractos etanólicos. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Agosto del 2013.....	89
CUADRO No. 10	Resultados de la determinación de los parámetros físicos de los extractos etanólicos. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Agosto del 2013.....	90
CUADRO No. 11	Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	91
CUADRO No. 12	Resultado de la determinación de los Rf de las manchas obtenidas para cada muestra en cromatografía de capa fina (TLC). Laboratorio de productos naturales. Facultad de	

	ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	93
CUADRO No. 13	Placa cromatográfica comparativa entre los extractos etanólicos de propóleo, miel, jengibre y miel propolizada con estándar de quercetina. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	94
CUADRO No. 14	Resultados de la concentración de flavonoides totales expresados en mg de Rutina/100 g de muestra determinados en los extractos etanólicos de miel, propóleo, jengibre y miel propolizada. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	95
CUADRO No. 15	Resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales expresados en mg de ácido gálico/100 g de muestra determinados en los extractos etanólicos de miel, propóleo, jengibre y miel propolizada. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. ESPOCH. Julio del 2013.....	97
CUADRO No. 16	Actividad enzimática (Abs/minuto) de la Polifenoloxidas (PPO) medida para diferentes tiempos de congelación a -6 °C. Laboratorio de bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Octubre del 2013.....	99
CUADRO No. 17	Resultados de la determinación de la actividad antioxidante total (AAT) expresada como porcentaje de inhibición de la Polifenoloxidas (PPO) encontrados para las muestras de propóleo, miel, jengibre y miel propolizada en concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm. Laboratorio de bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Octubre del 2013.....	101
CUADRO No. 18	Resultado la comparación múltiple de los extractos vs la vitamina C a concentración de 10 ppm aplicando la prueba de Tukey. Programa estadístico SPSS 19.....	106
CUADRO No. 19	Resultado la comparación múltiple de los extractos vs la vitamina C a concentración de 100 ppm aplicando la prueba de Tukey. Programa estadístico SPSS 19.....	107
CUADRO No. 20	Resultado la comparación múltiple de los extractos vs la vitamina c a concentración de 1 000 ppm aplicando la prueba de Tukey. Programa estadístico SPSS 19.....	108
CUADRO No. 21	Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales usando catequina como patrón en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	132
CUADRO No. 22	Curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos totales usando ácido gálico como patrón en concentraciones de 20, 60, 100 y 140 ppm. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Julio del 2013.....	133

CUADRO No. 23	Curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos totales usando ácido gálico como patrón en concentraciones de 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 y 2 000 ppm. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Julio del 2013.....	133
CUADRO No. 24	Test Student del porcentaje de humedad.....	134
CUADRO No. 25	Test Student del porcentaje de azúcares totales.....	135
CUADRO No. 26	Test Student del porcentaje de cenizas.....	135
CUADRO No. 27	Test Student del porcentaje de proteína.....	136
CUADRO No. 28	Test Student del porcentaje de vitamina C.....	136
CUADRO No. 29	Test Student del valor calórico.....	137
CUADRO No. 30	ANOVA, test de Tukey y test de Mann-Whitney a nivel de significancia de 0,05 y confianza del 95,00 % para la concentración de flavonoides.....	137
CUADRO No. 31	ANOVA, test de Tukey y test de Mann-Whitney a nivel de significancia de 0,05 y confianza del 95,00 % para la concentración de compuestos fenólicos.....	139
CUADRO No. 32	ANOVA, test de Tukey y test de Mann-Whitney a nivel de significancia del 0,05 y confianza del 95,00 % para el porcentaje de inhibición de los extractos a concentración de 10 ppm.....	140
CUADRO No. 33	ANOVA, test de Tukey y test de Mann-Whitney a nivel de significancia del 0,05 y confianza del 95,00 % para el porcentaje de inhibición de los extractos a concentración de 100 ppm.....	141
CUADRO No. 34	ANOVA, test de Tukey y test de Mann-Whitney a nivel de significancia del 0,05 y confianza del 95,00 % para el porcentaje de inhibición de los extractos a concentración de 1000 ppm.....	142
CUADRO No. 35	Resultados de la determinación del porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas.....	152

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Comparación entre el porcentaje de humedad y de azúcares reductores totales presentes en la miel y en la miel propolizada. Laboratorio de Bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013.....	84
GRÁFICO No. 2	Comparación entre el porcentaje de cenizas, proteína y vitamina c presentes en la miel y la miel propolizada. Laboratorio de Bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Junio del 2013.....	85
GRÁFICO No. 3	Comparación entre la energía expresada en KJ aportada por la miel y la miel propolizada, en relación al contenido de azúcares totales contenidos en cada muestra. Laboratorio de Bromatología. Facultad de ciencias. ESPOCH. Junio del 2013..	86
GRÁFICO No. 4	Concentración de flavonoides totales extraídos en los extractos etanólicos expresados en g de catequina por 100 g de muestra. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	95
GRAFICO No. 5	Concentración de compuestos fenólicos totales extraídos en los extractos etanólicos expresados en g de ácido gálico por g de muestra. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Julio del 2013.....	98
GRAFICO No. 6	Curvas de la actividad enzimática de la Polifenoloxidasa (PPO) medidas después de diferentes tiempos de congelación a -6 °C. Laboratorio de Bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Octubre del 2013.....	100
GRAFICO No. 7	Actividad antioxidante expresada por % de inhibición de la Polifenoloxidasa de los extractos etanólicos de propóleo, miel, jengibre y miel propolizada en concentraciones de 10 ppm. Laboratorio de Bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Octubre del 2013.....	102
GRAFICO No. 8	Actividad antioxidante expresada por % de inhibición de la Polifenoloxidasa de los extractos etanólicos de propóleo, miel, jengibre y miel propolizada en concentraciones de 100 ppm. Laboratorio de Bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Octubre del 2013.....	102
GRAFICO No. 9	Actividad antioxidante expresada por % de inhibición de la Polifenoloxidasa de los extractos etanólicos de propóleo, miel, jengibre y miel propolizada en concentraciones de 1000 ppm. Laboratorio de Bromatología y nutrición animal. Facultad de ciencias pecuarias. ESPOCH. Octubre del 2013.....	103
GRAFICO No. 10	Relación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales en las muestras de propóleo, miel, jengibre y miel propolizada.....	105

GRAFICO No. 11	Diagrama de cajas de las medias del porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos en concentraciones de 10, 100 y 1 00 ppm. Programa estadístico Minitab 16.....	109
GRÁFICO No. 12	Diagrama de las interacciones entre las medias del porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos para concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm. Programa estadístico G-STAT.....	109
GRÁFICO No. 13	Curva de absorbancia vs concentración de rutina en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, para la cuantificación de flavonoides totales. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Septiembre del 2013.....	132
GRÁFICO No. 14	Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico en concentraciones de 20, 60, 100 y 140 ppm, para la cuantificación de compuestos fenólicos totales. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Julio del 2013.....	133
GRÁFICO No. 15	Curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico en concentraciones de 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 y 2 000 ppm para la cuantificación de compuestos fenólicos totales. Laboratorio de química instrumental. Facultad de ciencias. ESPOCH. Julio del 2013.....	134

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes.....	7
FIGURA No. 2	La nueva rueda de los Alimentos Antioxidantes.....	13
FIGURA No. 3	Mecanismo propuesto para la estabilización de radicales libres por la vitamina C (ácido ascórbico).....	16
FIGURA No. 4	Antioxidante neutralizando un radical libre.....	18
FIGURA No. 5	Estructura del Fenol.....	21
FIGURA No. 6	Estructura y Mecanismo de acción antioxidante de los Flavonoides.....	22
FIGURA No. 7	Estructura de los Taninos.....	22
FIGURA No. 8	Mecanismos preventivos de los Polifenoles.....	23
FIGURA No. 9	Jeroglífico que representa las técnicas de apicultura en el antiguo Egipto.....	25
FIGURA No. 10	Características morfológicas del jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> Roscoe).....	49
FIGURA No. 11	Estructuras químicas de los principales componentes volátiles del Jengibre.....	51
FIGURA No. 12	Estructuras químicas de los principales compuestos no volátiles del Jengibre (Gingerol y Shogaol).....	52
FIGURA No. 13	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico...	63
FIGURA No. 14	Reacción de quelación del ión $Al^{3+}$ con los flavonoides.....	67
FIGURA No. 15	Reacción de Folin-Ciocalteu.....	69
FIGURA No. 16	Reacción de la Polifenoloxidasa (PPO).....	70
FIGURA No. 17	Distancias de las manchas obtenidas en la cromatografía de capa fina (TLC) donde Q: quercetina, P: propóleo, M: miel, j: jengibre, MP: miel propolizada.....	93

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Propóleo en estado bruto.....	39
FOTOGRAFÍA No. 2	Abeja recolectando resinas de algunas plantas y transportándola a la colmena para obtener el propóleo.....	42
FOTOGRAFÍA No. 3	Rizomas de jengibre de la variedad hawaiana.....	50
FOTOGRAFÍA No. 4	Materias primas usadas para la elaboración de la miel propolizada.....	144
FOTOGRAFÍA No. 5	Pruebas físico – químicas para determinar la calidad de la miel.....	145
FOTOGRAFÍA No. 6	Pruebas físico – químicas para determinar la calidad del propóleo.....	146
FOTOGRAFÍA No. 7	Parámetros físicos de los extractos etanólicos.....	147
FOTOGRAFÍA No. 8	Ensayos realizados para la identificación de Metabolitos secundarios en los extracto etanólicos.....	148
FOTOGRAFÍA No. 9	Método de Folin-Ciocalteau y $AlCl_3$ .....	149
FOTOGRAFÍA No. 10	Preparación del Extracto enzimático de la PPO.....	150
FOTOGRAFÍA No. 11	Método de Inhibición de la Polifenoloxidasas.....	151

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Cromatograma del Estándar de Vitamina C.....	131
ANEXO No. 2	Cromatograma de Vitamina C en la miel de abeja.....	131
ANEXO No. 3	Cromatograma de Vitamina C en la miel propolizada.....	132
ANEXO No. 4	Elaboración de la curva de calibración de catequina como patrón para la cuantificación de flavonoides totales.....	132
ANEXO No. 5	Elaboración de las curvas de calibración de ácido gálico como patrón para la cuantificación de compuestos fenólicos.....	133
ANEXO No. 6	Análisis estadístico de los parámetros bromatológicos comparativos entre la miel y miel propolizada. Programa estadístico G-STAT 2.1. Software libre.....	134
ANEXO No. 7	Análisis estadístico de la concentración de flavonoides y compuestos fenólicos. Programa estadístico SPSS 19. Software libre.....	137
ANEXO No. 8	Análisis estadístico para el porcentaje de inhibición de los extractos a concentraciones de 10, 100 y 1 000 ppm. Programa estadístico SPSS 19. Software libre.....	140
ANEXO No. 9	Recolección de las Materias primas.....	144
ANEXO No. 10	Control de calidad de la Miel de abeja.....	145
ANEXO No. 11	Control de calidad del Propóleo.....	146
ANEXO No. 12	Control de calidad de los Extractos etanólicos.....	147
ANEXO No. 13	Tamizaje Fitoquímico de los Extractos etanólicos.....	148
ANEXO No. 14	Cuantificación de Compuestos Fenólicos y Flavonoides Totales..	149
ANEXO No. 15	Preparación de la enzima PPO.....	150
ANEXO No. 16	Determinación de la Actividad Antioxidante.....	151
ANEXO No. 17	Resultados de la determinación de la actividad antioxidante.....	152

## INTRODUCCIÓN

El mundo actual está lleno de nuevos retos en lo que concierne al mantenimiento de la salud del hombre, es así que los productos naturales como alimentos y como suplementos en la dieta han ganado considerable atención durante los últimos años ya sea en forma individual o en combinaciones ya que su posible efecto terapéutico se ve potenciado por la interacción entre varios de sus componentes activos, de allí el surgimiento de los productos apícolas como una posible fuente de nutrientes y según Kroyer y Hegedus, (2001) se han utilizan desde tiempos ancestrales en medicina, alimentación y suplementación dietaria debido a sus valiosas propiedades fisiológicas y nutricionales.

La miel posee un lugar de privilegio en el mundo de los alimentos ya que es un alimento natural con importantes propiedades nutricionales y terapéuticas, características sensoriales atractivas, que no puede contener ningún tipo de aditivo; y que constituye el principal producto de una comunidad con una organización y predisposición al trabajo sorprendentes. Además de la miel, que ha sido recolectada y apreciada durante miles de años, las abejas producen otros invalorable alimentos y fitofármacos con importantes propiedades tales como el polen, la jalea real, el propóleo, la cera y la apitoxina, cuyas propiedades curativas son conocidas desde tiempos remotos y de los cuales el propóleo es una muestra de ello y de gran eficacia en cuanto a principios activos transmitidos de las plantas al hombre, por lo que la acción y los campos de empleo terapéutico de esta sustancia resultan muy amplios por sus propiedades cicatrizantes, antimicrobianas, anestésicas y antiinflamatorias que están directamente relacionadas con su poder antioxidante y secuestrante de radicales libres (Paulino y col., 2003; Uzel y col., 2005; Hernández y col., 2007).

Estos radicales libres identificados como responsables de sinnúmeros de enfermedades como cáncer, mal de Parkinson, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades de tipo crónico, y procesos como el envejecimiento celular originados por

la oxidación celular (Venereo, J., 2002), han incrementado el estudio de antioxidantes naturales presentes en varios alimentos entre ellos la miel, propóleo y jengibre con potenciales aplicaciones en la mejora de la calidad y seguridad de alimentos así como también en la prevención de numerosas enfermedades.

De estos productos destacaremos para nuestro estudio la miel, el propóleo y el jengibre, los cuales han demostrado, en base a varias investigaciones, reportar una elevada actividad antioxidante por el gran porcentaje de compuestos fenólicos que presentan dentro de su composición, los mismos que varían de acuerdo a la zona geográfica y a las plantas con las que interaccionan y de las que se benefician las abejas, por lo tanto su combinación en la elaboración de la miel propolizada la actividad antioxidante se incrementa pudiendo producir mayores beneficios para la salud de quien la consuma.

La importancia de esta investigación radicó en la constancia científica que brindaría sobre los beneficios que se les atribuyen a los derivados apícolas en combinación entre ellos y con otros productos naturales, para lo cual se planteó el objetivo de determinar el valor nutracéutico y la actividad antioxidante que presentan los productos elaborados a base de miel, propóleo y jengibre, mediante el control de la calidad de las mismas, cuantificación de componentes activos: Compuestos fenólicos y Flavonoides y la determinación de la Actividad Antioxidante por la prueba de Inhibición de la Polifenoloxidasa, con el fin de contribuir a su validación científica para su comercialización a la vez que se ayudará a la empresa APICARE CIA. LTDA. a la obtención de certificados de calidad, promoviendo en la sociedad el consumo de una dieta variada y sana; y al mejoramiento de la calidad de vida del consumidor en cuanto a su salud física y emocional, en concordancia con el concepto del Sumak Kawsay.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 LOS NUTRACÉUTICOS

Con el término nutracéutico se conoce a algunos alimentos o los componentes nutricios de estos, que proveen beneficios para la salud de los seres humanos o para la prevención o tratamiento de los enfermos afectados por determinados padecimientos o malestares. Generalmente son productos elaborados a partir de alimentos, para ser comercializados en forma de píldoras o polvos y otras presentaciones, y que no requieren para su comercialización haber demostrado sus bondades ante las correspondientes instancias sanitarias. (69)

Los nutracéuticos no son nutrientes asociados con deficiencias en la dieta, sin embargo, son compuestos cuyo consumo ha sido asociado con la prevención y el tratamiento de enfermedades. En algunos casos la evidencia científica sobre los beneficios en la salud humana es tan sólida y reconocida por la comunidad científica internacional que los compuestos han sido avalados por agencias regulatorias gubernamentales como la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), quiere decir que tiene que haber estudios que prueben de su acción preventiva contra las enfermedades. (72)

##### 1.1.1 DEFINICIÓN

En el año 1989 surgió el término Nutracéutico por el Dr. Stephen de Felice, Director de la Fundación de Medicina Innovativa. Planteó que “Sería cualquier sustancia que pueda ser considerada como alimento o como parte de éste y que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad”. (72)

De acuerdo con Zeisel un compuesto nutraceutico se puede definir como “Un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia natural bioactiva concentrada presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente, tiene un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal. Por tanto, se diferencian de los medicamentos en que éstos últimos no tienen un origen biológico natural. Y se diferencian de los extractos e infusiones de hierbas y similares en la concentración de sus componentes y en que éstos últimos no tienen por qué tener una acción terapéutica”. (69)

Según la IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) “Son aquellos que, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un beneficio para la salud”. Así sucede con los tomates, cuyo contenido en licopeno reduce el riesgo del cáncer de próstata, con muchos pescados, cuyo contenido en ácidos omega-3 reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, o con las frutas y verduras, cuyos flavonoides neutralizan los radicales libres oxidantes.(69)

Sin embargo, la definición más aceptada en la actualidad es la de que “Los nutraceuticos son alimentos o compuestos (sustancias) en alimentos y/o bebidas, que han sido asociados con la prevención o disminución de enfermedades”. El licopeno en tomates y pimientos, el sulforafano en brócoli y el resveratrol en vinos tintos de la variedad Pinot Noir, son algunos ejemplos. (72)

### 1.1.2 CARACTERÍSTICAS

En esencia, los nutraceuticos son micronutrientes que mejoran productos ya existentes y que permiten diversificar el mercado. Abarcan una amplia gama de productos que deben cumplir los siguientes criterios:

1. Productos de origen natural.
2. Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes.

3. Aportar efectos beneficiosos para la salud: Mejora de una o más funciones fisiológicas, mejora de la calidad de vida y acción preventiva y/o curativa.
4. Aportar estabilidad temporal.
5. Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas en animales de experimentación y en humanos. (49) (69)

### 1.1.3 VENTAJAS DE LOS ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

1. Los nutraceuticos tienen la cualidad de producir sinergia, lo cual es extraordinariamente benéfico, pues implica un aumento de la acción de diversas sustancias cuando actúan conjuntamente.
2. Toma de los elementos su efecto curativo y sus cualidades terapéuticas en estrecha relación con la genética.
3. Ofrecen productos nutritivos, ricos en vitaminas y minerales que tienen una función preventiva y aun curativa por su contenido de extractos naturales y farmacéuticos. (69) (72)

### 1.1.4 PAPEL TERAPÉUTICO DE LOS NUTRACÉUTICOS Y SUS EFECTOS EN LA SALUD HUMANA

Constituyen alimentos con grandes propiedades terapéuticas para el tratamiento de muchas enfermedades y en estados de carencia de alguna vitamina o componente del organismo. A estos alimentos de nivel terapéutico también se les conoce como alimentos funcionales. A partir de la importancia de los nutraceuticos, se ha fijado en el mercado tres niveles de funcionalidad de los mismos:

1. Funcionalidad Primaria.
2. Funcionalidad Secundaria.
3. Funcionalidad Terciaria.

**1. Funcionalidad Primaria:** Ayuda a mantener la vitalidad corporal a corto y largo plazo. (49)

**2. Funcionalidad Secundaria:** El sabor y el aroma son funcionales en tanto otorgan satisfacción sensorial. (49)

**3. Funcionalidad Terciaria:** La fortificación y la modulación del sistema fisiológico son elementos funcionales para la vitalidad de nuestro cuerpo. (49)

#### 1.1.5 CLASIFICACIÓN

##### **1. Compuestos Nutritivos**

Son sustancias que pueden ser utilizadas por el organismo en su metabolismo y que desempeñan funciones bien establecidas. En esta categoría que representa la fracción mayoritaria del alimento en sustancias seca (90%), se incluyen proteínas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas. (72)

##### **2. Compuestos Químicos**

Son compuestos naturales presentes en los alimentos, es el caso de los polifenoles (poderosos antioxidantes) que generan beneficios importantes a la salud; están presentes en productos como el té verde, el vino tinto y el chocolate. Estas Sustancias se encuentran en verduras y frutas, que pueden ser ingeridas diariamente con la dieta en cantidades de gramos y muestran un potencial capaz de modular el metabolismo humano. (72)

##### **3. Probióticos**

Productos que contienen microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades suficientes ejercen un efecto positivo en la salud más allá de los efectos nutricionales. (72)

## 1.2 RADICALES LIBRES

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. (21)

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. (21)

En síntesis los radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen. (60)

### 1.2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Las Especies Reactivas de Oxígeno son radicales libres, especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas, lo que les confiere una alta e indiscriminada reactividad. Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

Radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ); Hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ); Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); Anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ); Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ); Oxígeno nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ); Peróxido ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ); Semiquinona (Q); Ozono. (21)

En 1954 la Doctora Rebeca Gerschman sugirió por primera vez que las ERO eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos:

1. Los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes.
2. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos.
3. La producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis (21)

### 1.2.2 FUENTES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

#### 1. Fuentes Endógenas

- a. La cadena respiratoria, la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos. Sin embargo, el 95 % del oxígeno que respiramos es reducido a H<sub>2</sub>O por acción de la citocromo oxidasa-a-3, último eslabón de la cadena de transporte electrónico, mediante un mecanismo en el que participan cuatro centros rédox proporcionando, además, la principal fuente de energía (ATP) al organismo. También a nivel del complejo I y del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol (Q<sub>10</sub>) actuando como aceptor de electrones se puede formar el O<sub>2</sub><sup>-</sup>.
- b. Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Por otra parte dichas células también generan óxido nítrico (NO), por acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular, como mecanismo de defensa. La combinación del O<sub>2</sub><sup>-</sup> con el NO da lugar a la formación del ONOO<sup>-</sup> capaz de inducir la peroxidación lipídica en las lipoproteínas.
- c. La autooxidación de compuestos de carbono reducido como son aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estos compuestos.

d. La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, son fuentes representativas de esta producción. (21) (60)

En la FIGURA No. 1 se resumen las principales fuentes de formación de radicales libres.

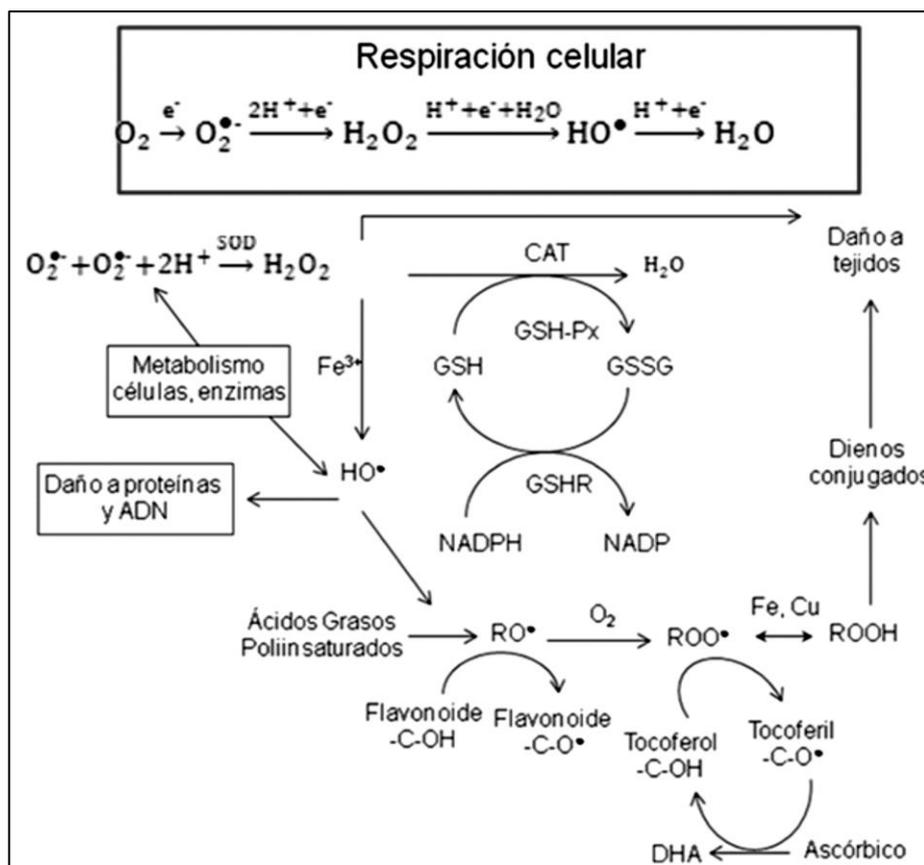


FIGURA No. 1. VÍAS DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES Y LOS PRINCIPALES SISTEMAS ANTIOXIDANTES.

## 2. Fuentes Exógenas

Las fuentes exógenas de Especies Reactivas de Oxígeno pueden ser:

1. Ambientales: Tabaco, radiación electromagnética, luz solar, ozono, etc.
2. Farmacológicas: Xenobióticos, drogas, etc.
3. Nutricionales: Contaminantes, aditivos, etc. (21) (60)

### 1.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES

#### **1. Radicales libres inorgánicos o Primarios**

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico. (60)

#### **2. Radicales libres orgánicos o Secundarios**

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. (21)

#### **3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno**

Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, el hidroperóxidos orgánicos. (21)

### 1.2.4 EFECTO NOCIVO DE LOS RADICALES LIBRES (RL)

#### **1. Lípidos**

Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes

esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno. (18) (21)

## **2. Proteínas**

Las ERO pueden inducir en el extremo la fragmentación de proteínas, pero además existen una serie de alteraciones que pueden modificar notablemente su función, modificando con ello el metabolismo, la estructura, el transporte, los receptores, las proteínas reguladoras y los inmunorreguladores, entre otros. Los radicales libres de oxígeno, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. (21)

Debido a la reactividad de las ERO con las moléculas insaturadas o residuos de proteínas que contienen azufre, además de aminoácidos tales como, triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina sufren oxidaciones que provocan entrecruzamientos y fenómenos de agregación. (18)

## **3. Ácido desoxirribonucleico (ADN)**

Los radicales libres pueden causar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas, daño a la estructura de la desoxirribosa-fosfato, oxidación de las bases nitrogenadas, conversión de bases (la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina), aperturas de anillos, liberación de bases, rompimiento de cadenas (una o dos hebras). El OH puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas; el O<sub>2</sub> es más selectivo y generalmente produce sólo aductos de guanina, sobre todo 8-hidroxiguanina. Debido al mayor ambiente oxidativo de la mitocondria, el ADN mitocondrial generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear. (18) (60)

Los radicales libres y en general las agresiones oxidativas modifican las bases nitrogenadas, lo que induce mutaciones y carcinogénesis, ya sea por la pérdida de

expresión o por la síntesis de una proteína alterada. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN. (21)

#### **4. Colesterol**

Producen hidroperóxidos de colesterol y oxisteroles que están implicados en la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. (18)

#### **5. Glúcidos**

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose en unidades más sencillas como en el caso de la despolimerización del ácido hialurónico. (18) (60)

#### **1.2.5 ESTRÉS OXIDATIVO**

Los radicales libres oxidan muchas estructuras biológicas, dañándolas. Es lo que llamamos el daño oxidativo, importante causa del envejecimiento, el cáncer, la aterosclerosis, los procesos inflamatorios crónicos y las cataratas, que son las más características. (21)

En determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres. Las células disponen de mecanismos de protección del

efecto nocivo de los radicales libres basado en un complejo mecanismo de defensa constituido por los agentes antioxidantes.

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos. (21) (60)

#### 1.2.6 ENFERMEDADES OCASIONADAS POR LOS RADICALES LIBRES (RL)

##### **1. Envejecimiento celular**

El envejecimiento se puede definir, de forma general, como una pérdida progresiva de la eficiencia de los procesos fisiológicos y bioquímicos después de la fase reproductiva de la vida. Se han elaborado muchas teorías para explicar el fenómeno del envejecimiento y, entre todas las propuestas, la “Teoría de los radicales libres del envejecimiento” ha obtenido una aprobación universal.

Dicha teoría se apoya en el hecho de que la producción de radicales libres y los daños provocados por ellos aumentan con la edad. La teoría postula que los radicales libres del organismo causan daños oxidativos en los componentes celulares, un proceso que provoca la alteración de las funciones celulares, compromete los tejidos y las funciones de los órganos y, finalmente, puede provocar la muerte. (18) (60)

La “Teoría de los radicales libres” es corroborada por la hipótesis de la “Tasa de supervivencia”, que establece una correlación inversa entre la tasa metabólica y la longevidad de los organismos. (18)

## **2. Trastornos neurodegenerativos**

Los problemas degenerativos afectan al sistema nervioso central y se caracterizan por la pérdida de capacidades neuronales específicas o muchas veces intraneuronales, así como por la acumulación extracelular de materia hialina. La enfermedad cerebral degenerativa primaria y los problemas relacionados con los trastornos cerebrovasculares representan la causa principal de discapacidad y pérdida de autonomía entre las personas de la tercera edad.

Hay cada día más evidencias de que los radicales libres están involucrados en el inicio de la lesión celular observada en los trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington. (18) (21)

## **3. Cáncer**

La carcinogénesis es un proceso en el que las células sanas se transforman en células anormales como resultado de una serie de mutaciones y cambios en los patrones de expresión genética. Se sabe que los radicales libres reaccionan con todos los componentes del ADN, causando mutaciones en los genes. La modificación permanente del material genético causada por los radicales libres representa el primer paso de la mutagénesis, la carcinogénesis y el envejecimiento. (21)

## **4. Diabetes**

Cada día hay más evidencias de que los daños causados por los radicales libres tienen también un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, la disfunción de las células- $\beta$ , la intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus tipo 2. La hiperglucemia puede provocar estrés oxidativo, que aumenta con la edad, mediante

varios mecanismos: la auto-oxidación de la glucosa, la formación de productos de glicación avanzada y la activación de la vía de los polioles. Otros factores que están elevados en los diabéticos, como los ácidos grasos libres y la leptina, también contribuyen al aumento de las EROS. (21)

### 1.3 LOS ANTIOXIDANTES

#### 1.3.1 DEFINICIÓN

El término “antioxidante” se refiere a cualquier molécula capaz de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que puedan atacar las células. (10)

Los antioxidantes son compuestos que por su estructura química frenan la formación de Radicales Libres (RL), previenen o permiten tratar las enfermedades causadas por el estrés oxidativo, o a su vez los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares. (18)

En la FIGURA No. 2 se puede observar la nueva rueda de los alimentos antioxidantes.



FIGURA No. 2. LA NUEVA RUEDA DE LOS ALIMENTOS ANTIOXIDANTES.

Los seres humanos han desarrollado sistemas altamente complejos de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que trabajan sinérgicamente y en combinación con otros para proteger las células y los sistemas de órganos contra los daños causados por los radicales libres. (10)

### 1.3.2 CLASIFICACIÓN

Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta). (28)

En la TABLA No. 1 se establece la clasificación de los antioxidantes en base a su origen.

**TABLA No. 1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SEGÚN SU ORIGEN.**

	<b>ORIGEN</b>	<b>ACCIÓN</b>
<b>1. Exógenos</b>	Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singlete. Captura radicales libres hidroxilo. Captura O <sub>2</sub> <sup>-</sup> . Neutraliza peróxidos.
	Vitamina C	Neutraliza el oxígeno singlete. Captura radicales libres hidroxilo. Captura O <sub>2</sub> <sup>-</sup> . Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
	Beta-carotenos Flavonoides, licopenos	Neutraliza el oxígeno singlete.
<b>2. Endógenos enzimáticos</b>	<b>Cofactor</b>	
	Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, Sodio, Manganeseo.
	Catalasa (CAT)	Hierro.
	Glutación peróxidasa (GPx)	Selenio.
<b>3. Endógenos no enzimáticos</b>	Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
	Coenzima Q	Transportadores de metales
	Ácido tióctico	(transferrina y ceruloplasmina).

FUENTE: Revista Cubana Medicina Militar, 2009.

### **1.3.2.1 Antioxidantes endógenos (Enzimáticos)**

El sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas incluye a enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peróxidasa (GSH-PX), tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa. Algunas enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular. (57)

### **1.3.2.2 Antioxidantes exógenos (No Enzimáticos)**

El sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los cuales intervienen logrando retrasar la producción y acción de los radicales libres, son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación. (57)

## **1. Vitamina C**

Es una vitamina hidrosoluble con un poderoso efecto antioxidante. Sus compañeros antioxidantes son la vitamina E y los carotenoides, así como las enzimas antioxidantes. La vitamina C participa en el sistema de regeneración de la vitamina E, manteniendo el potencial antioxidante del plasma. También aumenta los niveles de glutatión intracelular, desempeñando así un importante papel en la protección de las proteínas contra la oxidación del grupo tiol.

Se ha comprobado experimentalmente que inhibe la formación de nitrosaminas cancerígenas. También algunos estudios sugieren la posibilidad de tratamiento con ácido ascórbico para algunos tipos de cáncer (de vejiga, de pulmón, etc.). La vitamina C actúa como antioxidante y agente reductor. Interviene proporcionando electrones a compuestos tanto en el interior de la célula como en el exterior (FIGURA No. 3). Así, puede actuar fuera de la célula, conjuntamente con la vitamina E, en la prevención de la oxidación lipídica. Es de esta forma que actúa frente la oxidación de las LDL, punto donde se inicia la lesión aterosclerótica. (28) (57)

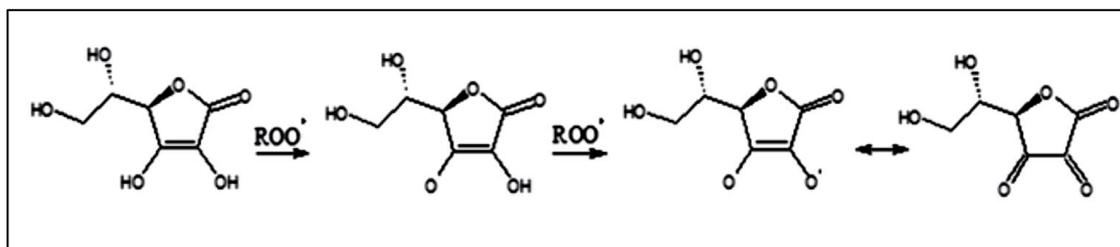


FIGURA No. 3. MECANISMO PROPUESTO PARA LA ESTABILIZACIÓN DE RADICALES LIBRES POR LA VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO).

Los alimentos con una mayor riqueza en esta vitamina son las frutas (cítricos, caquis, kiwis) y las hortalizas (pimientos, perejil, coles, cebolla) frescas y crudas.

Es sabido que la vitamina C se destruye en parte por efecto del calor (cocción) y del almacenamiento prologando. De ahí la gran importancia nutricional que tiene tomar vegetales crudos en las comidas y a diario, ya que, al igual que otras vitaminas hidrosolubles, apenas se acumula en nuestro organismo y éste la precisa continuamente. Es muy sensible a la luz, a la temperatura y al oxígeno del aire. Incluso un zumo de naranja natural pierde su contenido de vitamina C a los 15-20 min de haberlo preparado, y también se pierde en las verduras cuando las cocinamos. (28)

### 1.3.3 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. (30)

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular). La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.) funcionalmente vital o más importante. (21)

Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen. (21) (66)

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas; también son numerosos los compartimientos donde actúan en el organismo y en las células. (66)

### **1.3.3.1 Terapias Antioxidantes**

Los antioxidantes juegan un papel predominante en la prevención de diferentes tipos de cáncer, se ha descrito su posible relación fisiopatológica entre las alteraciones a nivel de lípidos y peroxidación lipídica. Respaldo esta idea, los vegetarianos consumen una dieta rica en antioxidantes que incluye  $\beta$ -caroteno, vitamina E, vitamina C, selenio, retinol, zinc, riboflavina, y molibdeno para reducir el riesgo de desarrollar cáncer; sin embargo, no hay suficiente evidencia que justifique el uso tradicional de vitaminas y minerales para la prevención de cáncer. Otros hallazgos demuestran que los componentes carotenoides no son bioaccesibles debido al consumo de fibra en la dieta diaria, lo que evita la absorción de los antioxidantes. (18) (21)

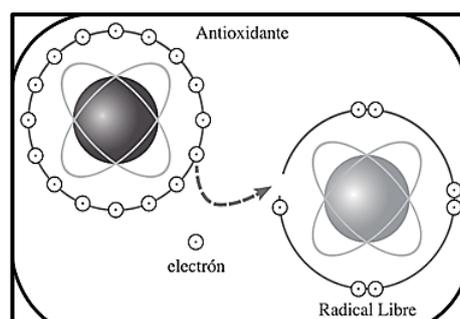
La N-acetil cisteína es una forma modificada del aminoácido cisteína, que se encuentra comúnmente en los alimentos y se sintetiza en el organismo. Respecto a esto, estudios revelan que el consumo de antioxidantes con propiedades antitumorales como la N-acetil-cisteína, en pacientes con cáncer de mama, reducen el riesgo de mortalidad. La metformina, un medicamento que se utiliza desde hace varias décadas en el tratamiento de la diabetes mellitus, es un poderoso antioxidante que reduce la producción de los radicales libres, y está comprobado que disminuye el riesgo de cáncer epitelial. (21) (57)

#### 1.3.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LOS ALIMENTOS

En la práctica, se conoce como actividad antioxidante total (AAT) o capacidad antioxidante total (CAT) a la medición analítica de concentraciones de radicales de diferente naturaleza en un sistema oxidativo controlado (AAPH generador de radicales libres 2,2 azo bis-(2-amidino propano) dihidrocloruro, ABTS<sup>•+</sup> catión radical 2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), DMPD<sup>•</sup> radical N,N-dimetil-p-fenilendiamina, DPPH<sup>•</sup> radical 2,2-difenilo-1-picril-hidrazilo). Sin embargo, no existe el análisis ideal para evaluar el concepto de actividad antioxidante; por ello, se emplean análisis combinados para asistir en la interpretación de los resultados. Inclusive se ha propuesto un índice electroquímico para evaluar la actividad antioxidante. (57)

Cada análisis de AAT se refiere a la actividad de sustancias de bajo peso molecular pero excluye las contribuciones de las enzimas y de las proteínas enlazantes de metales. En general, la AAT disminuye en condiciones asociadas con el estrés oxidativo y aumenta con la presencia de antioxidantes que rompen la cadena oxidativa.

Un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de la molécula inestable de un radical libre sin perder su propia estabilidad electroquímica (FIGURA No. 4). (66)



**FIGURA No. 4. ANTIOXIDANTE NEUTRLIZANDO UN RADICAL LIBRE.**

El organismo está luchando contra radicales libres a cada momento del día, pero el problema se produce cuando tiene que tolerar de forma continuada un exceso de radicales libres. El exceso es producido sobre todo por contaminantes externos que entran a

nuestro cuerpo. La contaminación atmosférica, el humo del tabaco, los herbicidas, pesticidas o ciertas grasas son algunos ejemplos de elementos que generan radicales libres que ingerimos o inhalamos.

En resumen, la actividad antioxidante está determinada por:

1. Reactividad química del antioxidante.
2. Capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción.
3. Estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres. (28) (21)

#### **1.3.4.1 Alimentos Antioxidantes**

En todo el mundo hay un sinnúmero de alimentos naturales con poder antioxidante que aún no se han estudiado, sin embargo existen investigaciones que están encaminadas a encontrar el poder antioxidante o determinar la capacidad antioxidante de estas. La población en general obliga a las industrias a encontrar alimentos con beneficios para la salud y la creación de nuevos productos ya que son estos los que consumen y demandan productos de calidad. (28)

La revista cuerpo y mente (2010) presentó las propiedades de algunos alimentos naturales como es el caso de: La cebolla morada que es un buen anti-inflamatorio, antibacterial, rica en selenio, potasio, fibra, vitamina C, vitamina E y polifenoles; la granada que es una rica fuente de vitamina B6, polifenoles, potasio y vitamina C; la manzana a la cual se le atribuyen propiedades anticancerígenas, es recomendable para combatir el asma y el cáncer de pulmón, es un excelente antioxidante ya que contiene flavonoides, polifenoles y vitamina C, el jitomate contiene licopeno (poderoso antioxidante), rico en propiedades anticancerígenas, puede ayudar a normalizar la presión arterial y proteger la piel; el aguacate fortalece las funciones cerebrales y las funciones del sistema nervioso central, contiene fibra, potasio, vitamina E, carotenoides, polifenoles y luteína; el ajo posee propiedades antivirales y su consumo puede ayudar a prevenir el cáncer, es un excelente antioxidante, contiene compuestos polifenoles y potasio. (18)

### **1.3.4.2 Métodos para medir la Capacidad Antioxidante**

La necesidad de establecer métodos unificados para medir capacidad antioxidante quedó manifestada por el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes llevado a cabo en Orlando, Florida, USA en junio del año 2004. El propósito de esta reunión fue discutir acerca de la forma en la cual se determina la capacidad antioxidante de alimentos, fitoterapéuticos, nutraceuticos y suplementos dietarios y proponer métodos analíticos que pudieran ser estandarizados como procedimientos de rutina, debido a que los métodos existentes presentan resultados inconsistentes, no existe equivalencias entre unos y otros y la interpretación de las conclusiones, en algunos casos, va más allá del alcance de los resultados. (28) (66)

Pese a esto, hasta ahora, no existen métodos mundialmente unificados para medir capacidad antioxidante, en parte, debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas. Un método unificado para determinar capacidad antioxidante debería estar estandarizado y cumplir con los siguientes requisitos:

1. Utilizar un radical biológicamente relevante.
2. Ser un método simple.
3. Utilizar un punto final definido y un mecanismo conocido.
4. Emplear instrumentación fácilmente disponible.
5. Tener buena reproducibilidad.
6. Ser adaptable para medir antioxidantes lipofílicos/hidrofílicos y a diferentes radicales.
7. Ser adaptable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras. (57)

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la

actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. (66)

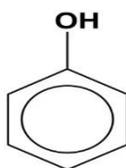
## 1.4 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. (53)

Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol. (26)

### 1.4.1 ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (FIGURA No. 5). (53)



**FIGURA No. 5. ESTRUCTURA DEL FENOL.**

Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos. Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados

hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo  $\gamma$  pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres.

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C2 y C3 en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C (FIGURA No. 6). (53) (26)

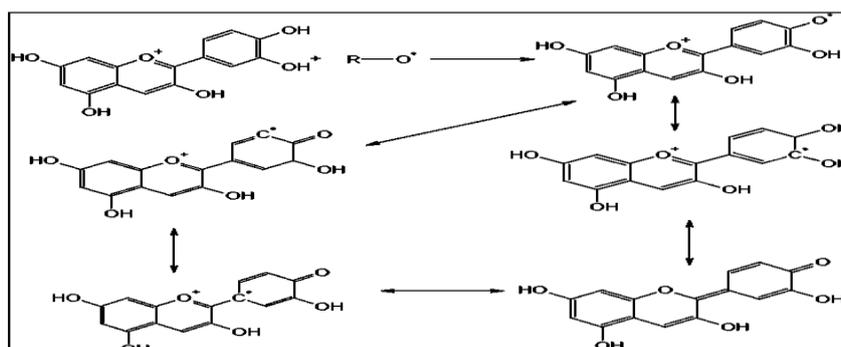


FIGURA No. 6. ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES.

Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples (FIGURA No. 7). (53)

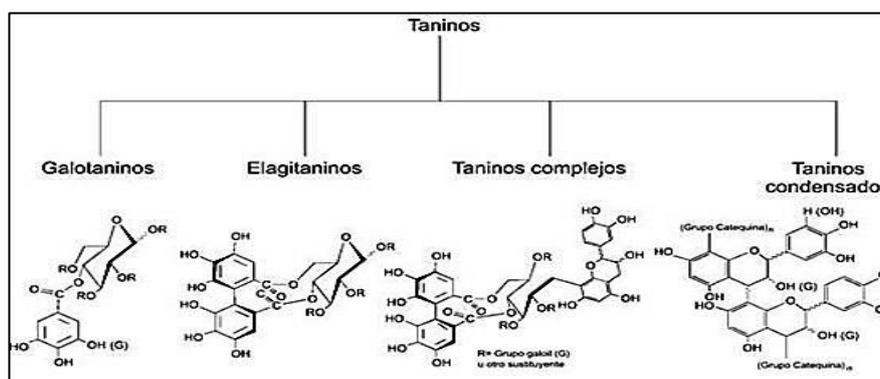


FIGURA No. 7. ESTRUCTURA DE LOS TANINOS.

### 1.4.2 FUENTES DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas, flores, cerveza, vino, té verde, té negro, soja, etc. los cuales deben ser consumidos en la dieta humana de forma habitual. Los antioxidantes de las plantas constituyen uno de los componentes activos de los alimentos, cuya fuente principal se encuentra en las diferentes partes de la planta. Algunos recursos importantes son el ajo, el brócoli, el té verde, la soja, el tomate, la zanahoria, la col de Bruselas, la col rizada, la cebolla, la coliflor, las remolachas rojas, el cacao, los arándanos, la zarzamora, las uvas y los cítricos que son mencionados como las fuentes más ricas de antioxidantes. (26)

Muchos de estos compuestos actúan mejor en mezcla con diferente actividad por lo que los muy reactivos sean los que reduzcan a los radicales más activos mientras que los otros actúen regenerando a los primeros. Es bien conocido el sinergismo entre el  $\alpha$ -tocoferol y la vitamina C asimismo la cooperación entre tocoferol y quercetina, rutina y vitamina C, ácido cafeico y vitamina C, de ahí que mientras no se conozca las proporciones óptimas de sus mezclas es mejor consumirlos de sus fuentes naturales. (53)

### 1.4.3 EFECTO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

El efecto preventivo atribuido a los polifenoles es amplio, existe un sinnúmero de investigaciones realizadas sobre las actividades fisiológicas de los componentes funcionales tanto de plantas como de animales.

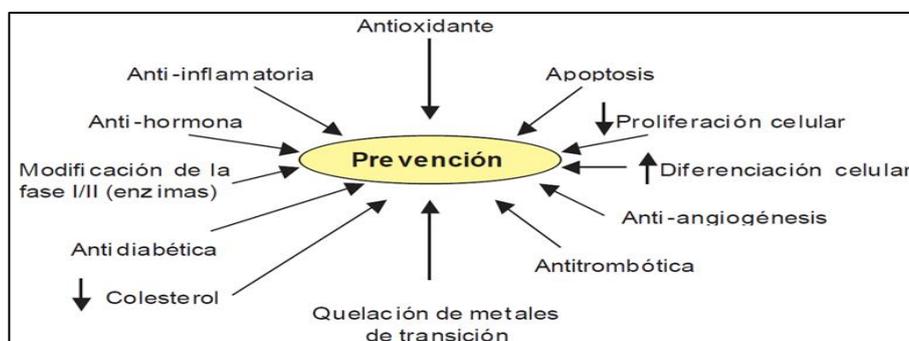


FIGURA No. 8. MECANISMOS PREVENTIVOS DE LOS POLIFENOLES.

Además los componentes fenólicos son relevantes para la prevención de cánceres en etapas de iniciación, progresión y promoción. En la FIGURA No. 8, se muestra los efectos preventivos de los componentes naturales. Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina mono-amina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento. (53) (26)

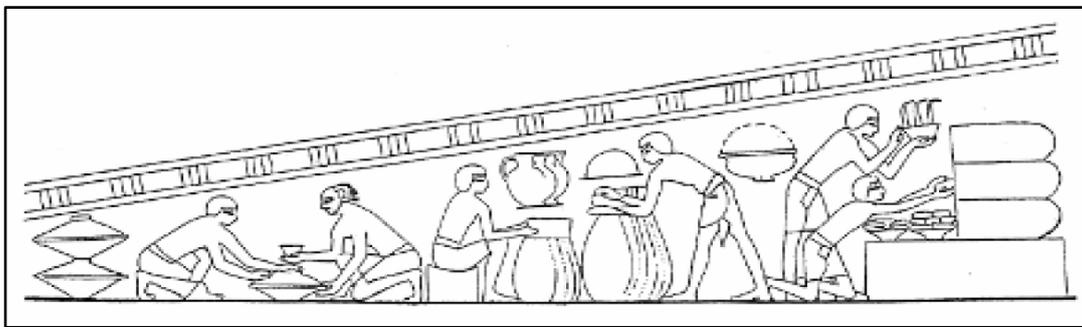
Los flavonoides y otros compuestos fenólicos actúan en forma preventiva en el desarrollo del cáncer y de la enfermedad coronaria. La ingestión de vino tinto desalcoholizado o de una mezcla de compuestos fenólicos extraída del vino tinto mejora el status antioxidante del plasma en humanos. El consumo de dietas controladas altas en frutas y verduras incrementa significativamente la capacidad antioxidante del plasma en humanos. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación negativa significativa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad debida a la enfermedad cardíaca. (53)

## **1.5 APICULTURA**

### **1.5.1 DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES**

La apicultura o el cultivo de abejas es una actividad agropecuaria orientada a la crianza de abejas (del género *Apis*) y a prestarles los cuidados necesarios con el objeto de obtener los productos que ellas son capaces de elaborar, y recolectarlos, con el fin de satisfacer las necesidades que el hombre tiene de esos productos. La cría de la abeja de especie *Apis mellifera* estaba distribuida en Europa, Asia y África, con origen en África, antes de que apareciera el hombre *Homo sapiens*. La relación del hombre con las abejas se remonta aproximadamente hasta los tiempos mesolíticos. (34)

La cultura avanzó y la gente aprendió como colocar las colmenas (nidos) de las abejas dentro cavidades, en recipientes de cerámica, suelo, forraje o madera (como troncos de árboles). Un jeroglífico desde la época de las pirámides (Tumba de Rehmere) ilustra 3 colmenas horizontales (canarias) hecho de lodo o cerámica a la derecha – el hombre en sus rodillas a la derecha frente a la colmena está sacando panales de miel y el de arriba está usando un “censar” (recipiente para dispersar humo); las dos personas en la mitad de la pintura procesan la miel y a la izquierda dos personas guardan la miel en un recipiente de cerámica (FIGURA No. 9). Los griegos, veneraron la apicultura y representaron en su moneda, con el cuño de una abeja en los años 480 a.C. (6)



**FIGURA No. 9. JEROGLÍFICO QUE REPRESENTA LAS TÉCNICAS DE APICULTURA EN EL ANTIGUO EGIPTO.**

La deforestación por el tipo de apicultura así como por el mayor uso de madera lleva a la civilización a desarrollar de los “skeps”. Skeps que son el símbolo de una colmena típica en el mundo, especialmente en Europa y América el norte. (6)

Hoy en día los apicultores en la mayoría del mundo crían la abeja italiana con la cría en menor medida de Cárnicas y abejas Caucásicas. En Sur América las abejas fueron importadas de África al Brasil, en 1956, con el resultado de la abeja Africanizada. La abeja africanizada es la única que se puede criar en Sur y Centro América. (6)

## **1.6 PRODUCTOS APÍCOLAS**

Para muchos, la única producción de las abejas es la miel, algunos más recuerdan que la cera es otro producto natural que obtenemos del trabajo directo de estos insectos; pero

ocurre que a pesar de seguir siendo éstos los más importantes, no son solo los únicos, existen cada vez más. Hablamos de los propóleos (o própolis), la jalea real, el veneno de abeja (o apitoxina), las reinas, e incluso productos que pueden ser considerados como exóticos: abejas y larvas de abejas para su consumo como alimento; los cuales, con el debido conocimiento de su proceso productivo y sus mercados, pueden contribuir tanto o más a añadir valor económico a la explotación apícola. (34) (6) (73)

#### 1.6.1 LA JALEA REAL

La jalea real o “leche de abejas” es fruto de la secreción de las glándulas mandibulares de las abejas jóvenes, con menos de seis días de vida. Forma parte de la dieta de las larvas de obreras y zánganos y constituye el único alimento de las reinas. Quizás esa sea la causa de que la reina viva 5 años en lugar de 4 meses como las obreras. Y es que se trata de un verdadero concentrado nutritivo, que contiene vitaminas, minerales y enzimas, etc. (8)

#### 1.6.2 EL POLEN

Es un polvillo que sirve para que se fecunde la flor. Las abejas lo recogen de las plantas y flores y lo transportan en sus patas posteriores donde llevan unos cestillos o bolsas. Para recolectar este producto el apicultor coloca a la entrada de la colmena una trampa, llamada cazapolen, que permite a duras penas el paso de las abejas; con el roce, las bolitas de polen se desprenden de sus patas y caen en un recipiente. Una colmena consume al año unos 35 kilos. Con ese mecanismo, se pueden obtener unos 3 kilos por colmena, pues no conviene abusar. Es de diferentes colores, dependiendo de las plantas de las que procede. (34) (8)

#### 1.6.3 LA CERA

La cera de abejas es una sustancia grasa con propiedades que la distinguen de las otras ceras vegetales o minerales. La abeja segrega la cera como una emulsión que se seca al

tomar contacto con el exterior. Actualmente se utiliza para fabricar velas, ungüentos, barnices, betunes, pomadas, etc. (8)

#### 1.6.4 LA APITOXINA

Las abejas tienen almacenado veneno en un saco, es un líquido claro y aromático, que se vacía en el aguijón. Se elabora en las glándulas situadas en la parte posterior del último segmento abdominal. El veneno se produce como una estrategia para su defensa y no pueden renovar su provisión una vez utilizado. Desde la antigüedad se ha usado el veneno de abejas en muy pequeñas cantidades ya que tiene efectos benéficos y curativos en un gran número de enfermedades, por ello hoy se sigue utilizando con fines terapéuticos. La apitoxina es un producto que se emplea en medicina por su efecto antiartrítico, en la preparación de antialérgicos y como anticoagulante. (8) (73)

#### 1.6.5 LA MIEL

##### 1.6.5.1 Definición

Según la NTE INEN 1 572 la miel de abejas es la “Sustancia dulce producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas que dichos insectos recogen, transforman, combinan con sustancias específicas y almacenan después en panales”. (38)

El Codex Alimentario indica que “Se entiende por miel la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje”. (72)

Biológicamente entendemos por miel a “La sustancia producida por las abejas y otros insectos sociales, a partir del néctar o melazas que ellas recolectan sobre plantas vivas y

que transforman o elaboran mediante evaporación de agua y acción de enzimas, segregadas por ellas. Quedando almacenada en los alveólos o celdillas de los panales”. (31)

### **1.6.5.2 Origen y formación**

#### **1. Néctar**

El néctar es la fuente principal de la que se origina la miel. Es segregado por órganos especializados de la planta, llamados nectarios, situados generalmente en la base de la corola (nectarios florales) pero en algunos casos colocados en diversas partes (nectarios extraflorales). Consiste en una solución de agua y azúcares, con pequeñas cantidades de otras sustancias (aminoácidos, minerales, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas, aceites esenciales, etc.). (68)

#### **2. Mielatos**

Los insectos chupadores y picadores, sobre todo los pulgones (género *Aphis*), cóccidos (cochinillas) y psilas, atacan los haces liberoleñosos (floema y xilema) de la planta, sobre todo de las hojas y de los brotes jóvenes, el exudado de sus vientres va dejando una capa dulce sobre las hojas y ramas, que a veces cae en forma de lluvia hasta el suelo, mojando el vegetal y todo lo que le rodea. (68)

#### **3. Jugos de frutas**

Hay casos, excepcionales, en que las abejas liban de frutas que han sido atacadas por animales o por otros insectos; estas frutas, maduras, contienen jugos altamente concentrados en azúcares, por lo que son también una fuente atractiva para las pecoreadoras. (68)

### **1.6.5.3 Cosecha o Recolección**

#### **1. Desoperculado**

Desopercular es el proceso de remover la capa de cera que cubre cada una de las celdas de un panal de miel madura. El equipo de desopercular varía, desde un cuchillo que se calienta en agua para facilitar el corte de los opérculos de cera, cuchillos de vapor, de resistencia, desoperculadores de cuchillos mecánicos de varios tipos, a máquinas que rompen la parte superior de las celdas de cada cara del panal. (34)

#### **2. Extracción**

La estrechez de las celdillas y la densidad de la miel impiden que ésta salga por sí misma, teniendo que recurrir a la fuerza centrífuga que proporciona un aparato llamado extractor, que fue inventado por el italiano Hruschka en 1865. Los extractores vienen de dos tipos, tangenciales a la vertical del eje de rotación y radiales. Los extractores tanto tangenciales como radiales, giran a una velocidad de no más de 300 rpm por espacio de 20-25 min. (34)

#### **3. Colado**

El material por el que se ha de colar la miel puede ser: tela metálica de acero inoxidable, fibra de vidrio, de nylon o de algodón. La idea de proceso de colado es remover el grueso del material particulado que principalmente está constituido por partículas de cera del proceso de desoperculado y una que otra partícula de abejas, así como astilla de madera de los cuadros. (6)

#### **4. Filtrado**

Al filtrar la miel se remueve el polen, los coloides y algunas partículas de aire que no son removidas por el proceso de colado. Muchos conocedores de la miel objetan el que se filtre la miel, basándose en que la miel filtrada deja de ser un producto completo ya que

se le están removiendo componentes integrales y naturales que pueden aportar a la nutrición de aquel que la consume. (6)

## **5. Envasado**

Los envases para almacenar miel varían desde pequeños sobrecitos de celofán hasta drones con capacidad de 300 Kg. Años atrás la miel se empacaba en envases de metal (para gran volumen) y de cristal (para volúmenes más pequeños); sin embargo, la tendencia es hacia la utilización de envases plásticos (PVC y PET) para volúmenes de 20 litros y menores. (6)

### **1.6.5.4 Características Físicas**

#### **1. Color**

Los colores de la miel pueden variar desde casi transparente hasta miel casi negra. El color oscuro no significa que la miel sea de calidad inferior, por el contrario, se sabe que cuanto más oscura es la miel más rica es en fosfato de calcio y en hierro y, en consecuencia, es la más indicada para satisfacer las necesidades de los organismos en crecimiento, de los individuos anémicos y de los intelectuales sometidos a esfuerzos mentales. La miel de color claro es más rica en vitaminas A. Las mieles oscuras son más ricas en vitaminas B1 y C. (55) (71)

#### **2. Sabor**

El sabor es una característica muy importante de la miel; sin embargo, es la más difícil de describir. Al presente es imposible describir el sabor de la miel, pero se espera que pronto se desarrolle instrumentación que lo pueda llevar a cabo. El sabor de las mieles de color claro es más fino que el de las mieles de color oscuro, que lo tienen más intenso. (55)

### **3. Aroma**

Este debe ser característico del origen floral del cual provenga la miel, libre de aromas extraños. (55)

### **4. Conductividad eléctrica**

Este parámetro está relacionado con la concentración de sales minerales, ácidos orgánicos y proteínas, por lo cual es una medición útil para establecer el origen geográfico de los distintos tipos de mieles, dándose valores más altos en las mieles de bosque que en las florales, así Vorwohl (1964), observó que mieles de un mismo origen floral presentan conductividades eléctricas muy semejantes a pesar de tener orígenes geográficos y condiciones climatológicas diferentes, sin existir relación entre dichas conductividades y el contenido del polen. El rango de conductividad eléctrica en la miel es de 0.60 y 2.17 mS/cm (milisiemens/centímetro). (55) (71)

### **5. pH**

En la miel contribuye a dar estabilidad frente a ataques microbianos y se halla muy condicionado por el contenido en sales minerales, principalmente las de sodio y calcio y en las mieles de mielada puede aumentar su valor debido al efecto regulador de las sales tampones que contiene. El pH de la miel oscila entre 3.4 y 6.1 con una media de 3.9, esta variación depende de la procedencia botánica, siendo generalmente inferior o igual a 4 para mieles del tipo floral y superior a este valor para las mieles de mielada, según Jiménez y col. se puede considerar como un parámetro estable durante el almacenamiento con cierta disminución a través del tiempo. (71)

### **6. Acidez**

La acidez protege a la miel de los ataques microbianos y contribuye a otorgarle aroma, aunque no sea advertido en el sabor al estar enmascarada por el dulzor de los azúcares. Fue atribuida durante mucho tiempo al ácido fórmico adicionado a la miel por la abeja al

depositar una gota de veneno durante la operculación de las celdillas, El ácido glucónico es considerado el principal ácido de la miel. (55)

Según Graca (1987), los ácidos de la miel se originan fundamentalmente a partir de las secreciones de las glándulas salivares de la abeja que producen los procesos enzimáticos y fermentaciones. Esta acidez se debe a la presencia de ácidos orgánicos en equilibrio con sus lactonas y a algunos iones inorgánicos como fosfatos, cloratos y sulfatos, cuyos ácidos correspondientes forman parte de la miel. (55)

## **7. Viscosidad**

La miel en estado líquido suele ser muy viscosa, esta propiedad depende de su composición química, contenido de agua y temperatura. Una baja viscosidad en la miel puede ser un indicador de adulteración por adición de agua. (71)

## **8. Actividad de agua**

La miel se enmarca dentro de los alimentos de humedad intermedia (IMFs), técnicamente muy segura respecto a los peligros sanitarios habituales que rodean a los alimentos tradicionales artesanales, pero susceptibles de alterarse merced a los posibles cambios ocurridos cuando han existido anomalías de envasado o conservación.

Según Alcalá y Gómez (1990), Belitz y Grosch (1997), Mossel y col. (2003) la actividad de agua de la miel oscila entre 0.490 y 0.650 lo que la convierte en un alimento seguro frente a la actividad de numerosos microorganismos. En el caso de las mieles cristalizadas, el gradiente de concentración puede generar actividades de agua diferentes, permitiendo el crecimiento local de levaduras osmófilas. (55)

## **9. Cristalización**

La miel es una solución sobresaturada de azúcares, por lo que alcanza el equilibrio con la cristalización, tendiendo granular en la mayoría de los casos. Esto es debido a la

precipitación de los cristales de glucosa cuyo crecimiento provoca la separación de la miel en dos fases, una fase sólida constituida por cristales de glucosa y otra fase superior líquida con un mayor contenido en agua, lo cual favorece el crecimiento microbiano y las fermentaciones. Esta cristalización de la miel es un fenómeno natural cuya velocidad varía dependiendo de factores como el contenido en agua, la composición en azúcares y la temperatura de conservación. Cuando la cristalización es lenta, el tamaño de los cristales es mayor. Las mieles cristalizadas no suelen tener buena aceptación por los consumidores y además presentan el riesgo de la fermentación si la granulación no es homogénea.

La miel cremada es una miel de cristalización fina que se mantiene estable en el tiempo y permite su uso para untar sin que se derrame el producto, además de mantener las cualidades logradas en el tiempo (es la forma más estable de la miel). Para obtenerla, hay que partir siempre de miel granulada. (55) (72) (71)

#### **1.6.5.5 Composición Química**

##### **1. Carbohidratos**

Constituyen el principal componente de la miel. Dentro de los carbohidratos los principales azúcares son los monosacáridos fructosa y glucosa. Estos azúcares simples representan el 85% de sus sólidos, ya que la miel es esencialmente una solución altamente concentrada de azúcares en agua. Los otros sólidos de la miel incluyen otros 25 azúcares complejos, pero algunos de ellos están presentes en niveles muy bajos y todos están formados por la unión de la fructosa y glucosa en diferentes combinaciones. (31)

##### **2. Agua**

El contenido de humedad es una de las características más importantes de la miel y está en función de ciertos factores tales como los ambientales y del contenido de humedad del néctar. La miel madura tiene normalmente un contenido de humedad por debajo del

18.5% y cuando se excede de este nivel, es susceptible a fermentar, particularmente cuando la cantidad de levaduras osmofílicas es suficientemente alta. (31)

### **3. Proteínas y Aminoácidos**

La miel contiene aproximadamente 0.5% de proteínas, principalmente como enzimas y aminoácidos. Los niveles de aminoácidos y proteína en la miel son el reflejo del contenido de nitrógeno, el cual es variable y no supera el 0.04%. Entre el 40-80% del nitrógeno total de la miel es proteína. Cerca de 20 proteínas no enzimáticas se han identificado en la miel, muchas de las cuales son comunes a distintas mieles. (31)

### **4. Vitaminas y Minerales**

La cantidad de vitaminas en la miel y su contribución a la dosis recomendada diaria de este tipo de nutrientes es despreciable. El contenido mineral de la miel es altamente variable, de 0.02 a 1.0%, siendo el potasio cerca de la tercera parte de dicho contenido; la cantidad de potasio excede 10 veces a la de sodio, calcio y magnesio. Los minerales menos abundantes en la miel son hierro, manganeso, cobre, cloro, fósforo, azufre y sílice. Entre las vitaminas comúnmente encontradas en la miel están: Riboflavina, Ácido pantoténico, Niacina, Tiamina, Piridoxina, Ácido ascórbico. (68)

### **5. Enzimas**

Son añadidas principalmente por las abejas, aunque algunas pocas proceden de las plantas. Las abejas añaden enzimas a fin de lograr el proceso de maduración del néctar a miel y éstas son en gran parte las responsables de la complejidad composicional de la miel. El proceso involucrado en la conversión de los tres azúcares básicos del néctar a por lo menos 25 azúcares adicionales de gran complejidad es difícil de entender.

La enzima más importante de la miel es la  $\alpha$ -glucosidasa, ya que es la responsable de muchos de los cambios que ocurren durante la miel; también se conoce como invertasa o

sucrasa y convierte el disacárido sacarosa de la miel en sus constituyentes monosacáridos fructosa y glucosa. (31) (68)

## 6. Calorías

La miel proporciona 326 calorías por cada 100 gramos. En la TABLA No. 2 se pueden observar los componentes químicos de la miel. (72)

**TABLA No. 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL DE ABEJA.**

<b>Componente</b>	<b>Valor Medio (%)</b>	<b>Límites (%)</b>
<b>Componentes Principales (&gt; 99 %)</b>		
<b>Agua</b>	17.0	13.4 - 26.6
<b>Fructosa</b>	39.3	21.7 - 53.9
<b>Glucosa</b>	32.9	20.4 - 44.4
<b>Sacarosa</b>	2.3	0.0 - 7.6
<b>Componentes Secundarios (&lt; 1 %)</b>		
<b>Ácidos</b>	0.57	0.17 - 1.17
<b>Minerales</b>	0.17	0.02 - 1.03
<b>Nitrógeno (proteínas y aminoácidos)</b>	0.04	0.00 - 0.13

Fuente: Cabello, T., Apicultura., EPS., UAL., 2006-2007.

### 1.6.5.6 Clasificación

#### 1. Miel de flores

Es la que procede principalmente de los néctares de las flores. (38)

- a. La miel monoflora procederá principalmente de los néctares de un tipo de flor.
- b. La miel poliflora procederá principalmente de los néctares de diversos tipos de flores.

#### 2. Miel de mielada

Es la miel que procede principalmente de exudaciones de las partes vivas de las plantas o presentes en ellas, o de excreciones que los insectos succionadores (*Hemiptera*) dejan

sobre las partes vivas de las plantas. Su color varía de pardo muy claro o verdoso a casi negro. (38)

#### **1.6.5.7 Valor Nutritivo**

La miel fue un artículo alimenticio de sobrevivencia para los primitivos. Dado su valor endulzante, es bien atractiva para la gente, aun cuando haya que recibir una que otra picada durante el proceso de cosecha. Recordemos que por muchos siglos la miel de abejas jugó un papel clave como endulzante ya que no se conocía la azúcar de caña o de remolacha o el jarabe de maíz alto en fructosa. (72)

Entre los factores nutritivos más atractivos de la miel está el hecho de que la miel es un alimento de alto valor calorífico fácilmente asimilable. Es un producto que en su forma natural e inalterada es prácticamente predigerido. Muchas personas concientes de que mientras más sana la dieta, mayores son las probabilidades de llevar una vida sin problemas de salud, han comenzado o incrementado su consumo de miel de abejas como parte de una dieta balanceada. (31) (72)

Esta fuente de energía es muy indicada para los atletas, el organismo puede absorber grandes cantidades de miel y además facilita la digestión de otros alimentos. Es importante también para el desarrollo infantil, porque además de pasar rápidamente a la sangre, ejerce una buena influencia en la asimilación del calcio y del magnesio. La miel posee la mayoría de los elementos minerales esenciales para el organismo humano. (72)

Conociendo la importancia de las funciones biológicas que desempeñan estos elementos minerales no es de extrañar que la miel se recomiende como sustituta de otros azúcares refinados que sólo poseen valor energético. Además también contienen vitamina C y varias del grupo B, en pequeñas cantidades, pero que ayudan a llegar a los niveles mínimos necesarios, junto con el resto de la dieta. (72)

### **1.6.5.8 Valor Terapéutico**

#### **1. Actividad antioxidante**

La capacidad antioxidante es la habilidad que tienen algunas mieles para reducir la cantidad de reacciones oxidativas en el cuerpo, estas pueden producir efectos perjudiciales en los alimentos y el organismo, como enfermedades crónicas.

Los polifenoles, los flavonoides y los ácidos fenólicos participan en el sistema antioxidante de la miel, junto con una variedad de compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos), carotenoides y vitamina C, que son ampliamente conocidos por su actividad antioxidante. (17) (33)

Frankel y col. (1998) estudiaron 19 mieles uniflorales con el método de DPPH y obtuvieron valores de AAT (10-5 µeq) comprendidos entre 21.3 y 432.0. Estos autores explicaron que la composición química (contenido de azúcares individuales, cenizas, nitrógeno, contenido de metales) de la miel de abejas puede variar según la especie floral que se utiliza como fuente del néctar. Además de esto, dichos autores sugieren que las propiedades antioxidantes de la miel están relacionadas con su color y contenido de humedad, ya que muchos de los pigmentos que contiene (tales como carotenoides y flavonoides) presentan actividad antioxidante y el contenido de agua de la miel puede determinar el grado de acumulación de compuestos antioxidantes solubles en agua. Estos factores pueden ser los responsables de las variaciones en AAT encontradas dentro de cada grupo botánico. (33)

#### **2. Actividad antibacteriana**

Sackett (1919) observó que algunas bacterias mueren rápidamente en miel no esterilizada por calor, dando mejores resultados las mieles diluidas. Dold, Du y Dzio (1937) fueron los primeros en examinar las propiedades antibacteriales de la miel, se le atribuyó a una sustancia llamada en aquellos entonces, "inhibina". Esta era susceptible al calor y a la luz. Luego, varios investigadores demostraron que mieles de diversos orígenes tenían

efecto sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas. Este efecto no era atribuido a la acidez, alto contenido de azúcares, compuestos nitrogenados, sino a una sustancia bactericida que era susceptible al calor, a la luz solar y a un pH bajo. (13)

Plachy (1944) reportó que las mieles de altura (>1,000 m) tenían por lo menos el doble de la actividad antibacterial que mieles de áreas bajas (<1,000 m). Sin embargo, se observó que sobre los 1,000 m la mayoría de las mieles tenían un porcentaje más alto de mielada. La mielada tiene propiedades antibacteriales más marcadas que la miel floral. Más tarde se encontró que los efectos de la "inhibina" eran causados por la acumulación de peróxido de hidrógeno, producido por un sistema natural de oxidasa de glucosa. (14)

#### **1.6.5.9 Calidad**

Los índices más utilizados para medir la frescura de dicho alimento son el 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) y la actividad diastásica.

El HMF es un aldehído cíclico que se origina espontáneamente a partir de la fructosa en un medio ácido y es un proceso lento. Se calcula que el aumento de HMF en mieles es de 1 mg/Kg por mes en climas suaves con temperatura máximas de 30°C. Algunas comisiones internacionales establecieron que el contenido máximo de HMF debería ser 40 mg/Kg, con excepciones para mieles de origen tropical, en cuyo caso se admiten 80 mg/Kg como máximo. Sin embargo, algunos países como Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda no han considerado este parámetro para evaluar la calidad de la miel. (55)

La Actividad Diastásica está determinada por la acción de la diastasa que es una enzima presente naturalmente en mieles frescas, cuyos niveles disminuyen durante el almacenamiento o calentamiento. Los valores del índice de diastasa para mieles ha queda establecido como mínimo de 3 y como máximo de 8. (55)

### 1.6.6 EL PROPÓLEO



**FOTOGRAFÍA No. 1. PROPÓLEO EN ESTADO BRUTO.**

Esta sustancia, elaborada por las abejas (FOTOGRAFÍA No. 1), es conocida por el hombre desde tiempos remotos. Así, la utilizaban los sacerdotes del antiguo Egipto y, más tarde, los griegos, a quienes les debemos el nombre “propóleos”: pro, que significa «delante de», y polis, que quiere decir «ciudad». Aristóteles ya habla de ella en su Historia de animales, y la considera como remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones. (61)

Su utilización se ha mantenido durante siglos, hasta llegar a nuestros días, en que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de propóleos en los campos de la Biología, la Medicina humana y la Medicina veterinaria. (61)

La investigación sobre la industria farmacéutica ha dado popularidad al comercio de los propóleos en Estados Unidos, la Unión Europea y en Japón ya que están presentes en los biocosméticos y son utilizados como medicinas alternativas, así como complementos dietéticos, que mejoran la salud y previenen enfermedades. (70)

#### **1.6.6.1 Definición**

Krell (1996) y luego Salatino (2005) definen al propoleo como “Un producto apícola resinoso y complejo, con una variable apariencia física, recogido y transformado por las abejas melíferas, *Apis mellifera*, desde la vegetación que visitan. Puede ser ocre, rojo,

pardo, marrón claro o verde, algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos”. (61)

De acuerdo a Greenaway y col. (1987 y 1990); Ghisalberti (1979); Banskota y col. (2001) quienes coinciden en decir que “Es un producto resinoso que se forma a partir de exudados que las abejas mastican y que luego regurgitan en la colmena, mezclándolo con pequeñas cantidades de azúcares y con cera secretada por ellas”. (61)

Químicamente diremos que el Propoleo es “Un polímero balsámico resinoso que las abejas elaboran a partir de diversas resinas de plantas, el que potencializan con las enzimas producidas por sus glándulas salivales, enriqueciéndolos con los residuos de la digestión láctica de los gránulos de polen. Su aspecto externo es amorfo plástico terroso con color que puede variar de castaño claro a pardo oscuro y penetrante olor resinoso también variable en intensidad”. (70)

#### **1.6.6.2 Origen y formación**

##### **1. Teoría del origen externo**

La naturaleza dotó a los vegetales de un delicado poder protector, facultándolos para elaborar sustancias de un poder antimicrobiano, antifúngico y antiparasitario. Las abejas, con un indudable poder bioselector, recogen estas resinas, en las yemas tiernas o en las fisuras de los troncos, para lo cual esperan a que el sol caliente lo suficiente como para ablandarlas, labor que es auxiliada por la secreción por sus glándulas salivares de una enzima y el ácido 10 dihidrodecanoico. De esta forma, será posible desprenderlas y darle forma de bolitas (como ocurre con el polen), siendo transportadas a la colmena en las cestillas de las patas traseras. De allí las toman las abejas obreras y todo parece indicar que le agregan otros residuos para fortalecer su consistencia. (70)

Esta TEORÍA DEL ORIGEN EXTERNO se ha estado discutiendo desde los tiempos de Aristóteles, pues la presencia de algunos componentes que normalmente no se encuentra

presentes en las resinas de las plantas, no encuentra en ella explicación, pero ha sido respaldada por figuras tan prestigiosos como Rosch, Evenius y Berlopech. (61)

## **2. Teoría del origen interno**

En 1907, Kustenmacher emitió su TEORÍA DEL ORIGEN INTERNO, que plantea que las abejas tragan el polen y lo acumulan en una de las porciones de su intestino (chylusmagen), absorbiendo después 5 veces su peso en agua, consiguiendo que los gránulos se hinchen hasta fragmentarse. De ellos extraerán el plasma con que fabricarán la miel. De la descomposición láctica de la cubierta, se formará un bálsamo con el que elaborarían el propóleo. Esto explicaría la presencia de polen, que serían los gránulos que por su consistencia no se fragmentasen. Esta teoría tiene en su contra, el que si esto ocurriese sólo de esta forma, el propóleo debía presentar en su composición química, mayormente sustancias nitrogenadas y lipídicas, lo cual no ocurre en la realidad, como explicaron Haydek y Eneus, aclarando los aspectos de índole fisiológica, morfológica y anatómico en los que no concuerdan ambas sustancias. (61) (70)

### **1.6.6.3 Fuentes de Propóleo**

Este ha sido un punto muy debatido. Muchos apicultores piensan que las abejas recolectan sólo las resinas de los árboles que se encuentran en el entorno de la colmena, olvidando su capacidad para volar hasta 30 Km, lo que les permite efectuar la selección de aquellas resinas que específicamente necesite (FOTOGRAFÍA No. 2). (70)

Si bien es señalable que en cada región ellas escogen grupos específicos de plantas, en Europa se ha determinado las relaciones entre los principios activos de algunas plantas resinosas como el álamo y el abedul y los componentes de los propóleos elaborados en esa área. (61)

En nuestro país, estos estudios aún no han podido realizarse en su totalidad, pero se pudo establecer relaciones entre nuestra flora resinosa, como son el roble, almácigo, mango, palta, etc., y la composición de nuestro propoleo. (61)



**FOTOGRAFÍA No. 2. ABEJA RECOLECTANDO RESINAS DE ALGUNAS PLANTAS Y TRANSPORTANDOLA A LA COLMENA PARA OBTENER EL PROPÓLEO.**

Consideramos necesario destacar la universalidad de los componentes vegetales básicos, entre los que podemos citar, por ejemplo, los pigmentos colorantes, cuyas combinaciones nos darán los colores de las diversas partes de las plantas en todo nuestro planeta y quienes nos darían la explicación a que los principios activos detectados en el propóleo en todas las latitudes, respondan a parámetros similares, por lo que podrán presentar funciones terapéuticas similares. (70)

#### **1.6.6.4 Recolección**

Uno de los puntos clave para la obtención de un propoleo de elevada pureza reside en la técnica de recolección aplicada. Por un lado, existe la clásica recolección por raspado, que consiste en raspar con una espátula de metal el propoleo depositado por las abejas sobre los cabezales de los macros, bordes, etc. Este sistema está en desuso debido principalmente a su falta de higiene, ya que en la composición del producto pueden aparecer trozos de madera, metales pesados, etc., que afecten la calidad del producto final. (61)

Por otro lado, está la recolección de propóleos mediante un sistema de rejilla o malla (tela mosquitera, plásticas, etc.) que asegura una mayor pureza en el producto final. Su uso implica la colocación de una rejilla sobre la última alza con el fin de despertar el instinto de las abejas obreras, invitándolas a cubrir los agujeros de las diferentes mallas

depositando propóleo en ellos. Estos agujeros pueden ser de cualquier formato, pero nunca han de superar los 4 mm de diámetro puesto que ésta es la medida del ancho de una obrera, y de ser así las abejas podrían atravesarlo, convirtiéndolo en un lugar de paso, y olvidándose por tanto de cubrirlo. (61)

Existe otra técnica colectora de propóleo en Brasil, llamada Pirassununga, que consiste en estimular la producción de propóleo a través de unas aberturas laterales en las paredes de las colmenas. De este modo, al parecer se puede aumentar la productividad hasta 600 g al mes. Se trata una invención brasileña del Sr. Carlos Eduardo Conceição. (74)

Otro procedimiento consiste en colocar una lona encima de los cuadros formando pliegues. Todas las superficies quedan propolizadas por las abejas. Este procedimiento tiene la ventaja de que se puede obtener un propóleos más puro. (70)

#### **1.6.6.5 El Propóleo en el Mercado Internacional**

Antes de la caída del socialismo ruso los países de su órbita recurrían a la apiterapia, y a través de ella al propóleo, para distintas afecciones de la salud ya que los medicamentos elaborados por multinacionales no tenían acceso a aquellas Repúblicas. Internacionalmente, la primera patente se inscribió en Rumania (1965), totalizando 239 en el mundo para el período analizado (1910 a 1990).

El uso de propóleo se fue intensificado durante la Segunda Guerra Mundial por la ex URSS, para el tratamiento de heridas. Con el advenimiento de los modernos antibióticos, se comenzó a dejarlo de lado pero, paradójicamente, esa tendencia ha comenzado a revertirse debido a la amplitud de los efectos secundarios de estas sustancias sintéticas.

En la actualidad, el 43% de las patentes son de origen japonés El 6,2% de las patentes corresponden a productos para tratamientos odontológicos. (61) (70)

#### **1.6.6.6 Características Físicas**

Su color varía entre el amarillo y el marrón oscuro, en función de las resinas de origen, aunque se han citado casos de propóleos transparentes. Entre los 20 y 45 °C su consistencia es suave, flexible y adhesiva, pero al enfriarse se endurece y se hace quebradiza alrededor de los 15 °C, cuando esto ocurre a temperatura de refrigeración, no recupera sus características. A más de 45 °C cada vez son más pegajosos y se vuelven líquidos alrededor de los 60 °C, aunque hay casos en que son líquidos hasta los 100 °C.

El disolvente más utilizado para su extracción comercial es el alcohol etílico, usándose también el éter, el alcohol y el agua. La mayoría de sus componentes antibacterianos son solubles en agua y alcohol. (70)

#### **1.6.6.7 Composición Química**

La abeja elabora los propóleos de acuerdo a sus necesidades y probabilidades de fuentes de materia prima, por lo que está demostrado internacionalmente que será muy difícil encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos aun cuando estén ubicados en la misma zona geográfica. Es aún más significativo que los propóleos de las distintas partes de la colmena no tendrán exactamente la misma composición.

Debemos aclarar que estas variaciones no están dadas por la diversidad de los elementos que estén presentes en su composición, que básicamente se mantendrán estables, sino en las cantidades de cada uno de ellos que estarán presentes en cada muestra. Las diferencias en la composición están determinadas principalmente por:

1. La flora del área ecológica.
2. Los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas (floración y fructificación) que condicionan cambios en las concentraciones de las resinas.
3. Microorganismos presentes en el entorno geográfico.
4. Factores climatológicos. (25) (70)

En líneas generales, en todos los propóleos encontraremos los componentes que se indican en la TABLA No. 3. (25)

**TABLA No. 3. COMPOSICIÓN BÁSICA DE LOS PROPÓLEOS.**

<b>COMPONENTE</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
Resinas y Bálsamos	50 – 55
Cera	30 – 40
Aceites Esenciales	5 – 10
Polen	5
Material orgánico y Minerales	5

FUENTE: PALOMINO, L. Y OTROS., VITAE., COLOMBIA., 2009

El análisis químico del propóleo ha arrojado la presencia de 19 sustancias simples (microelementos) primordialmente en forma de radicales libres o asociados a formas proteicas. Estos son: Aluminio, Cobre, Litio, Potasio, Bario, Cromo, Manganeso, Silicio, Bismuto, Estroncio, Magnesio, Vanadio, Calcio, Hierro, Níquel, Zinc, Cobalto, Yodo, Plata. De estos microelementos se encuentran en la mayoría de los casos sólo en trazas principalmente entre las mezclas mecánicas y los gránulos. (25)

### **1.6.6.8 Actividad Biológica**

Debido a la gran cantidad de flavonoides contenidos en los propóleos, se les atribuyen un amplio espectro de actividades biológicas: Antifúngica (*Candida albicans*), antiviral (Virus de *Avian influenza*), y antibacteriana (*Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli*), antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante, anticancerígena y antiparasitaria. Este conocimiento ha servido como piedra angular para el desarrollo de investigaciones a nivel mundial que buscan conocer más acerca de sus propiedades curativas. (56)

#### **1. Actividad antioxidante**

Se informa en la literatura que el propóleos posee fuerte actividad antioxidante, relacionada fundamentalmente con la presencia de flavonoides. La chrisina, la galangina, el kaempferol y la quercetina disminuyen la producción de óxido nítrico; el isoninaeol B

tiene actividad detoxificadora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil y la tectocrisina disminuye la producción de malonil dialdehído. (24)

En las regiones templadas de Chile central, se investigó la actividad antioxidante y antiproliferativa en donde la muestra de propóleo demostró la capacidad de eliminar radicales libres e inhibir el crecimiento de células tumorales. (25)

En Brasil se ha estudiado su actividad citotóxica, antibacterial y antioxidante. Brasil se destaca por tener una amplia biodiversidad en su territorio lo cual permite tener una variedad de propóleos. Los extractos brasileños son clasificados como verdes y rojos siendo los verdes, los que cuentan con mayor preferencia en el mercado debido a su alta actividad biológica. Los extractos brasileños verdes son recolectados de las especies *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* y *Eucalyptus citriodora*. (25)

Las propiedades antioxidantes que hemos venido enumerando en casi todas las demás propiedades por su estrecha relación con ellas, van a estar determinadas por la formación de ésteres del ácido benzoico, recordemos que son preservos importantes los de metilo y propilo, siendo el benzoato de sodio preservos universal. Esto se cumple, también para los ácidos fenil – carbólico del tipo anisado y los flavonoles con un nivel de oscilación de sus anillos aromáticos muy significativo. (54)

#### **1.5.6.9 Calidad**

##### **1. Humedad, Materia seca y Cenizas**

El contenido en agua de un propóleo no debe superar el 5%, para que no se produzcan reacciones que a su vez generen productos no deseados, fermentaciones, crecimiento de levaduras. (70)

## **2. Ceras**

La presencia de ceras resta pureza al propoleo. Se consideran propóleos de calidad aquellos en los cuales el porcentaje de ceras no supere el 25%. (12)

## **3. Resinas y Bálsamos**

El propoleo puede clasificarse como una gomorresina, con presencia de bálsamos. El propoleo es, por tanto, básicamente una resina, y su contenido en este parámetro debe encontrarse dentro del rango (50-60%). Cuanto mayor sea el valor de esta fracción mayor será también la calidad del producto final, ya que aquí se encuentran todos los compuestos con actividad biológica. (19)

## **4. Impurezas mecánicas**

Del mismo modo que ocurre con las ceras, las impurezas mecánicas no contienen principios activos y su elevada presencia deprecia el producto (3). Valores superiores al 25% reflejan la baja pureza del propoleo a estudio. (19)

## **5. Índice de oxidación**

No debe ser mayor de 22 s. Este parámetro nos proporciona una idea de la cantidad de compuestos oxidantes presentes en la muestra. A mayor concentración de este tipo de compuestos menor tiempo de decoloración y por lo tanto mejor calidad del producto.

## **6. Fenoles y Flavonoides totales**

Los compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen los flavonoides (compuestos farmacológicamente activos), representan un índice inequívoco de la calidad del producto final. Cuanto mayor sea el porcentaje de estas fracciones mayor será también la pureza y calidad del propoleo. Se aconsejan valores superiores al 10% de compuestos fenólicos. (12) (19)

## **1.7 EL JENGIBRE**

### **1.7.1 GENERALIDADES**

Una de las primeras especias orientales, el jengibre ha sido cultivado en India para consumo en fresco y preparación de especias secas desde tiempos inmemoriales. En China, los primeros datos escritos sobre el jengibre fueron recogidos por Confucio (551-479 A.C). Después del pimiento, el jengibre era la segunda especia preferida por los romanos. (65)

En la cocina medieval europea el jengibre ocupó un lugar muy importante dentro de las especias utilizadas, puesto que, principalmente en Francia, desde esa época se aprecian los sabores ácidos. Las primeras descripciones que conocemos fueron hechas en 1292 por Jean de Montecorvino y Nicolás Conti. (65)

La planta fue introducida en América poco después del descubrimiento por Francisco de Mendoza, hijo del virrey de México. De allí pasó a Jamaica, que en 1547 ya exportaba 1.100 toneladas de rizomas a España y que desde entonces ha continuado siendo uno de los principales países productores de jengibre. (64)

El nombre de Zingiber, del cual ha derivado jengibre, debió ser, según se cree, tomado del sánscrito “Sanjabil”, que originó el “Zanzabil” en árabe. (64)

### **1.7.2 ORIGEN Y CULTIVO**

El jengibre es originario de Asia, en concreto de la India y China. Estos países son sus principales productores. Es cultivado en la mayor parte de las regiones intertropicales del globo. Los países productores son Sri Lanka, Tailandia, Jamaica, Australia, así como el estado estadounidense de Hawái también tienen cultivos, Brasil. El de mejor calidad es el jamaicano. Por sus propiedades medicinales, su cultivo se extendió en países de Europa y de América. (64)

En el Ecuador, las zonas aptas para el cultivo del jengibre se localizan en las áreas húmedas tropicales y subtropicales del país: Esmeraldas, San Lorenzo, Quinindé, La Concordia, Santo Domingo de los Tsáchilas, Quevedo, El Triunfo, Tena, Macas y Francisco de Orellana (Coca). (64)

### 1.7.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

#### 1.7.3.1 Morfología

El jengibre (FIGURA No. 10) o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) es una planta rizomatosa, con hojas linearlanceoladas de hasta más de 20 cm de longitud, largos pedúnculos florales con densas inflorescencias, y flores individualmente rodeadas de brácteas, las flores son solitarias generalmente hermafroditas y asimétricas, el fruto es una cápsula carnosa y coloreada, las semillas tienen endosperma, peisperma y arilo. (15)



**FIGURA No. 10. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL JENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe).**

La droga está constituida por el rizoma desecado (*Zingiberis rhizoma*), que mide de 5 a 10 cm de longitud, es aplanado (1,5-4 cm de ancho por 1-1,5 cm de grosor) y presenta ramificaciones en un solo plano, oblicuas, obovadas, con cicatrices huecas en el ápice de algunas de ellas. Se presenta desprovisto de súber completamente o al menos en las partes planas y anchas.

La superficie del rizoma mondado es de color marrón amarillento y presenta finas estrías longitudinales. La superficie del rizoma no mondado es de color marrón pálido a marrón oscuro y el súber tiene tendencia a exfoliarse. El rizoma presenta fractura corta y amilácea; su olor es aromático característico y su sabor picante y especiado. (15) (50)

### 1.7.3.2 Taxonomía

1. **REINO:** Vegetal
2. **CLASE:** Angiospermas
3. **SUBCLASE:** Monocotiledóneas
4. **ORDEN:** Escitamiáceas
5. **FAMILIA:** Zingiberaceae
6. **GÉNERO:** *Zingiber*
7. **ESPECIE:** *officinale*
8. **VARIEDAD:** Roscoe
9. **NOMBRE CIENTÍFICO:** *Zingiber officinale* Roscoe
10. **NOMBRE COMÚN:** Jengibre, Zingiber, Ajengibre. (50)



FOTOGRAFÍA No. 3. RIZOMAS DE JENGIBRE DE LA VARIEDAD HAWAIANA.

### 1.7.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El jengibre está compuesto por carbohidratos (50-70 %), lípidos (6-8 %), oleoresin (4 - 7.5 %), y aceite volátil (1-3 %). el análisis del rizoma indica algunos compuestos activos.

Los más importantes farmacológicamente son los terpenos, sesquiterpenos. Todavía no se sabe exactamente cómo tiene efecto en sus usos diferentes el jengibre (TABLA No. 4).

TABLA No. 4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL JENGIBRE.

COMPONENTE	CONTENIDO (%)
Agua	10.0
Proteínas	7.5
Lípidos	3.5
Esencia	2.0
Almidón	54.0
Celulosa	4.5
Sustancias extractivas no nitrogenadas	13.0
Cenizas	5.5

FUENTE: ENRIQUEZ, A., REVISTA MÉDICA VALLEJANA., PERÚ., 2008

### 1.7.4.1 Compuestos Volátiles

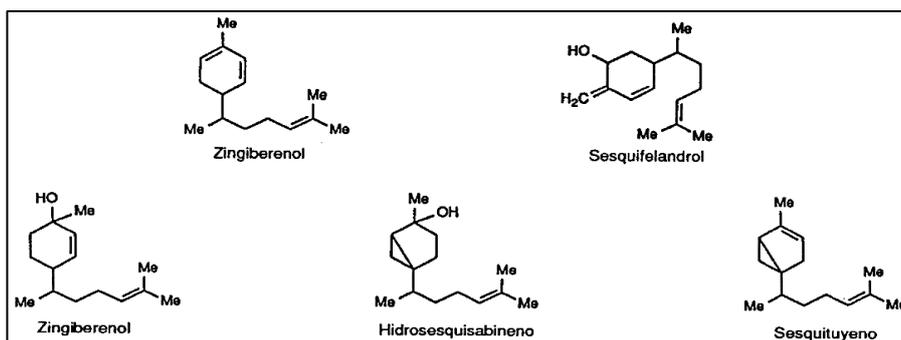


FIGURA No. 11. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES VOLÁTILES DEL JENGIBRE.

Los componentes predominantes de la esencia son los derivados terpénicos (FIGURA No. 11). Dentro de los que son propios del jengibre y que han sido aislados recientemente se pueden mencionar:  $\alpha$ -pineno, acetato de bornilo,  $\beta$ -bisaboleno, borneol, camfeno,  $\rho$ -cimeno, cineol, citral,  $\alpha$ -curcutneno, cumeno,  $\beta$ -elemeno, farneseno,  $\beta$ -felandreno, geraniol, hidrosesquisabineno, limoneno, linalol, mirceno,  $\beta$ -pineno, sabineno, sesquifelandrol, sesquituyeno,  $\gamma$ -sileneno, zingibereno y zingiberenol. Los sesquiterpenos aislados recientemente e investigados estructuralmente, provienen de mezclas de los esteroisómeros trans y cis de  $\beta$ -eudesmol. (65) (67)

### 1.7.4.2 Compuestos No Volátiles

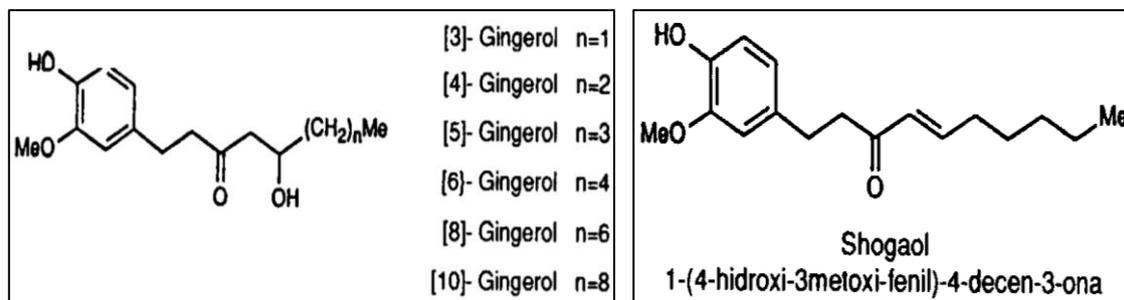


FIGURA No. 12. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS NO VOLÁTILES DEL JENGIBRE (GINGEROL Y SHOGAOL).

Las sustancias picantes son los gingeroles y los shogaoles (FIGURA No. 12). Se trata de fenilalcanonas o fenilalcanonoles no volátiles con cadenas de diferentes longitudes, siendo los más importantes el [6]-gingerol y el [6]-shogaol. El gingerol como principal componente de acción pungente fué descrito hace más de una centuria; el aislamiento y determinaciones estructurales de los gingeroles se establecieron en la década del setenta. Los gingeroles son 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-hidroxi-*l*-alcan-3-ona con configuración S (+), presentando una cadena lateral de longitud variable. (65) (67)

### 1.7.5 USOS Y APLICACIONES

#### 1.7.5.1 Propiedades Medicinales

Según la European Scientific Cooperative On Phytotherapy (ESCOP), el rizoma de jengibre está indicado en la profilaxis de náuseas y vómitos de la cinetosis y como antiemético posquirúrgico en intervenciones quirúrgicas menores. La eficacia en ambas indicaciones ha sido confirmada en ensayos clínicos. La dosis recomendada para adultos y niños mayores de 6 años es de 0,5-2 g/día de droga en polvo, en una sola toma o repartidos en varias tomas. Para prevenir la cinetosis, la administración se efectúa unos 30 minutos antes de iniciar el viaje. (1)

La Comisión E del Ministerio de Sanidad Alemán también acepta el uso del rizoma de jengibre como digestivo en trastornos dispépticos. Se emplea también en caso de gastritis

subácidas e inapetencia. Efectivamente, aumentan las secreciones gástricas y salivares, así como el flujo biliar. (64)

Popularmente, el rizoma de jengibre se ha empleado como antirreumático. Varios extractos de la droga han mostrado actividad antiinflamatoria en diferentes modelos experimentales. El [6]-gingerol y el [6]-shogaol han mostrado actividad analgésica. Existen algunos estudios clínicos que muestran una eficacia moderada del rizoma de jengibre o sus extractos en osteoartritis, artritis reumatoide y dolores musculares. (67)

Como efecto indeseable, el rizoma de jengibre puede causar ardor de estómago. Por otra parte, puede interactuar con la sulfoguanidina, aumentando su absorción.

Otras actividades han sido descritas en ensayos farmacológicos experimentales para los extractos del rizoma de jengibre o para sus componentes. Entre ellas destacan las siguientes actividades: inotropa positiva (gingeroles), antiulcerosa, aumento del tiempo de sueño inducido por barbitúricos y antiagregante plaquetaria. (50) (52)

Esta última actividad, relacionada con una inhibición de la síntesis de tromboxanos por fenilalcanonas y sogaoles, carece de significación clínica a dosis terapéuticas de droga.

### **1. Actividad antioxidante**

El jengibre contiene propiedades antioxidantes que comúnmente usan los químicos antioxidantes. “El jengibre en un sin número de estudios es calificado de poseer un índice inhibidor-radical libre quizá mucho más grande que los preservativos antioxidantes comerciales BHA y BHT.”

Los poderes antioxidantes del jengibre han sido probados en aplicaciones donde el extracto del jengibre fue añadido a productos de carne. “El efecto antioxidante del extracto de jengibre fue más estudiado con filetes de puerco fresco, precocido y congelado. La vida en percha de todos los productos determinada por el valor TBA fue mejorada debido la utilización del extracto de jengibre.” (1)

## CAPÍTULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Área de Producción de la Empresa APICARE CIA. LTDA. y en los siguientes laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- Laboratorio de Bromatología (Facultad de Ciencias).
- Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología (Facultad de Ciencias Pecuarias).
- Laboratorio de Productos Naturales (Facultad de Ciencias).
- Laboratorio de Química Instrumental (Facultad de Ciencias).

#### 2.2 MUESTRAS, MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 2.2.1 MUESTRAS

Las muestras de material alimenticio (miel, propóleo, jengibre, miel propolizada) que se usaron en la presente investigación están detalladas en la TABLA No. 5.

**TABLA No. 5. MUESTRAS DE MATERIAL ALIMENTICIO USADO EN LA INVESTIGACIÓN.**

<b>MUESTRA</b>	<b>RECOLECCIÓN</b>	<b>ORIGEN</b>
<b>Miel</b>	Extracción en un extractor manual del tipo tangencial.	Zonas apícolas de Chambo, Gatazo Zambrano, Nitiluiza, El Socorro en la provincia de Chimborazo.
<b>Propóleo</b>	Raspado con espátula de acero	
<b>Jengibre</b>	Adquirido a nivel comercial.	Santo Domingo
<b>Miel Propolizada</b>	Elaborada en la empresa APICARE CIA. LTDA.	Riobamba

### 2.2.2 MATERIALES

- Frascos de plástico estériles con tapa.
- Paleta recolectora de miel.
- Espátula.
- Cuchillo.
- Picnómetro de 10 mL.
- Varilla de agitación.
- Papel absorbente.
- Papel de Aluminio.
- Papel Filtro.
- Termómetro.
- Olla de acero inoxidable.
- Pizeta.
- Balones aforados de 50, 100 y 250 mL.
- Gradilla.
- Vasos de Precipitación de 50, 100, 150, 250, 500 y 1 000 mL.
- Cronómetro.
- Mortero con pistilo.
- Placas de vidrio.
- Mangueras.
- Vidrio Reloj.
- Frascos de vidrio ámbar.
- Acrodiscos
- Probetas de 10, 50 y 100 mL.
- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 y 25 mL.
- Pera de succión.
- Bureta de 25 y 50 mL.
- Soporte universal.
- Pinzas para bureta.
- Pinzas universales.
- Goteros.
- Matraz de 50, 100, 250 y 500 mL.
- Trípode.
- Cápsulas.
- Tubos de ensayo.
- Pinzas para tubo.
- Micropipetas automáticas de 100 y 500  $\mu$ L.
- Puntas plásticas para pipetas.
- Embudo de vidrio.
- Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico.
- Viales de plástico.
- Jeringuillas.
- Viales de vidrio

### 2.2.3 EQUIPOS

- Balanza Analítica (ADAM Y BOECO).
- Mufla (VULCAN Y SNOL).
- Refractómetro (BAUSCH Y LOMB)
- pH metro (HANNA INSTRUMENT Y
- Estufa (MEMMERT).
- Cámara extractora de gases (MEMMERT).
- Espectrofotómetro (PERKIN

- HANNA WATERPROOF).
- Centrífuga (CLAY ADAMS).
- HPLC (SHIMADZU)
- Cámara fotográfica (SONY).
- Bomba de vacío.

- ELMER LAMDA EZ 201 Y HELYOS  $\beta$ ).
- Ultrasonido (BRANSON)
- Refrigeradora (DUREX).

#### 2.2.4 REACTIVOS

- Acetato de plomo al 10 %
- Acetato de sodio anhidro
- Ácido ascórbico (Vitamina C)
- Ácido gálico
- Acetato de etilo.
- Ácido fosfórico 0,5 M
- Agua destilada
- Alcohol amílico
- Azul de metileno al 0,1 o 0,2 %
- Buffer Acetato de sodio/ácido acético pH 5
- Catecol (Dihidroxibenceno) 0,5 M
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Etanol al 96 % y al 70 %
- Hexokinasa
- Nitrato de plata 0,1 M
- Nitrito de Sodio al 5 %
- Óxido de aluminio
- Polifenoloxidasas (PPO de Pulpa de manzana)
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Solución de almidón al 5 %
- Acetona
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico 0,05 N, 6,34 N y al 10 %
- Ácido fórmico.
- Ácido sulfúrico al 20 % y concentrado.
- Anhídrido acético.
- Buffer de Trietanolamina.
- Carbonato de sodio al 20 %
- Cloroformo
- Estándar de D-Glucosa
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- Hidróxido de sodio 0,05 N, 5 N, 1 M, al 20 y al 5 %
- Tricloruro de Aluminio al 10 %
- Permanganato de potasio 0,1 N
- Quercetina
- Reactivo de Hannus
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Baljet
- Solución de Acetato de zinc
- Solución de Bisulfato de sodio

- Solución de Fehling
- Solución patrón de azúcar invertido
- Yoduro de potasio al 10 %
- Solución de Ferrocianuro de potasio
- Tiosulfato de potasio 0,1 N
- Sílica gel 60 HF<sub>254</sub>

## **2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS**

### **2.3.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA (*Apis mellifera*).**

#### **2.3.1.1 Determinación de las Características Organolépticas**

La determinación de las características organolépticas de la miel se realizó de acuerdo a la norma mexicana NMX – F – 036. (46)

#### **2.3.1.2 Determinación de Densidad Relativa a 27 °C**

La determinación de la densidad relativa a 27 °C de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 632. (39)

#### **2.3.1.3 Determinación de Humedad**

La determinación de la humedad de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 632. (39)

#### **2.3.1.4 Determinación de Azúcares Reductores Totales (NTE INEN 1 633)**

La determinación de los azúcares reductores totales de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 633. (40)

#### **2.3.1.5 Determinación de Sacarosa**

La determinación de la sacarosa de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 633. (40)

#### **2.3.1.6 Determinación de la Relación Glucosa-Fructosa**

La determinación de la relación glucosa-fructosa de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 633. (40)

#### **2.3.1.7 Determinación de la Acidez Total**

La determinación de la acidez total de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 634. (41)

#### **2.3.1.8 Determinación del Contenido de Sólidos Insolubles**

La determinación del contenido de sólidos insolubles de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 635. (42)

#### **2.3.1.9 Determinación de Cenizas**

La determinación de las cenizas de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 636. (43)

#### **2.3.1.10 Determinación del Contenido de Hidroximetilfurfural (HMF)**

La determinación del contenido de hidroximetilfurfural (HMF) de la miel se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 637. (44)

### 2.3.2 DETERMINACION DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL PROPÓLEO

Se aplicó la norma rusa RTS-RSFSR-317-77, que es la más completa en existencia, para la determinación de los siguientes parámetros de calidad del propóleo (58):

#### **2.3.2.1 Características Organolépticas (Sensoriales)**

#### **2.3.2.2 Contenido de Cera**

#### **2.3.2.3 Porcentaje de Impurezas Mecánicas**

#### **2.3.2.4 Compuestos Fenólicos**

#### **2.3.2.5 Índice de Oxidación**

#### **2.3.2.6 Reacción cualitativa de Flavonoides**

#### **2.3.2.7 Índice de Yodo**

### 2.3.3 DETERMINACIÓN DEL VALOR NUTRACÉUTICO DE LA MIEL PROPOLIZADA

#### **2.3.3.1 Determinación de las Características Organolépticas (Sensoriales)**

La determinación de las características organolépticas de la miel propolizada se realizó de acuerdo a la norma mexicana NMX – F – 036. (46)

#### **2.3.3.2 Determinación de la Humedad**

La determinación de la humedad de la miel propolizada se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 632. (39)

#### **2.3.3.3 Determinación de los Azúcares Totales**

La determinación de los azúcares totales de la miel propolizada se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 633. (40)

#### **2.3.3.4 Determinación de la Proteína**

La determinación de la proteína de la miel propolizada se realizó de acuerdo a la Técnica de Macro Kjeldahl en base al Método de Weende. (2)

#### **2.3.3.5 Determinación de las Cenizas**

La determinación de las cenizas se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1 636. (43)

#### **2.3.3.6 Determinación del Extracto Libre no Nitrogenado**

La determinación del extracto libre no nitrogenado se efectuó de acuerdo al método de Weende. (2)

#### **2.3.3.7 Cálculo del Valor Calórico**

La determinación del valor calórico se efectuó de acuerdo al método de Weende. (2)

#### **2.3.3.8 Determinación de vitamina C (Método de HPLC)**

### **1. Fundamento**

Para este ensayo se utilizó el método: Cromatografía líquido de alta resolución (HPLC), que consiste en una cromatografía de participación en fase reversa, fase móvil polar con la detección en el campo ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm. (15)

### **2. Condiciones: 5 µm 120 A° (4.6 \*150 mm)**

- Columna DIONEX C18
- Flujo 1mL/min
- Detector UV/visible
- Fase móvil H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 M

### 3. Procedimiento

#### a. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE VITAMINA C

- Se pesó exactamente 0.0025 g de ácido ascórbico estándar.
- Aforamos a 50 mL con ácido fosfórico 0.05 M grado HPLC (Solución Estándar de Vitamina C 50 ppm).
- Tomamos una alícuota de 1 mL y aforar a 10 mL (solución de trabajo de 5 ppm).
- Filtramos el sobrenadante con acrodiscos de membranas.
- Colocamos en un vial de vidrio para su inyección.

#### b. EXTRACCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LA MIEL Y LA MIEL PROPOLIZADA

- Pesamos exactamente 0.5 g de la muestra.
- Aforamos a 10 mL con ácido fosfórico 0.05 M grado HPLC.
- Colocamos por 10 minutos en el ultrasonido.
- Filtramos mediante papel filtro.
- Filtramos el sobrenadante con acrodiscos de membranas.
- Colocamos en vial de vidrio para su inyección.

### 4. Cálculos

$$\text{Vit. C (mg/100 g)} = \frac{\text{Am} \times \text{Cst} \times \text{Vaf}}{\text{Ast} \times \text{M} \times 10}$$

Dónde:

Am = Área de la Muestra.

Ast = Área del Estándar.

Cst = Concentración del Estándar.

Vaf = Volumen aforado de la muestra (ml).

M = Peso de la muestra (gramos).

### 2.3.4 CONTROL DE CALIDAD DEL PROPÓLEO Y EL JENGIBRE (*Zingiber officinale*) COMO DROGAS SECAS

Se aplicó la norma ramal NRSP 309 del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP, 1992) para realizar el control de calidad del propóleo y el jengibre como drogas secas en base a los siguientes parámetros (35):

#### **2.3.4.1 Determinación de Humedad**

#### **2.3.4.2 Determinación de Cenizas Totales (Método de Incineración en Mufla)**

#### **2.3.4.3 Determinación de Cenizas Solubles en Agua**

#### **2.3.4.4 Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico**

### 2.3.5 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

- Para la elaboración de los extractos se utilizó el proceso de maceración de las muestras. Se procedió a pesar 10 g de cada muestra y se añadieron 100 mL de etanol al 70 % (extracto al 10 % en p/v).
- Estos extractos se dejaron en reposo en ausencia de luz y con agitación diaria por el lapso de 15 días en el caso del propóleo, y 48 horas en el caso de la miel, el jengibre y la miel propolizada.
- Se filtraron los extractos y se guardaron en frascos ámbar para protegerlos de la acción de la luz.

### 2.3.6 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Se aplicó la norma ramal NRSP 312 del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP, 1992) para realizar el control de calidad de los extractos etanólicos en base a los siguientes parámetros (37):

#### **2.3.6.1 Determinación de los Requisitos Organolépticos de los extractos etanólicos**

#### **2.3.6.2 Determinación del pH**

#### **2.3.6.3 Determinación del Índice de Refracción**

### 2.3.6.4 Determinación de la Densidad Relativa

### 2.3.6.5 Determinación de los Sólidos Totales

### 2.3.6.6 Tamizaje Fitoquímico

#### 1. Fundamento

El estudio fitoquímico tiene como finalidad aislar e identificar los diferentes tipo de compuestos que biosintetiza la planta (los que podrán tener o no alguna actividad o toxicidad). (49)

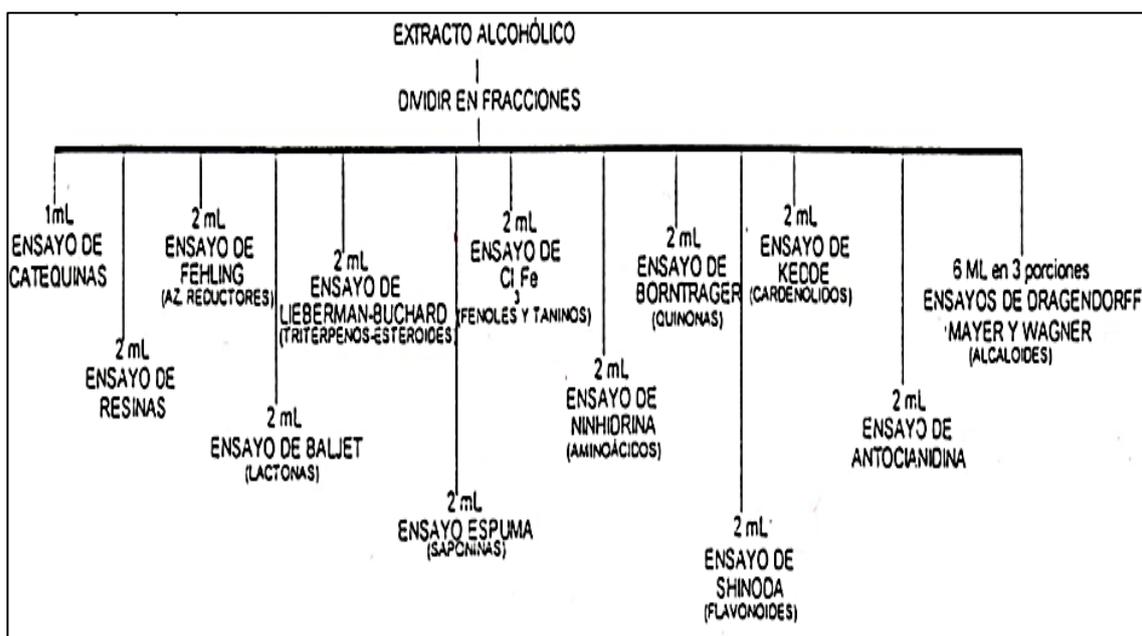


FIGURA No. 14. ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO. FUENTE: NORMAS RAMALES. DROGAS CRUDAS Y EXTRACTOS Y TINTURAS. NRSP 309, 311 Y 312. MINSAP 1992.

#### 2. Procedimiento

- Se aplicaron solo las pruebas destinadas a la determinación de metabolitos presentes en el extracto alcohólico en base a las técnicas descritas en la TABLA No. 6.

**TABLA No. 6. TÉCNICAS PARA EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO.**

<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Resultado</b>
Dragendorff	Alcaloides.	Si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, éste debe evaporarse, en un baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo.	Si hay opalescencia se considera (+) turbidez definida (++) , precipitado (+++).
Wagner y Mayer		Se parte de igual manera en los casos anteriores de la solución acida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo.	
Baljet	Lactonas.	Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL de reactivo.	La aparición de una coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.
Borntrager	Quinonas.	Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1mL de cloroformo. Se adiciona 1mL hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.	Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado o rojo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides.	Se adiciona 1mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.	1. Rosado 2. Verde intenso – visible 3. Verde oscuro – negro
Catequinas	Catequinas	Tome una gota de la fracción alcohólica, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio.	Verde carmelita a la luz UV.
Fehling	Azúcares Reductores.	Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1–2 mL de agua. Se adicionan 2mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5–10 min la mezcla.	Solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos y/o taninos.	Si el extracto es acuoso se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica a una alícuota del extracto alcohólico se adiciona el reactivo.	Coloración rojo – vino, verde intenso, azul.
Shinoda	Flavonoides.	Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.	Cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.
Antocianidinas	Estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides.	Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases.	La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica.
Resinas	Resinas.	Adicione a 2mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada.	Precipitado.
Espuma	Saponinas.	Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5–10 min.	Si aparece espuma en la superficie del líquido.

### 2.3.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

#### 2.3.7.1 Análisis Cromatográfico del marcador químico Flavonoides Totales expresados como porcentaje de Quercetina (TLC).

##### 1. Fundamento

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte con 2 fases, la fase móvil es líquida y la fase estacionaria en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (48)

## 2. Procedimiento

- Se preparó la mezcla de sílica gel en un vaso de precipitación.
- Esparcimos la sílica gel en una placa de vidrio limpia y seca, procurando una distribución homogénea por toda la superficie de la placa.
- Colocamos la placa de sílica en la estufa por el lapso de 1 hora para su activación.
- Retiramos las placas de la estufa y esperamos a que se enfríen.
- Se preparó el sistema de solventes para el corrido en la siguiente relación: cloroformo - acetona - ácido fórmico (75:16,5:8,5 en v/v) en relación a 30 mL, y se colocó en una cuba de vidrio.
- Las gotas de los extractos se colocaron sobre la placa a 1 cm de distancia del borde inferior con la ayuda de capilares, esperando que las manchas se sequen se repite el procedimiento por 3 a 4 veces, evitando que se mezclen.
- Se introdujo la placa dentro de la cuba y se dejó correr el sistema de solventes hasta que alcancen las  $\frac{3}{4}$  partes de la placa.
- Se retira la placa de la cuba y esperamos a que se sequen por 5 minutos.
- Preparamos el equipo para el revelado de las placas, encendemos la bomba y la conectamos al aspersor con la salida adecuada de aire para que el revelador sea expulsado en la cantidad suficiente.
- Colocamos la placa en la cámara extractora de gases y roseamos la vainillina al 1 % a una distancia adecuada evitando que se dañe la placa y esperamos hasta que se seque.
- Roseamos el ácido sulfúrico al 10 % a una distancia adecuada y esperamos a que se seque la placa.
- Colocamos la placa en el reverbero a temperatura baja y esperamos a que las manchas resalten por acción del calor.
- Procedemos a medir la distancia de recorrido del sistema de solventes y de cada mancha desde el centro de la misma hasta el origen de la misma.

## 3. Cálculos

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por los solventes}}$$

### 2.3.7.2 Cuantificación de Flavonoides Totales (Método del AlCl<sub>3</sub>)

#### 1. Fundamento

El AlCl<sub>3</sub> anhidro forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados en medio básico (FIGURA No. 14). Estos quelatos presentan una coloración rosada indicando la presencia de flavonoides. Los valores de flavonoides totales son expresados en valores de mg del flavonoide empleado como estándar equivalente por gramo de muestra. (25)

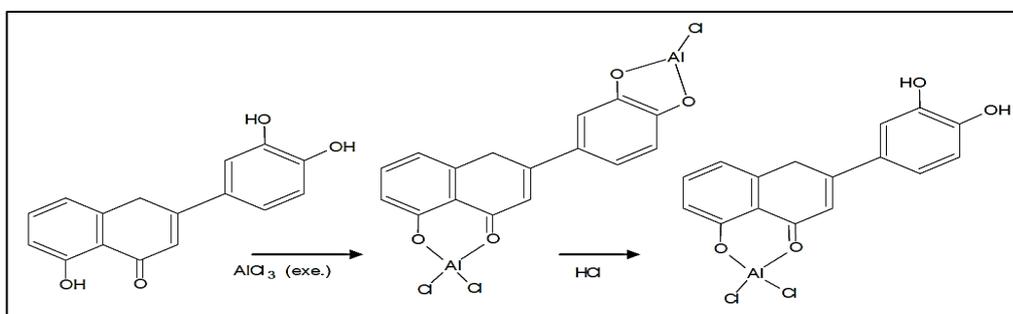


FIGURA No. 14. REACCIÓN DE QUELACIÓN DEL IÓN Al<sup>3+</sup> CON LOS FLAVONOIDES. FUENTE: MARKHAM, 1968.

#### 2. Procedimiento

- Se realizó el ensayo en los extractos siguiendo el siguiente esquema:

TABLA No. 7. ESQUEMA DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES POR EL MÉTODO DEL AlCl<sub>3</sub>.

Reactivos		Volumen (μL)
Muestras (Extractos)	Miel	500
	Propóleo	
	Jengibre	
	Miel Propolizada	
Agua		400
NaNO <sub>2</sub> al 5 %		38
<b>Reposo cerrado a Temperatura ambiente por 5 minutos.</b>		
AlCl <sub>3</sub> al 10 %		38
<b>Reposo cerrado a Temperatura ambiente por 6 minutos.</b>		
NaOH 1 M		250
Agua		24

- La absorbancia de la reacción fue medida a una longitud de onda de 510 nm.

### 3. Cálculos

La concentración de flavonoides totales fue establecida mediante una curva de calibración de rutina a concentraciones que fueron desde 20 a 100 ppm, aplicando el mismo esquema de preparación de las muestras. Se determinó la ecuación de la recta para la curva de calibración en base al estándar de rutina preparado a diferentes concentraciones medidas a 510 nm y obteniendo la siguiente ecuación para la recta:

**TABLA No. 8. ECUACIÓN DE LA RECTA OBTENIDA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE RUTINA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES.**

Concentración de Rutina (ppm)	Ecuación de la Recta	R <sup>2</sup>	R
20 - 100	$y = 0,0017x - 0,3876$	0,994	0,9969

#### 2.3.7.3 Cuantificación de Compuestos Fenólicos (Micrométodo de Folin-Ciocalteu)

##### 1. Fundamento

Los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y el ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que se reduce por oxidación de los fenoles, originando óxidos de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes, y posee una absorción máxima a 765 nm. (25)

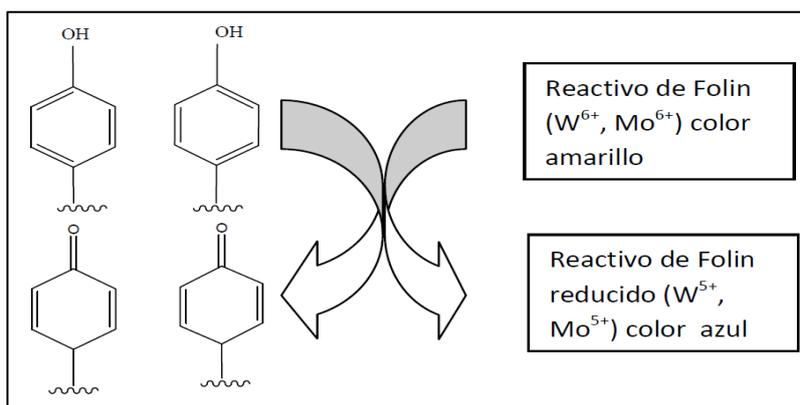


FIGURA No. 15. REACCIÓN DE FOLIN-CIOCALTEAU.

## 2. Procedimiento

- Se realizó el ensayo en los extractos siguiendo el siguiente esquema:

TABLA No. 9. ESQUEMA DE REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR EL MICROMÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.

Muestras	Extracto	Agua	Folin-Ciocalteu	Carbonato de Sodio al 20 %
Volumen (µL)				
Miel	100			
Propóleo	100	5 000	500	2 000
Jengibre	100			
Miel Propolizada	100			

- Se aforó a 10 mL con agua destilada y se dejó en reposo por 30 minutos, en oscuridad.
- Se realizó la lectura de la absorbancia a 765 nm.

## 3. Cálculos

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó mediante la elaboración de 2 curvas de calibración usando el ácido gálico como estándar de referencia, se prepararon soluciones en concentraciones de 20, 60, 100, 140, 200, 500, 800, 1 100 y 1 400, 1 700 y 2 000 ppm y se aplicó el mismo esquema que en la preparación de las muestras.

Se determinó la ecuación de la recta para la curva de calibración en base al estándar de ácido gálico preparado a diferentes concentraciones medidas a 765 nm y obteniendo las siguientes ecuaciones para la recta:

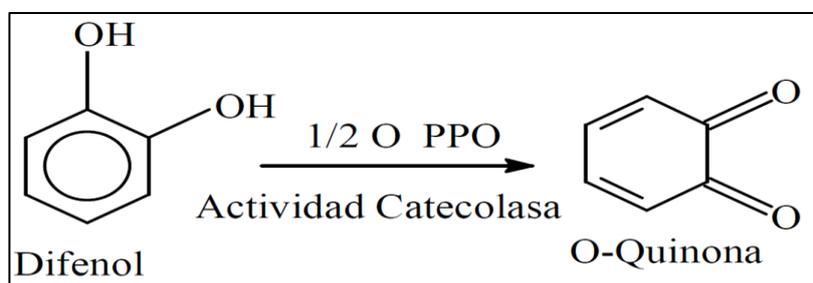
**TABLA No. 10. ECUACIONES DE LA RECTA OBTENIDAS PARA LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.**

Concentración de ácido Gálico (ppm)	Ecuación de la Recta	R <sup>2</sup>	R
20 - 140	$y = 0,001\ 2x - 0,004$	0,998 3	0,999 1
500 - 2 000	$y = 0,000\ 8x + 0,192\ 1$	0,998 2	0,999 1

### 2.3.7.4 Ensayo de la Capacidad Antioxidante según el Método Enzimático de Inhibición de la Polifenoloxidas

#### 1. Fundamento

Los métodos disponibles para determinar la susceptibilidad de pardeamiento son la espectrometría de absorción o métodos de reflectancia. Las técnicas de absorción involucran la medida espectrofotométrica sobre soluciones obtenidas después de separar los tejidos y remover los sólidos. Tales medidas estiman los pigmentos solubles y suelen estar presentes cerca de 400 nm, correspondientes a la absorción máxima del catecol. La medida de los pigmentos polimerizados y solubles unidos a membranas puede ser evaluada por medidas de reflectancia sobre la fracción insoluble. (21)



**FIGURA No. 16. REACCIÓN DE LA POLIFENOLOXIDAS (PPO).**

## 2. Procedimiento

### a. BÚFFER

- Se preparó el búffer de acetato de sodio/ácido acético glacial a un pH 7, las 2 soluciones de acetato de sodio y ácido acético se prepararon por separado a una concentración de 0,2 M.
- *ÁCIDO ACÉTICO 0,2 M* (Solución A): Se aforó 11,55 mL de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) hasta 1 L con agua destilada.
- *ACETATO DE SODIO 0,2 M* (Solución B): Se diluyó 16,41 g de acetato de sodio anhidro ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) en 1 L de agua destilada.
- Se mezclaron las 2 soluciones y se aforaron a 100 mL con agua destilada para obtener el pH de 7 en base al siguiente esquema:

TABLA No. 11. ESQUEMA PARA LA ELABORACIÓN DEL BÚFFER ACETATO DE SODIO/ÁCIDO ACÉTICO A pH 7.

mL Solución A	mL Solución B	pH
1	175	7

- El búffer se mantuvo en refrigeración a una temperatura de  $-6\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### b. SUSTRATO

- Se usó como sustrato una solución de catecol 0,5 M preparado en el búffer, pesando exactamente 0,275 2 g de catecol ( $\text{PM} = 110,06\text{ g/mol}$ ).
- Se diluyó en 5 mL de búffer acetato de sodio/ácido acético, cantidad que es suficiente para los ensayos.
- Cabe destacar que el catecol se preparó para cada análisis ya que se degrada fácilmente por factores ambientales tales como la luz y el oxígeno del aire.

### c. EXTRACTO ENZIMÁTICO

- Se homogenizó 10 g de pulpa de manzana (variedad chilena [*Red delicious*]), mantenida en refrigeración de 4 a 14 °C en 20 mL de búffer acetato de sodio/ácido acético frío, dentro de un mortero colocado en baño de hielo.
- Se filtró en un embudo frío con algodón y se recolectó en tubos de ensayo fríos que se taparon y se congelaron a -6 °C.
- Se guardó el extracto enzimático hasta su utilización.

### d. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOLOXIDASA

- En la celda limpia y seca del espectrofotómetro se agregaron 2 400 µL del búffer preparado.
- Se añadió 300 µL de la solución de catecol.
- Añadimos 300 µL del extracto enzimático descongelado en baño de hielo, mezclamos e inmediatamente introducimos en el espectro y medimos el aumento en la absorbancia a 420 nm por 4 minutos en intervalos de 30 segundos.
- Este proceso se repitió al minuto, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 2 horas.
- Calculamos la actividad de la enzima con base a la pendiente de la proporción lineal de la curva Absorbancia vs Tiempo.

### e. MUESTRAS A ENSAYAR

- Las muestras se prepararon a 3 diferentes concentraciones 10 000 ppm, 1 000 ppm y 100 ppm, de modo que al ser agregadas las otras soluciones las concentraciones finales fueron de 1 000, 100 y 10 ppm.
- Se pesó 0,05 g de extracto (muestra) en un balón de aforo de 10 mL limpio y seco y se diluyó con 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), dando como resultado una solución de concentración a 10 000 ppm.
- Se realizaron diluciones al décimo para obtener las soluciones a 1 000 y 100 ppm con el búffer.

f. ANTIOXIDANTE ESTÁNDAR (VITAMINA C)

- Se usó la vitamina C como agente antioxidante positivo preparada a las mismas concentraciones que las muestras a ensayar (10 000, 1 000 y 100 ppm).
- Se diluyó 0,05 g de vitamina C en 5 mL de búffer obteniendo la solución a 10 000 ppm, se realizaron diluciones al décimo para obtener las otras concentraciones a 1 000 y 100 ppm.

g. MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

- Se aplicó el siguiente esquema para medir la capacidad antioxidante:

**TABLA No. 12. ESQUEMA PARA EL ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.**

<b>Muestras</b>	<b>Blanco</b>	<b>1 000 ppm</b>	<b>100 ppm</b>	<b>10 ppm</b>	<b>Vitamina C</b>
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (mL)</b>				
<b>Búffer</b>	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
<b>Sustrato</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Muestra</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3*
<b>Extracto Enzimático</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

\*Se debe usar 0,3 mL de DMSO en el Estándar de Vitamina C.

- Se encendió el espectrofotómetro UV con el búffer acetato.
- La adición del búffer, el sustrato, la muestra y las enzimas se realizó en un balón de 10 mL, la reacción se dio inicio mediante la adición del extracto enzimático y se comenzó a leer inmediatamente la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.
- Se anotó las lecturas de la absorbancia cada 30 segundos desde el comienzo del ensayo hasta que hayan transcurrido 120 segundos obteniéndose 4 lecturas de absorbancia.
- Se leyó primero el blanco, luego las diluciones de las muestras desde la menor a la mayor concentración, finalmente la vitamina C como testigo positivo.
- Se repitió este procedimiento por 2 ocasiones en cada muestra en ensayo.
- Se consideró como inhibición nula la absorbancia correspondiente al blanco, en el que las enzimas actuaron libremente sobre el catecol. Asimismo, se tomó como inhibición absoluta la que presenta la cubeta con el antioxidante de poder previamente probado.

- El porcentaje de inhibición se determinó relacionando la lectura del blanco con la lectura de cada uno de los extractos.

### 3. Cálculos

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = \frac{\Delta A_{420 \text{ nm BLANCO}} - \Delta A_{420 \text{ nm MUESTRA}}}{\Delta A_{420 \text{ nm BLANCO}}} \times 100$$

Siendo:

$\Delta A_{420 \text{ nm}}$  = Diferencia entre la absorbancia final e inicial a 420 nm.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación mediante el empleo de métodos analíticos cualitativos y cuantitativos se realizó la determinación del potencial nutracéutico y la actividad antioxidante de la Miel Propolizada elaborada en la empresa APICARE CIA. LTDA., de la ciudad de Riobamba, previamente se hizo el control de calidad de la miel, propóleo y jengibre como materia prima, los resultados son el promedio de tres mediciones para obtener un análisis estadístico sustentable, relacionando parámetros entre la materia prima y el producto final y garantizar la validación de los resultados.

#### 3.1 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA (*Apis mellifera*)

##### 3.1.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS (NORMA MEXICANA NMX – F – 036)

Para esta determinación se usó la miel usada en la planta de producción de la empresa APICARE CIA. LTDA., proveniente de zonas apícolas ubicadas en Chambo, Gatazo Zambrano, Nitiluiza, Palacio Real y el Socorro (Provincia de Chimborazo), y cuyos resultados están indicados a continuación:

CUADRO. No. 1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DETERMINADAS PARA LA MIEL DE ABEJA (*Apis mellifera*) EN BASE A LA NORMA MEXICANA NMX-F-036. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. MAYO DEL 2013.

Parámetro	Resultado
Color	Ámbar
Olor	Aromático característico a Eucalipto
Sabor	Dulce característico
Materia Extraña Objetable	Sin presencia de materia extraña

En base la información representada en el CUADRO No. 1, la miel usada en la empresa APICARE CIA, LTDA., cumple con los requisitos organolépticos establecidos en la norma mexicana NMX – F – 036, presentó un color ámbar, un olor aromático y característico a Eucalipto lo que se debe a que en las zonas apícolas donde se recolectó dicha miel, éste árbol es el más representativo dentro de la Flora de estas zonas, su sabor fue dulce característico y sin presencia de materia extraña objetable como restos de cera, polen o partes de abejas.

### 3.1.2 ESPECIFICACIONES FÍSICO – QUÍMICAS (NORMA NTE INEN 1 572)

En base a la norma NTE INEN 1 572 que establece los requisitos que debe cumplir la miel de Abeja, la misma se encuentra dentro de la Clase I en la clasificación de las mieles por su utilización que es la correspondiente a mieles aptas para el consumo humano directo. En base a esta consideración en el análisis se obtuvieron los siguientes resultados:

**CUADRO No. 2. ESPECIFICACIONES FÍSICO – QUÍMICAS DETERMINADAS EN LA MIEL DE ABEJA (*Apis mellifera*) EN BASE A LA NORMA NTE INEN 1 572. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

Parámetro	Resultado	Especificación (NTE INEN 1 572)		Método de Ensayo
		Mínimo	Máximo	
Densidad Relativa a 25 °C (g/mL)	1,41 ± 0,003	1,39	-	NTE INEN 1 632
Azúcares Reductores Totales (% en masa)	72,74 ± 1,32	65	-	NTE INEN 1 633
Sacarosa (% en masa)	6,26 ± 1,32	-	5	NTE INEN 1 633
Relación Fructosa-Glucosa	1,73 ± 0,09	1,0	-	NTE INEN 1 633
Humedad (% en masa)	18,90 ± 0,10	-	20	NTE INEN 1 632
Acidez (Ácido Fórmico meq/1 000 g)	0,13 ± 0,002	-	40	NTE INEN 1 634
Sólidos Insolubles (% en masa)	0,04 ± 0,00	-	0,2	NTE INEN 1 635
Cenizas (% en masa)	0,12 ± 0,03	-	0,5	NTE INEN 1 636
Hidroximetilfurfural (HMF mg/Kg)	8,27 ± 0,01	-	40	NTE INEN 1 637

N = 3; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES REPETICIONES.  
p-Valor < 0,05.

En el CUADRO No. 2 se indican las especificaciones físico – químicas que se determinaron para la miel de abeja comercializada por la empresa APICARE CIA, LTDA., en base a la norma técnica Ecuatoriana INEN 1 572.

La densidad relativa a 25 °C que se determinó para la miel fue de 1,41 g/mL siendo mayor al mínimo especificado en la norma INEN que es de 1,39 g/mL, pero se encuentra por debajo de la establecida por la NHB (National Honey Board, 2010) de 1,42 g/mL, y es menor a la determinada por Díaz, C. (2003) de 1,42 g/mL, además este parámetro presentó una correlación positiva con el contenido de azúcares reductores totales cuyo alto contenido influye en el incremento proporcional de la densidad.

El contenido de azúcares reductores totales en % de masa fue de 72,74 %, mayor al establecido por la norma INEN de 65 % y al determinado por Avilés, H. y Matos, A. (2009) de 64,67 %, pero próximo al valor encontrado por Zandalema, E. (2008) de 71,02 % y al de Cabello, T. (2006-2007) de 72,2 %, pero encontrándose por debajo del valor establecido por la National Honey Board (2010) de 82,4 %, el valor de los azúcares reductores totales estará relacionado con la floración presente en la zona apícola y la mayor presencia de árboles frutales en las mismas.

El porcentaje de sacarosa encontrado fue de 6,26 %, valor mayor a la especificación de la norma INEN y al Codex Alimentarius de máximo 5 % y al encontrado por Zandalema, E. (2008) de 3,55 %, este incremento se puede deber a que la alimentación que se suministra a las abejas en época de floraciones bajas, está constituido por un néctar de sacarosa, la misma que puede pasar a la miel en el momento de su elaboración.

La relación fructosa-glucosa fue de 1,73, mayor al mínimo de 1 establecido por la norma INEN y al valor determinado por Zandalema, E. (2008) de 1,35 y Soria et al. (2004) con valores entre 1,13 a 1,36. Este parámetro es usado para predecir la tendencia de la miel a la cristalización y que se manifiesta en mieles con valores mayores a 1,30 (Bosch et al., 1932) y de acuerdo a Crane (1985), mieles con valores de relación fructosa-glucosa superiores a 2 no se cristalizan.

La humedad determinada fue de 18,90 % que es menor al máximo establecido por la norma INEN de 20 % y similar al establecido por la National Honey Board (2010) de 18 % en equivalencia con una densidad de 1,41 g/mL que si presento nuestra miel que superó el valor de 17,10 % considerado por muchos autores como límite para mieles de buena calidad (Belitz y Grosch, 1997) y que bajo este valor se previene toda fermentación (Sanz et al., 1995). Este valor fue superior a los encontrados por Avilés, H. y Matos, A. (2009) de 13,50 a 14,53 % en mieles peruanas, al de Noia, M. A. et al. (2009) de 17,16 % en mieles de la Pampa argentina y ligeramente mayor al rango de 17,53 a 18,62 % encontrado por Zandalema, E. (2008) en mieles de Mozambique. La humedad es un factor que influye en la calidad de la miel y en la determinación de su vida útil (Bogdanov et al., 2004).

La acidez es un factor importante en la determinación de la calidad de la miel y determinara procesos de fermentación de la misma (Cornejo, 1988). La acidez determinada y expresada en meq de ácido fórmico fue de 0,13 meq/Kg, menor al máximo establecido por la norma INEN de 0,18 meq/Kg y al 0,2 establecido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile, Díaz, C. (2003) determinó en mieles chilenas valores entre 0,19 y 0,91 meq/Kg, Avilés, H. y Matos, A. (2009) determinaron valores entre 0,06 y 0,07 meq/Kg para mieles peruanas, Iurlina y Fritz (2003) encontraron valores entre 0,08 y 0,09 meq/Kg. Según Crane (1990) la acidez depende de las condiciones edafoclimáticas y el contenido de minerales de la miel.

El porcentaje de sólidos insolubles en agua determinado en la miel fue de 0,04 %, notablemente menor al máximo de 0,2 % establecido por la norma INEN y al rango determinado por Zandalema, E. (2008) entre 0,073 a 0,079 % en mieles africanas. Díaz, C. (2003) determinó valores entre 0,016 a 0,092 %.

El porcentaje de cenizas determinado fue de 0,12 %, por debajo del máximo establecido por la norma INEN de 0,5 %. Gómez (1995) establece que en la mayoría de las mieles de color ámbar, ni muy claras ni muy oscuras, el contenido de cenizas se encuentra alrededor de 0,3 %, lo que se apega al resultado encontrado en esta investigación. Díaz, C. (2003) determinó valores de cenizas entre 0,19 y 0,41 %. Avilés, H. y Matos, A.

(2009) encontraron valores de cenizas entre 0,93 y 0,96 % y Zandalema, E. (2008) determino valores entre 0,34 y 0,64 %. Bogdanov et al. (1999) dice que el contenido de cenizas es un criterio de calidad útil para la evaluación del origen botánico de las mieles.

El hidroximetilfurfural es un producto generado por la deshidratación de los azúcares en especial de la fructosa, además es un buen indicador de la calidad y frescura de la miel (Montenegro et al., 2000), permite saber si las mieles han sido sometidas a un proceso de industrialización con calor excesivo provocando la pérdida de elementos nutritivos (Avallone et al., 1999). El valor determinado para nuestra miel fue de 8,27 mg/Kg, muy por debajo del máximo de 40 mg/Kg establecido en la norma INEN, con lo que podemos establecer que se trata de una miel fresca como establece Cornejo (1988) dando un promedio de 10 mg/Kg en este tipo de mieles y que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico. Este valor se encuentra dentro del rango determinado por Díaz, C. (2003) entre 2,83 a 9,96 mg/Kg, y menor a los valores encontrados por Zandalema, E. (2008) entre 10,28 y 18,37 mg/Kg.

### **3.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL PROPÓLEO**

#### **3.2.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS (NORMA RUSA RTS – RSFSR – 317 – 77)**

Para este análisis se usó el propóleo usado en la planta de producción de la empresa APICARE CIA. LTDA., proveniente de las zonas apícolas en Chambo, Gatazo Zambrano, Nitiluiza, Palacio Real y el Socorro (Provincia de Chimborazo), y cuyos resultados están indicados a continuación:

**CUADRO No. 3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DETERMINADAS PARA EL PROPÓLEO BRUTO EN BASE A LA NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Aspecto Externo	Pelotas
Color	Pardo oscuro
Olor	Aromático característico
Sabor	Amargo fuerte
Estructura	Espesa, sólida con deformaciones

De acuerdo a la información presentada en el CUADRO No. 3, el propóleo utilizado en el empresa APICARE CIA. LTDA., cumple con los requisitos organolépticos establecidos por la norma rusa RTS-RSFSR-317-77, ya que presentó un aspecto externo en forma de pelotas, un color pardo oscuro, un olor aromático característico a las resinas de los árboles presentes en las zonas de recolección, un sabor amargo y fuerte, y una estructura espesa con ligeras deformaciones en su contorno, estos parámetros son similares a los reportados por Lozina, L. et al. (2009) en propóleos argentinos y Alvarez Sissy (2012) en propóleos del norte peruano.

### 3.2.2 ESPECIFICACIONES FÍSICO – QUÍMICAS (NORMA RUSA RTS – RSFSR – 317 – 77)

Los resultados obtenidos para las especificaciones físicas y químicas del Propóleo en base a la norma rusa RTS-RSFSR-317-77 se indican en el siguiente cuadro:

**CUADRO No. 4. ESPECIFICACIONES FÍSICO – QUÍMICAS DETERMINADAS EN EL PROPÓLEO EN BASE A LA NORMA RUSA RTS-RSFSR-317-77. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

Parámetro	Resultado	Especificación		
		Rusia	Brasil**	Japón**
Cera (%)	19,02 ± 1,55	≤ 30 %	≤ 25 %	≤ 40 %
Impurezas mecánicas (%)	49,39 ± 0,86	≤ 20 %	≤ 40 %	≤ 30 %
Compuestos fenólicos (%)	64,62 ± 0,19	≥ 30 %	≥ 5 %	≥ 5 %
Índice de oxidación (s)	17,50 ± 0,50	≤ 22 s	≤ 22 s	-
Reacción cualitativa para flavonoides	Positivo	Positivo	Positivo	-
Índice de Yodo	54,76 ± 4,45	≥ 35 %	-	-

N = 3; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.

p-Valor < 0,05.

\*\* FUENTE: VÁZQUEZ, J. VALENCIA., 2010.

En el CUADRO No. 4 se evidencian los resultados obtenidos para las especificaciones físico – químicas del propóleo con la aplicación de la norma rusa RTS – RSFSR – 317 – 77.

El porcentaje de cera determinando para el propóleo fue de 19,02 %, menor al máximo especificado en la norma rusa RTS de 30 % y en la norma Brasileña de 25 %,

cumpliendo con las dos normas, Este valor es menor al determinado por Martínez, J. et al. (2011) de 59,31 % en propóleos obtenidos por raspado y de 48,27 % en los obtenidos por mallas en Colombia, y al encontrado por López, J. y Ubillús, M. (2004) quienes determinaron un valor de 29,42 % en propóleos del Perú. Rangos de porcentaje de cera donde se incluye nuestro valor fueron los establecidos por Viloría, J.D. et al. (2012) con valores entre 2,00 y 33,60 %, Rodríguez, Y. et al. (2012) con valores entre 1,77 a 6,07 % en propóleos colombianos y Lozina, L. et al. (2009) con valores entre 2,80 y 30,60 % en propóleos argentinos. A pesar de ello un alto contenido de ceras es desfavorable porque en esta fracción no se encuentran presentes los compuestos fenólicos, que son los metabolitos secundarios a los cuales se asocia la actividad biológica (Martínez, J. et al. 2012), los valores altos de contenido de cera se relacionan con el trabajo que realiza el apicultor al seleccionar inadecuadamente el propóleos. (Orantes Bermejo, 2006) y Maidana, 1999), o debido a que las abejas durante la propolización mezclan las resinas con ceras para llenar los orificios de los marcos en la colmena o en las trampas tipo malla.

La presencia de impurezas mecánicas (IM) es una de las características físicas visibles y no deseadas en el propóleo ya que un contenido elevado disminuye la calidad del propóleo crudo y deprecian su valor biológico. El contenido de IM determinado para el propóleo fue de 49,39 % por encima del máximo especificado por la norma rusa RTS de 20 % y de la norma Brasileña del 40 %. Valores inferiores de 14,37 %; 18,60 % y 8,90 – 39,80 % fueron determinados por Martínez, J. et al. (2011); López, J. y Ubillús, M. (2004); y Lozina, L. et al. (2009) respectivamente en propóleos colombianos, peruanos y argentinos. Valores mayores de 45,14 – 94,10 % y 55,57 – 77,93 % se encontraron en propóleos de Colombia por Viloría, J.D. et al. (2012) y Rodríguez, Y. et al. (2012). El alto contenido de IM se puede relacionar con el contenido de ceras en forma inversa porque las abejas propolizadoras aumentan el contenido de impurezas ya que al depositar las resinas en las mallas, incluyen restos de plantas, animales u otros residuos que se adhieren en el proceso de sellado de las mallas para cosechar propóleo (Yoong, A. 2004), disminuyendo el de ceras posiblemente para dar firmeza a los componentes estructurales de la colmena y utilizar la cera para la construcción de las celdillas del panal, esto coincide con lo informado por Asís (1989) y Maidana (1997).

Los compuestos fenólicos (CF) se relacionan con varias de las actividades biológicas del propóleo de ahí la importancia de su cuantificación, se determinó un porcentaje de 64,62 % de CF en el propóleo que supera ampliamente al mínimo especificado en la norma Rusa RTS de 30 % y de la norma brasileña de 5 %, es mayor al porcentaje encontrado por López, J. y Ubillús, M. (2004) de 31,42 % y muy superiores al 17,73 % reportado por Bonhevi et al. (2000) para propóleos de Brasil, Uruguay y China pudiendo establecer que el propóleo ecuatoriano es de excelente calidad.

El índice de oxidación (IO) es un indicativo de la cantidad de compuestos oxidables; a mayor concentración de este tipo de compuestos menor tiempo de decoloración y por lo tanto mejor calidad del producto en aplicaciones como antioxidante o antiinflamatorio (Martínez, J. et al., 2011). El IO determinado para el propóleo fue de 17,50 s que está por debajo de la especificación de 22 s establecidos en la norma rusa RTS y la norma brasileña. Por debajo del tiempo de 21,08 s reportado por López, J. y Ubillús, M. (2004) e Igual al encontrado por Martínez, J. et al. (2011), dentro del rango establecido por Lozina, L. et al. (2009) de 2 a 110 s para propóleos de Argentina. El valor determinado está en directa relación al alto contenido de compuestos fenólicos y la presencia de flavonoides.

La presencia de flavonoides se determinó mediante la prueba de coloración en presencia de acetato de plomo e hidróxido de sodio siendo positiva en ambos casos similar a lo reportado por López, J. y Ubillús, M. (2004) en propóleo del Perú.

El índice de yodo (IY) es un parámetro que en el propóleo va estar relacionado con el número de dobles enlaces presentes en los compuestos fenólicos relacionándose directamente con este parámetro, el IY determinado para el propóleo fue de 54,76 % que es mayor al 35 % especificado en la norma rusa RTS y al valor reportado por López, J. y Ubillús, M. (2004) de 34,64 %. El incremento del IY se debe al alto contenido de compuestos fenólicos los mismos que están en relación con las plantas ricas en estos compuestos principalmente resinosas de las cuales las abejas extraen las resinas.

### 3.3 DETERMINACIÓN DEL VALOR NUTRACÉUTICO DE LA MIEL PROPOLIZADA

#### 3.3.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Las características organolépticas que se determinaron en la miel propolizada se compararon con las presentadas por la miel común y se indican a continuación:

**CUADRO No. 5. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DETERMINADAS PARA LA MIEL PROPOLIZADA. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Color	Ámbar oscuro
Olor	Aromático, característico y penetrante
Sabor	Dulce, picante
Aspecto	Semilíquido, homogéneo, sin precipitados

En base al CUADRO No. 5 la miel propolizada presentó características sensoriales que variaron al compararlas con las de miel común, su color fue más oscuro que el de la miel y su olor más penetrante y ligeramente característico a etanol, estos dos parámetros se vieron modificados por la adición del extracto etanólico de propóleo que es de una tonalidad marrón oscuro, su sabor aunque dulce se tornó ligeramente picante por la adición del gengibre que le brinda esta característica y su aspecto se mantuvo semilíquido, homogéneo, sin precipitados, características similares a las presentadas por la miel sin una alteración visible por la presencia del extracto de propóleo y del gengibre.

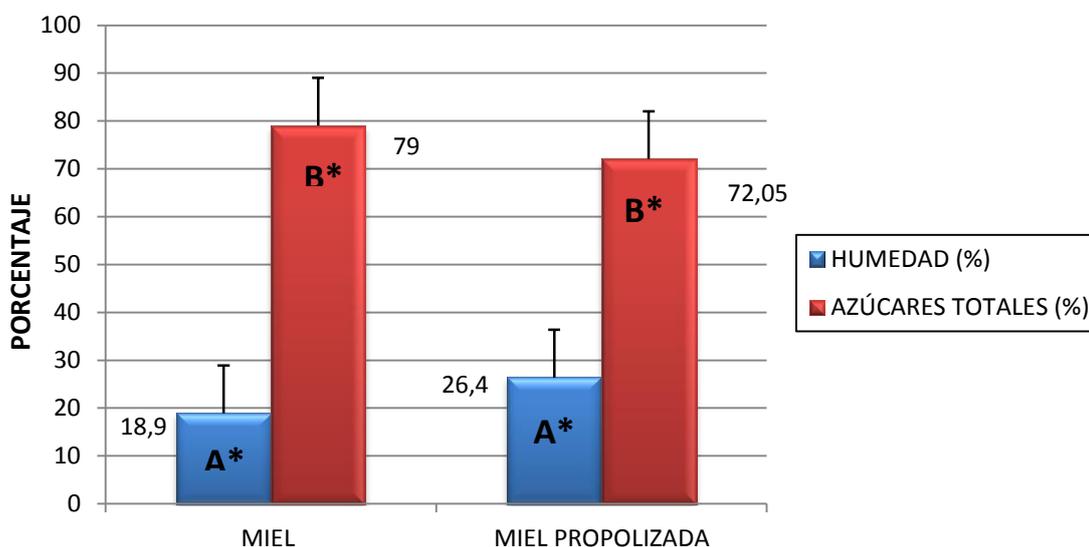
#### 3.3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS

Las características físico – químicas que se determinaron en la miel propolizada fueron comparados con los mismas características determinadas en la miel común para poder establecer las diferencias entre esta materia prima y el producto final y determinar los cambios suscitados por el proceso de elaboración. Los resultados se reportan a continuación:

**CUADRO No. 6. CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS DETERMINADAS PARA LA MIEL PROPOLIZADA EN COMPARACIÓN CON LA MIEL. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

Parámetro	Resultado	
	Miel	Miel Propolizada
Humedad (% en masa)	18,90 ± 0,10	26,40 ± 0,2
Azúcares Totales (% masa)	79,00 ± 1,32	72,05 ± 0,05
Proteína (% en masa)	1,98 ± 0,07	1,39 ± 0,04
Cenizas (% en masa)	0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,03
Vitamina C (mg/100 g)	1,36 ± 0,02	1,42 ± 0,01
ELnN (% en masa)	79,00	72,05
Energía (KJ)	1 356,25	1 229,97

N = 3; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.



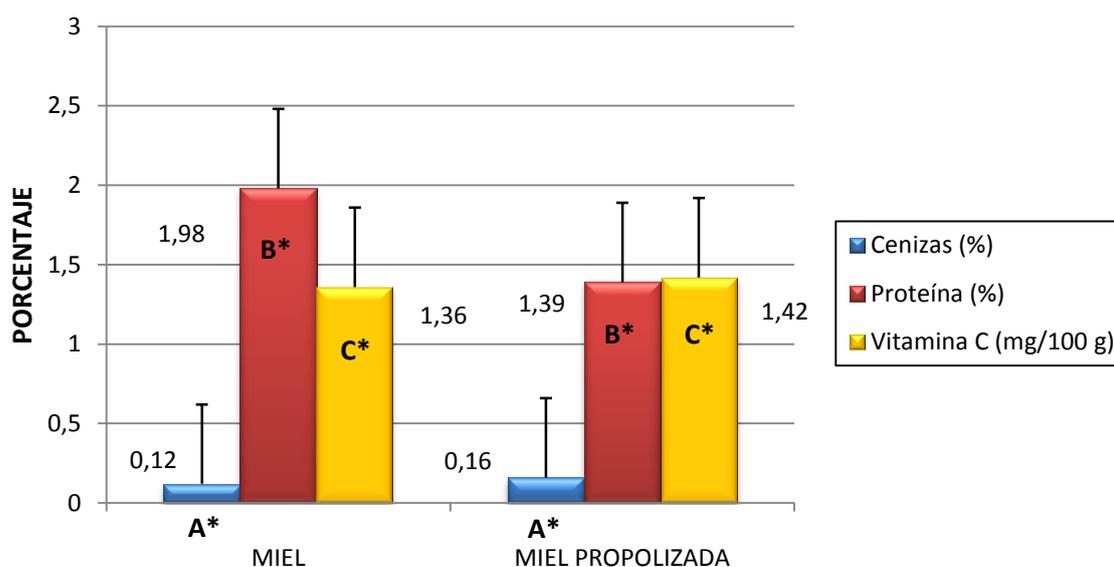
\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. T-STUDENT AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 1. COMPARACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE HUMEDAD Y DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES PRESENTES EN LA MIEL Y EN LA MIEL PROPOLIZADA. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

En el GRÁFICO No. 1 se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa determinada con el Test Student a un nivel de significancia del 95, 00 % y p-Valor < 0,05 (ANEXO No. 6), entre los porcentajes de humedad y de azúcares totales determinados tanto en la miel común y la miel propolizada. La humedad determinada para la miel propolizada fue de 26,40 % que es mayor al 18,90 % de la miel común, incremento que se puede deber a la adición del extracto etanólico de propóleo y al

propiedad de la miel de ser higroscópica, es decir que absorbe la humedad del ambiente (Aganin, A. V., 1965 y Hansson, A., 1966) y que pudo extraer la humedad del jengibre al momento de su mezcla.

El contenido de azúcares totales de la miel común fue de 79,00 % y el de la miel propolizada de 72,05 %; esta variación entre el contenido de azúcares puede deberse a la alta sensibilidad al calor que presentan los azúcares de la miel y la tendencia a la formación del HMF de los mismos ya que en el proceso de elaboración de la miel propolizada se somete la miel junto al jengibre a hervor para una mejor extracción de principios activos del mismo, ocasionando que el producto final se oscurezca lo que es indicativo de formación de HMF y por ende pérdida de componentes esenciales como los azúcares y de enzimas invertasa y diastasa.



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. T-STUDENT AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. N = 3. p-VALOR < 0,05.

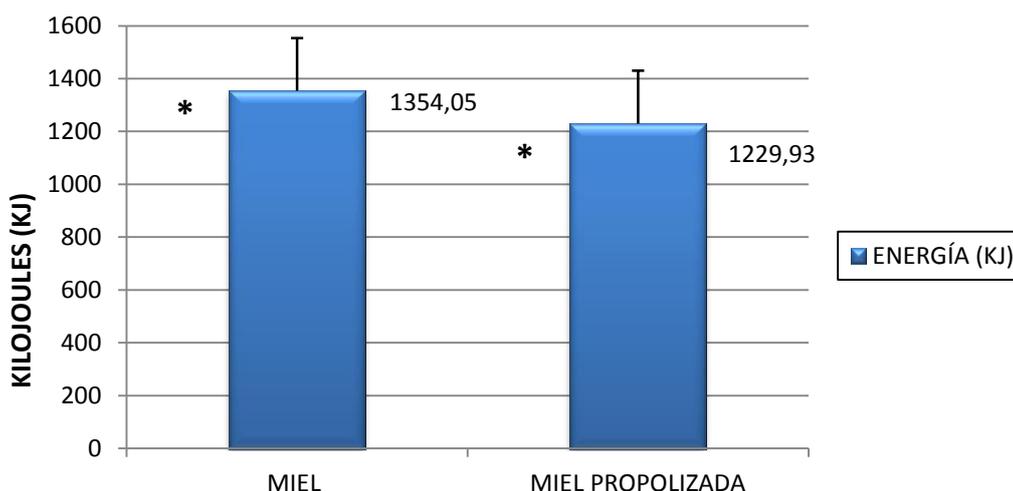
**GRÁFICO No. 2. COMPARACIÓN ENTRE EL PORCENTAJE DE CENIZAS, PROTEÍNA Y VITAMINA C PRESENTES EN LA MIEL Y LA MIEL PROPOLIZADA. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

El GRÁFICO No. 2, indica una diferencia estadísticamente significativa en base al Test Student con un nivel de significancia del 95,00 % y un p-Valor < 0,05 (ANEXO No. 6), en el contenido de cenizas, proteína y vitamina C; El incremento en el contenido de cenizas en la miel propolizada con un valor determinado de 0,16 % en comparación a la

miel común que presento un valor de 0,12 %; aumento que puede ser objeto de la adición del extracto de propóleo que aporta un porcentaje de sólidos totales que se visualizan en el resultado.

El contenido de proteína de la miel común fue de 1,98 % y de la miel propolizada de 1,39 %; valores mayores al reportado por Ulloa, J. A. et al. (2010) de 0,5 %, pero dentro del rango de 0,2 a 2 % establecido por Gutiérrez, M. G. et al. (2008), pudiendo producirse esta disminución por acción del calor al que es sometida la miel en el proceso de elaboración.

La miel presentó un contenido de vitamina C de 1,36 mg/100 g y la miel propolizada de 1,42 mg/100 g, mayores al 0,5 mg/100 g declarado en la información nutricional de la Guía de referencia de la National Honey Board (USA, 2010) y menores a los valores entre 2,26 a 3,64 mg/g reportados por Matei, N. et al. (2004), a pesar de que la miel fue sometida a un tratamiento térmico no se aprecia un pérdida considerable de vitamina C en el producto final y el incremento de este parámetro en el mismo puede ser resultado de la capacidad de la miel para extraer el agua y por ende compuestos hidrosolubles como la vitamina C presente posiblemente en el jengibre o el propóleo.



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. T-STUDENT AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 3. COMPARACIÓN ENTRE LA ENERGÍA EXPRESADA EN KJ APORTADA POR LA MIEL Y LA MIEL PROPOLIZADA, EN RELACIÓN AL CONTENIDO DE AZÚCARES TOTALES CONTENIDOS EN CADA MUESTRA. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO DEL 2013.**

En el GRÁFICO No. 3 establecemos que la energía aportada por la miel fue de 1 354,05 KJ y de la miel propolizada fue de 1 229,93 KJ, con una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo al Test Student con nivel de significancia del 95,00 % y un p-Valor < 0,05 (ANEXO No. 6), la miel se aproxima al valor establecido por Cabello, T. (2006-2007) de 1 363 KJ y por encima del valor establecido por la National Honey Board (2005) de 1 271 KJ al que se aproxima el valor de la miel propolizada, lo que confirma la reputación de ser un alimento de alto poder energético proporcionando 3 000 cal/g. aproximadamente.

### 3.4 CONTROL DE CALIDAD DEL PROPÓLEO Y EL JENGIBRE (*Zingiber officinale*) COMO DROGAS SECAS

#### 3.4.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La humedad es un parámetro de gran importancia porque determinará hidrólisis de los componentes y una posible contaminación microbiana.

Los resultados obtenidos para la humedad del propóleo y el jengibre como drogas secas se reportan en el siguiente cuadro:

**CUADRO No. 7. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DEL PROPÓLEO Y EL JENGIBRE (*Zingiber officinale*) COMO DROGAS SECAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.**

Muestra	% de Humedad	Especificación (Farmacopea Española 2002)
Propóleo	2,89 ± 0,08	Hasta 14 %
Jengibre	4,23 ± 0,83	

N = 3; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.

En el CUADRO No. 7 se puede apreciar que el contenido de humedad determinado para el propóleo y el jengibre se encuentran dentro de los límites establecidos por la Farmacopea Española (2002) para productos naturales que establece un máximo de 14 %.

El propóleo presentó un porcentaje de humedad promedio de 2,89 % cumpliendo con lo especificado en norma brasileña de máximo 8 % y concordando con lo determinado por

Martínez, J. et al. (2011) de 2,88 % en propóleos de Colombia. Valores mayores de humedad de 4,00 % y de 5,74 a 11,69 % fueron determinados por Viloría, J. D. et al. (2012) y Rodríguez, Y. et al. (2012) respectivamente en otras variedades de propóleo colombiano.

El jengibre seco presentó una humedad promedio de 4,23 % cumpliendo con lo establecido por la Norma NTE INEN 2 532 – 2010 (Requisitos de Especies y Condimentos) de 14,00 % y es menor a los valores reportados por Obando, Y. y Quintero, Y. (2009) y Rosella, M. A. et al. (1996) de 8,21 – 8,50 % y 10 % respectivamente.

### 3.4.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Las cenizas son un indicativo del contenido de sales minerales presentes en la muestra y están relacionadas con la forma de recolección con lo cual podemos establecer si esta fue adecuada o no. Los resultados obtenidos para las cenizas del propóleo y jengibre como drogas secas se indican a continuación:

**CUADRO No. 8. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN HCl DEL PROPÓLEO Y EL JENGIBRE (*Zingiber officinale*) COMO DROGAS SECAS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.**

<b>Muestra Parámetro</b>	<b>Propóleo</b>	<b>Jengibre</b>	<b>Especificación (Farmacopea Española 2002)</b>
Cenizas Totales (% en masa)	1,17 ± 0,05	7,75 ± 0,36	≤ 12 %
Cenizas Solubles en Agua (% en masa)	0,88 ± 0,15	7,02 ± 0,17	≤ 7 %
Cenizas Insolubles en HCl (% en masa)	0,16 ± 0,00	0,24 ± 0,01	≤ 5 %

N = 3; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.

En el CUADRO No. 8 se indica los valores promedio determinados para cenizas totales de 1,17 % y 7,75 % para el propóleo y el jengibre respectivamente, las cenizas solubles en agua presentaron un valor promedio de 0,88 % para el propóleo y 7,02 % para el jengibre y para las cenizas insolubles en HCl se obtuvieron valores promedio de 0,16 %

en el propóleo y 0,24 % en el jengibre, lo que es indicativo de ausencia de contaminación térrea especialmente de sílice, todos los valores cumplen con los máximos establecidos por la Farmacopea Española (2002) de 12 % para cenizas totales, 7 % para cenizas solubles en agua y 5 % para cenizas insolubles en HCl.

El porcentaje de cenizas totales determinado en el propóleo de 1,17 % cumple también con la norma brasileña que permite un máximo de 5 %, Martínez, J. et al. (2011) reporto un valor de 0,78 % y Rodríguez, Y. et al. (2012) encontró valores entre 0,35 a 3,86 %.

El porcentaje de cenizas totales determinado en el jengibre de 7,75 % cumple con la especificación de la Norma NTE INEN 2 532 – 2010 (Requisitos de Especies y Condimentos) de 8,00 % y es mayor a los valores de 4,70 a 4,90 % reportado por Obando, Y. y Quintero, Y. (2009); al 0,9 % encontrado por Amaguayo, S. (2013); y al 5,5 % indicado por Rosella, M. A. et al. (1996).

El porcentaje de cenizas solubles en agua duplica al reportado por Amaguayo, S. (2013) de 0,48 % y el porcentaje de cenizas insolubles en HCl es menor al indicado por el mismo autor de 0,42 %.

### 3.5 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

#### 3.5.1 DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

CUADRO No. 9. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.

<b>Extracto</b> <b>Parámetro</b>	<b>Propóleo</b>	<b>Miel</b>	<b>Jengibre</b>	<b>Miel Propolizada</b>
Olor	Aromático, Característico (Etanol)	Aromático, Característico (Etanol)	Aromático, Intenso, Característico (Etanol)	Aromático, Característico (Etanol)
Color	Amarillo	Incoloro	Pardo claro	Incoloro
Sabor	Amargo Intenso	Dulce, Amargo	Amargo, Picante Intenso	Dulce, Amargo, Picante
Aspecto	Homogéneo, Transparente	Homogéneo, Transparente	Homogéneo, Transparente	Homogéneo, Transparente

En base a lo reportado en el CUADRO No. 9 todos los extractos etanólicos presentaron un olor aromático característico al solvente usado siendo el olor del extracto de jengibre el más intenso; el extracto de propóleo presentó un color amarillo similar a lo reportado por Lozina, L. et al. (2009), el extracto de jengibre fue de color pardo claro y los extracto de las mieles fueron incoloros; todos los extractos presentaron un sabor amargo siendo más intenso en el propóleo y en el jengibre presento un picor intenso, en tanto que las mieles se caracterizaron por un ligero dulzor; el aspecto fue el mismo para todos los extractos siendo transparente y homogéneo.

### 3.5.2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

**CUADRO No. 10. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. AGOSTO DEL 2013.**

<b>Extracto</b> <b>Parámetro</b>	<b>Propóleo</b>	<b>Miel</b>	<b>Jengibre</b>	<b>Miel</b> <b>Propolizada</b>
pH	6,23 ± 0,01	6,19 ± 0,03	7,93 ± 0,02	6,27 ± 0,02
Índice de Refracción	1,366 ± 0,00	1,372 ± 0,00	1,364 ± 0,00	1,370 ± 0,00
Densidad Relativa (g/mL)	0,91 ± 0,00	0,94 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,94 ± 0,00
Sólidos Totales (%)	2,36 ± 0,01	7,66 ± 0,01	2,10 ± 0,02	7,09 ± 0,09
° Brix	21,05 ± 0,05	24,30 ± 0,10	19,40 ± 0,02	23,60 ± 0,60

N = 3; ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.

En el CUADRO No. 10 se indican los resultados promedio para los extractos etanólicos: El extracto de propóleo presentó un pH de 6,23; un índice de refracción de 1,366; densidad relativa de 0,91 g/mL; sólidos totales de 2,36 % y ° Brix de 21,05.

Para la miel el pH determinado fue de 6,19; el índice de refracción de 1,372; la densidad relativa de 0,94 g/mL; sólidos totales de 7,66 % y ° Brix de 24,30.

El jengibre presentó un pH de 7,93; índice de refracción de 1,364; densidad relativa de 0,93 g/mL; sólidos totales de 2,10 % y ° Brix de 19,40; todos los valores varían en comparación a los reportados por Amaguayo, S. (2013) de 5,60; 1,390; 0,989 y 3,40 % para los mismos parámetros respectivamente.

La miel propolizada presentó valores aproximados a los de la miel con pH de 6,27; índice de refracción de 1,370; densidad relativa de 0,94 g/mL; sólidos totales de 7,09 % y ° Brix de 23,60.

La comparación del índice de refracción y de la densidad de los extractos con el índice de refracción de 1,360 y la densidad de 0,790 g/mL del etanol nos indica la presencia de compuestos densos disueltos en el solvente de extracción, ya que estos dos parámetros fueron mayores a los mismos parámetros del etanol en todos los extractos.

### 3.5.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

**CUADRO No. 11. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

Ensayos	Metabolito	Extractos			
		Propóleo	Miel	Jengibre	Miel Propolizada
Dragendorff		-	-	-	++
Wagner	Alcaloides	-	-	-	+
Meyer		-	-	++	+
Baljet	Lactonas y Cumarinas	++	-	+	-
Bortrager	Antraquinonas	+++	-	++	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o Esteroides	+++	-	+	-
Catequinas	Catequinas	+++	-	+++	-
Fehling	Azúcares reductores	-	+++	++	+++
Tricloruro Férrico	Taninos	+++	-	++	+
Shinoda	Flavonoides	+++	+	+++	+
Antocianidinas		+++	-	+	+
Resinas	Resinas	+++	-	-	-
Espuma	Saponinas	-	-	-	-

INTERPRETACIÓN: - NO PRESENCIA  
 + BAJA EVIDENCIA  
 ++ EVIDENCIA  
 +++ ALTA EVIDENCIA

De acuerdo a la información reportada en el CUADRO No. 11, en el extracto de propóleo se detectó la presencia de Lactonas (++) , Cumarinas (++) , Antraquinonas (+++), Triterpenos (+++), Catequinas (+++), Taninos (+++), Flavonoides tipo Antocianidinas

(+++)  
concordante con lo reportado por Alvarez, S. (2012) y Resinas (++) que fueron los compuestos con mayor presencia, resultados similares fueron reportados por Tolosa, L. y Cañizares, E. (2008) en propóleos de México.

En la miel solo se evidenció una alta presencia de Azúcares Reductores (++) y baja evidencia de Flavonoides (+) concordante con lo indicado por Cruzado, L. et al. (2007).

En el extracto de jengibre se determinó la presencia de Alcaloides (++) en base Meyer, Lactonas y Cumarinas (+), Antraquinonas (++)  
Triterpenos (+), Catequinas (+++), Azúcares Reductores (++)  
Taninos (++)  
Flavonoides (++) y Antocianidinas (+), lo cual coincide con lo reportado por Enríquez, A. et al. (2008) quien también indicó la presencia de Resinas.

La miel propolizada reportó la presencia de Alcaloides en base a Dragendorff (++)  
Wagner (+)  
Meyer (+); Azúcares Reductores (+++)  
Taninos (+) y Flavonoides tipo Antocianidinas (+), siendo prueba que la miel tiene la capacidad de extraer compuestos de otras materias vegetales.

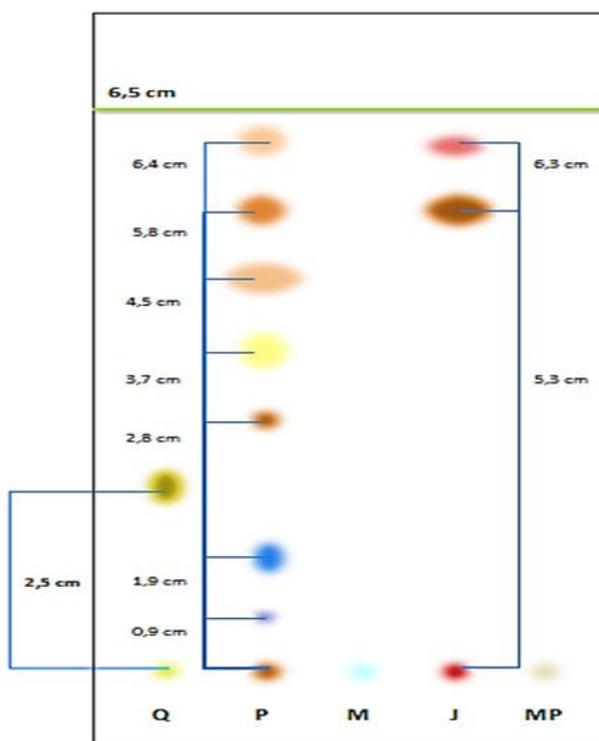
### **3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)**

#### **3.6.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL MARCADOR QUÍMICO FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADO COMO PRESENCIA DE QUERCETINA**

En el CUADRO No. 12 se indican los R<sub>f</sub> determinados para la Cromatografía de Capa Fina (TLC) usando el solvente de corrido cloroformo – acetona – ácido fórmico (75:16,5:8,5) y como revelador vainillina – ácido sulfúrico se evidenció la presencia de flavonoides como la rutina, kaempferol, crisina, pinocembrina, quercetina y ácido vanílico así como de otros compuestos como flavonoles, flavonas y ácidos fenólicos en el extracto de propóleo (CUADRO No. 13) coincidente con lo indicado por Peña, R. (2008), Medina, M. (2012) y por Ortega, N. et al. (2010).

**CUADRO No. 12. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE LOS Rf DE LAS MANCHAS OBTENIDAS PARA CADA MUESTRA EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC). LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

Muestra	Mancha	Distancia (cm)	Color	Rf	Compuesto
Quercetina	1	2,5	Pardo	0,39	Quercetina
	1	0,9	Azul	0,14	Flavonoide glicosilado
Propóleo	2	1,9	Rosado	0,29	Rutina o Kaempferol
	3	2,8	Pardo	0,43	Quercetina
	4	3,7	Violeta	0,57	Crisina
	5	4,5	Violeta	0,69	Flavonol y Flavonona o Pinocembrina
	6	5,8	Amarillo	0,89	-
	7	6,4	Amarillo	0,99	Ácido Vanílico
	Miel	-	-	-	-
Jengibre	1	5,3	Amarillo	0,82	Flavonona e Isoflavona
	2	6,3	Violeta	0,97	Ácido Vanílico
Miel Propolizada	-	-	-	-	-



**FIGURA No. 17. DISTANCIAS DE LAS MANCHAS OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC) DONDE Q: QUERCETINA, P: PROPÓLEO, M: MIEL, J: JENGIBRE, MP: MIEL PROPOLIZADA.**

En el extracto de jengibre se pudo evidenciar la presencia de flavonas, isoflavonas y la posible presencia de ácido vanílico de acuerdo con los Rf encontrados por Cetkovic, G. et al. (2003). En la miel y miel propolizada no se detectaron manchas.

CUADRO No. 13. PLACA CROMATOGRÁFICA COMPARATIVA ENTRE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO, MIEL, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA CON ESTÁNDAR DE QUERCETINA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.

**TLC – EXTRACTOS ETANÓLICOS**



**Propóleo**

**Jengibre**

**Fase Estacionaria:** Sílica gel 60 HF<sub>254</sub>

**Muestra:** Extracto etanólico de Propóleo, Miel, Jengibre y Miel propolizada.

**Solventes:** Cloroformo – acetona – ácido fórmico (75:16,5:8,5 en v/v).

**Revelador:** Vainillina – ácido sulfúrico.

### 3.6.2 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (MÉTODO DEL AlCl<sub>3</sub>)

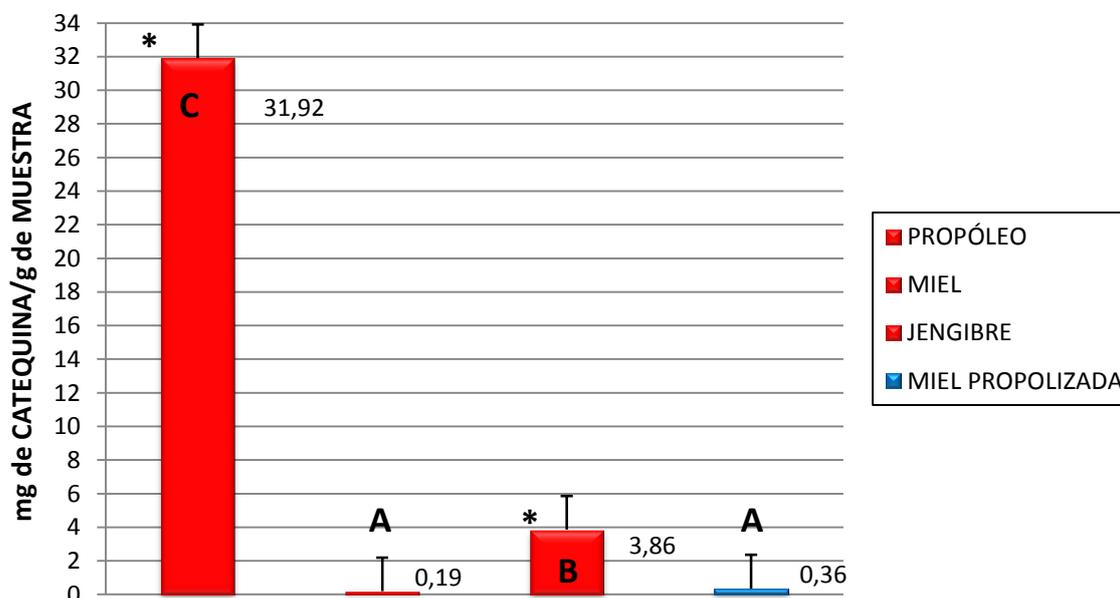
En el ANEXO No. 4, se indican las absorbancias y concentraciones determinadas por espectroscopía UV para la elaboración de la curva de calibración usando catequina como

patrón realizando la lectura a 510 nm, para la determinación de flavonoides totales en los extractos etanólicos, los resultados se indican a continuación:

**CUADRO No. 14. RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS EN mg DE CATEQUINA/100 g DE MUESTRA DETERMINADOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE MIEL, PROPÓLEO, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

Muestras	Absorbancia	Concentración en ppm ( $\mu\text{g}$ de catequina/mL de extracto)	Contenido de flavonoides totales en mg de catequina por g de muestra
Propóleo	0,348	3 192,14 $\pm$ 23,74	31,92
Miel	0,206	18,56 $\pm$ 0,09	0,19
Jengibre	0,418	385,88 $\pm$ 0,63	3,86
Miel Propolizada	0,389	35,88 $\pm$ 0,06	0,36

N = 3;  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 3 GRUPOS: A, B, C. N = 3. p-VALOR > 0,05.

**GRÁFICO No. 4. CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES EXTRAÍDOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS EXPRESADOS EN g DE CATEQUINA POR g DE MUESTRA. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

En los resultados indicados en el CUADRO No. 14 y representados en el GRÁFICO No. 4 se observa que en el contenido de flavonoides totales el propóleo reportó 3 192 mg/100 g de muestra siendo el más alto para las muestras analizadas, el jengibre 386 mg/100 g, la miel propolizada 36 mg/100 g y la miel 19 mg/100 g, evidenciándose de esta manera la concentración de flavonoides y la relación entre materias primas y producto final, El Test de Tukey al 95,00 % de significancia indica que la miel y la miel propolizada son grupos homogéneos, sin diferencia estadísticamente significativa, siendo confirmado por el test de Mann-Whitney con un p-Valor < 0,05 (ANEXO No. 7).

La concentración de flavonoides totales reportado para el propóleo es mayor a los valores entre 190 y 360 mg/100 g de muestra reportados por Rodríguez, Y. et al. (2012) y a los valores entre 5,30 y 22,3 mg/100 g indicados por Grosso, G. et al. (2007) en propóleo de Colombia; en tanto que Palomino, L. et al. (2009) encontró valores entre 475 a 4 237 mg/100 g en propóleos del mismo país. Lozina, L. et al. (2009) reportaron valores entre 12 y 3 039 mg/100 g, Bedascarrasbure, E. et al. (2004) encontraron valores entre 370 y 1 290 mg/100 g en propóleos argentinos, situándose nuestro propóleo en base a este resultado en una calidad óptima y resaltando lo dicho por Torel, J. et al. (1986) quien expresa que el contenido de fenoles y flavonoides en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante.

Montenegro, G. et al. (2003) afirma que los flavonoides son una serie considerable de pigmentos fenólicos de la planta y su contenido en el vegetal, alcanza normalmente niveles de 0,5% en polen, 10% en propóleos y casi 6000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en miel. Los valores encontrados tanto para la miel y la miel propolizada superan el rango de valores entre 4,30 a 13,80 mg/100 g de muestra determinados por Muñoz, O. et al. (2007) en mieles chilenas y a valores de 6,59; 7,25 y 6,27 mg/100 g para mieles de origen floral, de mielada y mixtas respectivamente reportados por Vit, P. et al. (2008) en la categorización de mieles checas según su actividad antioxidante.

El contenido de flavonoides en la miel propolizada casi se duplicó en comparación a la miel pasando de 19 mg/100 g a 36 mg/100 g de muestra lo que puede ser indicativo de un aporte de este tipo de compuestos por parte del jengibre y el propóleo.

El jengibre con el valor reportado de 386 mg/100 g de muestra podría corroborar lo afirmado por varios autores que le brindan una serie de propiedades biológicas de las cuales estos compuestos serían los responsables pero no existen investigaciones sobre su contenido de estos componentes dificultándose la refutación de dichas aseveraciones.

### 3.6.3 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS (MICROMÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU)

El método de Folin-Ciocalteu se usa para determinar el contenido total de compuestos fenólicos en el análisis de plantas y alimentos, es útil para evaluar estos materiales porque contienen muchas clases de compuestos fenólicos en especial el propóleo. En el ANEXO No. 5, se presentan los datos empleados para elaborar las curvas de calibración usando ácido gálico como patrón medido a 765 nm. Los resultados determinados para los compuestos fenólicos fueron:

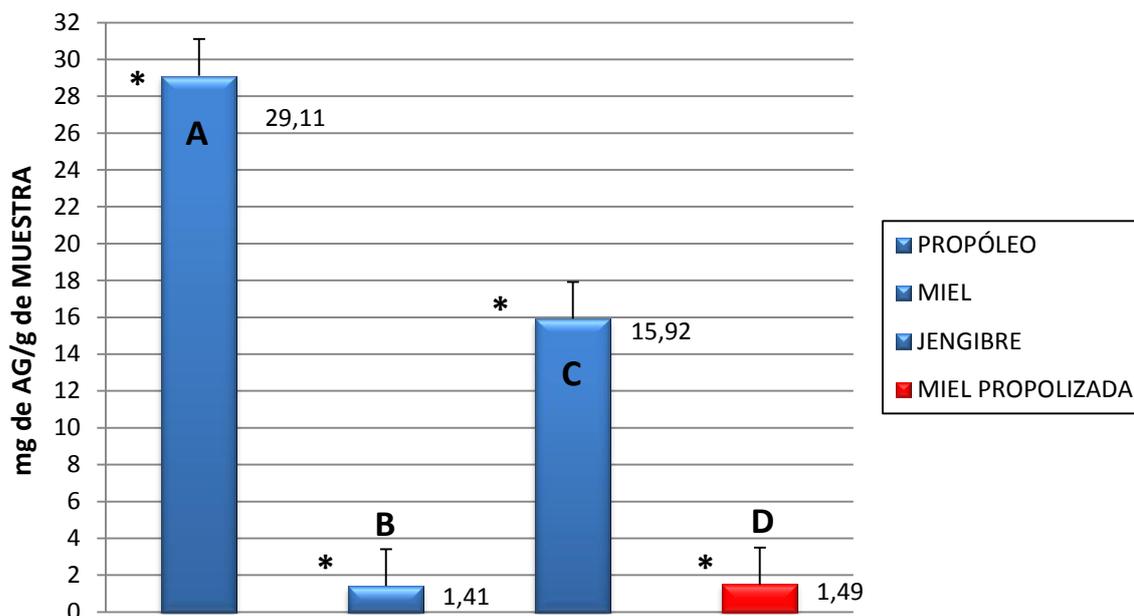
**CUADRO No. 15. RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EXPRESADOS EN mg DE ÁCIDO GÁLICO/100 g DE MUESTRA DETERMINADOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE MIEL, PROPÓLEO, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

Muestras	Absorbancia	Concentración en ppm ( $\mu\text{g}$ de Ácido Gálico/mL de extracto)	Contenido de Compuestos Fenólicos Totales en mg de Ácido Gálico por g de Muestra
Propóleo*	2,521	2 911,13 $\pm$ 2,17	29,11
Miel**	0,165	140,83 $\pm$ 0,00	1,41
Jengibre*	1,466	1 591,96 $\pm$ 1,91	15,92
Miel Propolizada**	0,175	149,44 $\pm$ 0,48	1,49

N = 3;  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES. p-Valor < 0,05.

\* Valor determinado con la Ecuación de la Recta de la Curva del Gráfico No. 3.

\*\* Valor determinado con la Ecuación de la Recta de la Curva del Gráfico No. 2.



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 5. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EXTRAÍDOS EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS EXPRESADOS EN g DE ÁCIDO GÁLICO POR g DE MUESTRA. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

Los resultados reportados en el CUADRO No. 15 y representados en el GRÁFICO No. 5 para el contenido de compuestos fenólicos totales en función del ácido gálico fueron de 2 911 mg/100 g de muestra para el propóleo como el más alto, seguido por el jengibre con 1 592 mg/100 g, la miel propolizada con 149 mg/100 g y la miel con 141 mg/100 g. Hay que resaltar que se produjo un ligero incremento de la concentración de compuestos fenólicos entre la miel y la miel propolizada de 141 a 149 mg/100 g. Con el Test de Tukey a nivel de significancia del 95,00 % se estableció que todas las muestras son estadísticamente diferentes con p-Valor < 0,05.

El valor reportado para el propóleo es menor a los valores encontrados por Rodríguez, Y. et al. (2012) de 6 372 a 9 455 mg/100 g de muestra y por Palomino, L. et al. (2009) con valores entre 2 211 y 7 522 mg/100 g. En propóleos de diferentes zonas de Argentina se reportaron valores entre 1 090 y 28 821 mg/100 g (Lozina, L. et al., 2009) y entre 1 358 a 2 131 mg/100 g (Bedascarrasbure, E. et al., 2004), teniendo nuestro propóleo un contenido apreciable de compuestos fenólicos en comparación con los de otros países.

Para las mieles la National Honey Board (2010) establece concentraciones de compuestos fenólicos en base al origen que van desde 4,60 mg/100 g para miel de Acacia hasta 79,60 mg/100 g para mieles de otro origen con lo que se puede considerar a nuestras mieles de alta calidad y que el contenido de fenoles va a depender de la variedad de plantas de las cuales las abejas recolectan el néctar variando de un país a otro. En mieles chilenas se reportaron valores 0 a 8,83 mg/100 g (Muñoz, O. et al., 2007) y en mieles checas valores entre 115,03 a 129,03 mg/100 g (Vit, P. et al., 2008), con esta diversidad de datos se ratifica que el origen de la miel influye en este parámetro. El jengibre reportó un alto contenido de compuestos fenólicos que le atribuirían una alta capacidad antioxidante (Rosella, M. et al., 1996).

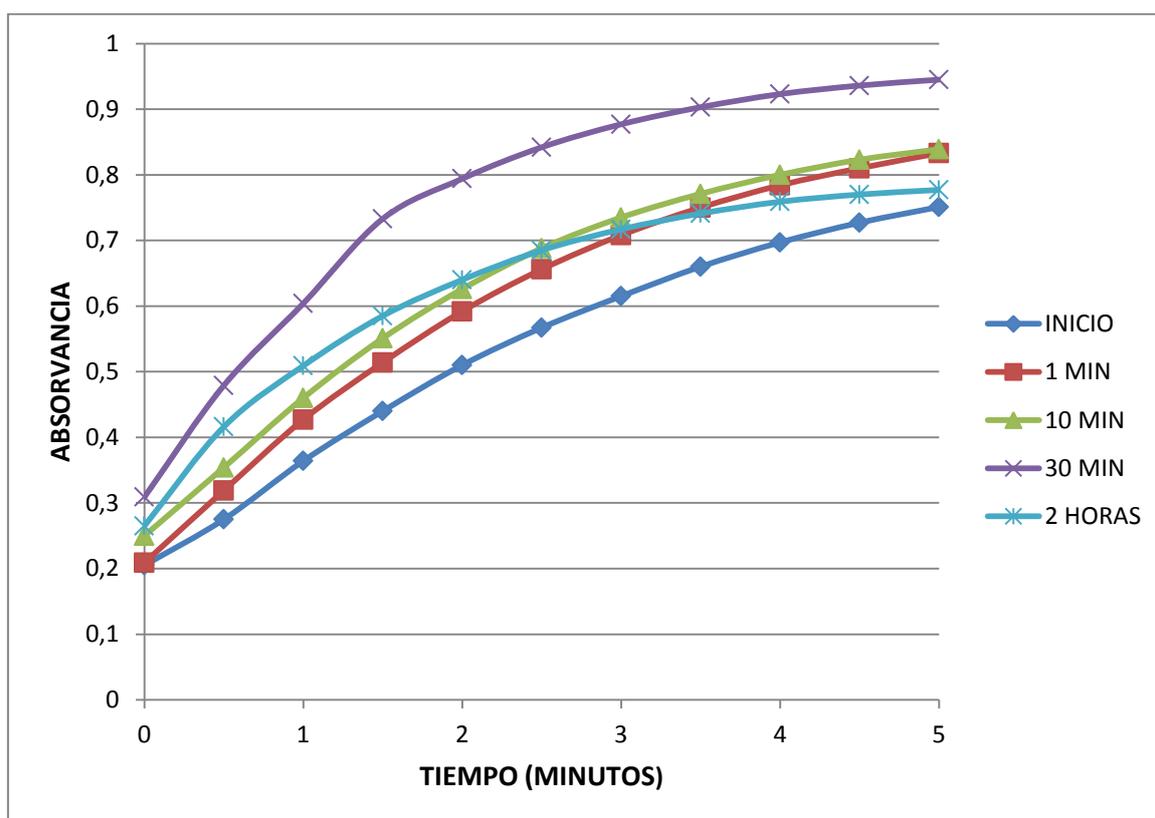
### 3.6.4 ENSAYO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA.

#### 3.6.4.1 Determinación de la Actividad Enzimática de la Polifenoloxidasas (PPO)

La determinación de la actividad enzimática de la polifenoloxidasas permitió establecer el tiempo de actividad constante de la enzima, para realizar las mediciones del ensayo con un mismo extracto y en las mismas condiciones para cada prueba.

**CUADRO No. 16. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (Abs/minuto) DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO) MEDIDA PARA DIFERENTES TIEMPOS DE CONGELACIÓN A -6 °C. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.**

Tiempo (min)	Inicio	1 min	10 min	30 min	2 Horas
	Absorbancia				
0	0,205	0,209	0,250	0,309	0,265
0,5	0,275	0,319	0,354	0,479	0,416
1	0,364	0,427	0,46	0,604	0,509
1,5	0,44	0,514	0,551	0,733	0,585
2	0,51	0,592	0,626	0,794	0,64
2,5	0,567	0,656	0,688	0,842	0,685
3	0,615	0,708	0,735	0,877	0,717
3,5	0,66	0,75	0,771	0,903	0,741
4	0,697	0,784	0,8	0,923	0,759
4,5	0,727	0,81	0,823	0,936	0,77
5	0,751	0,833	0,839	0,945	0,777



**GRÁFICO No. 6. CURVAS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO) MEDIDAS DESPUES DE DIFERENTES TIEMPOS DE CONGELACIÓN A -6 °C. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.**

En el GRÁFICO No. 6 se observa la actividad de la PPO después de diferentes periodos de congelación a -6 °C, se puede establecer que la actividad se logró mantener ligeramente estable hasta un lapso de 2 horas, produciéndose un leve incremento a los 10 minutos de congelación, a los 30 minutos se produjo un incremento en la actividad que no parte del origen como las demás, y a las 2 horas se produjo un ligero descenso, pero todas las curvas presentaron la tendencia para la actividad enzimática establecida por Michaelis-Menten, hay que indicar que el tiempo de congelación es un factor determinante para mantener la estabilidad.

Se recomienda determinar la actividad de la enzima estableciendo distintos periodos (minutos) por el lapso de 2 horas con el fin de establecer los factores que influyen en su actividad y lograr un mejor control de los mismos.

### 3.6.4.2 Actividad Antioxidante Total

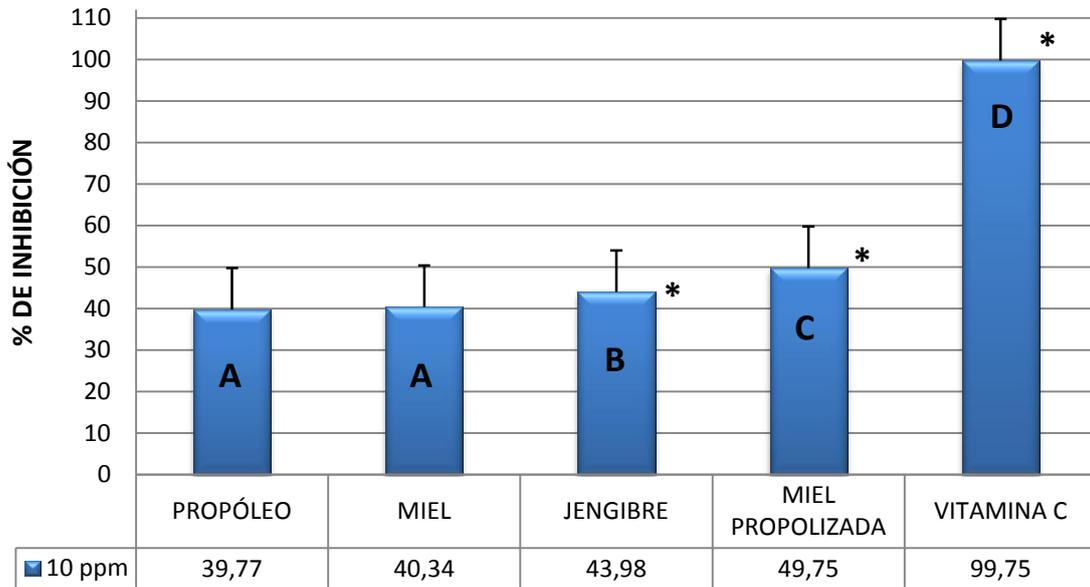
La actividad antioxidante total se expresó como porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas, los resultados de la determinación en cada muestra se comparó frente a la vitamina C, considerada como antioxidante de poder ya probado,

Los resultados se reportan a continuación:

**CUADRO No. 17. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT) EXPRESADA COMO PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA (PPO) ENCONTRADOS PARA LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO, MIEL, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA EN CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1 000 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.**

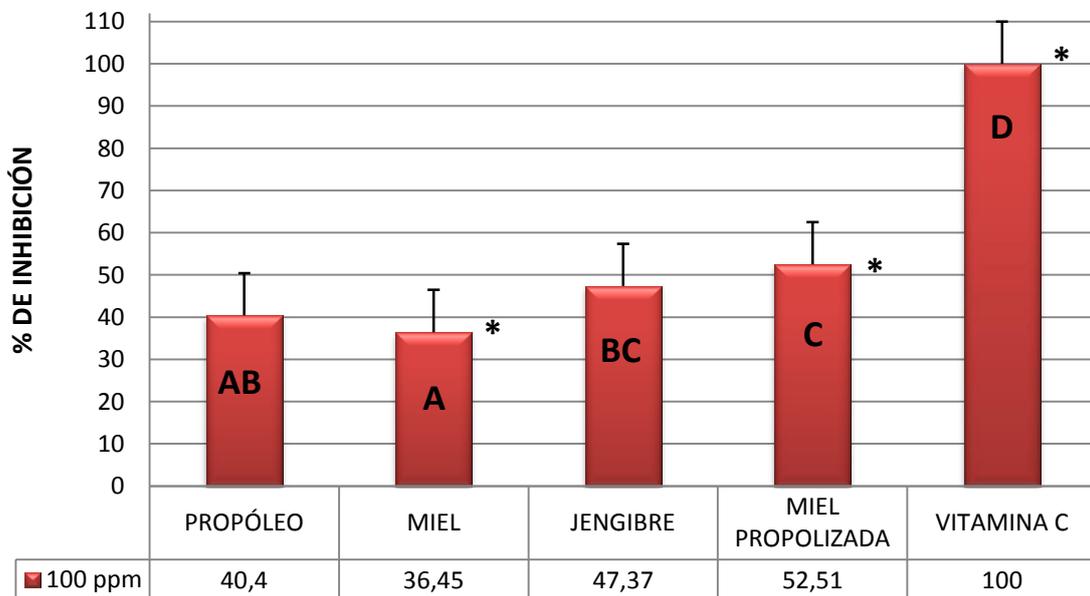
Muestra	Concentración (ppm)	$\Delta$ Absorbancia	% Inhibición de la PPO
<b>Blanco</b>	-	0,798 $\pm$ 0,00	0,00
	10	0,480 $\pm$ 0,00	39,77
<b>Propóleo</b>	100	0,475 $\pm$ 0,01	40,40
	1 000	0,719 $\pm$ 0,05	9,72
	10	0,476 $\pm$ 0,01	40,34
<b>Miel</b>	100	0,507 $\pm$ 0,01	36,45
	1 000	0,568 $\pm$ 0,01	28,73
	10	0,447 $\pm$ 0,01	43,98
<b>Jengibre</b>	100	0,419 $\pm$ 0,03	47,37
	1 000	0,528 $\pm$ 0,01	33,81
	10	0,401 $\pm$ 0,02	49,75
<b>Miel Propolizada</b>	100	0,379 $\pm$ 0,04	52,51
	1 000	0,468 $\pm$ 0,01	41,28
	10	0,002 $\pm$ 0,00	99,75
<b>Vitamina C</b>	100	0,000 $\pm$ 0,00	100,00
	1 000	0,005 $\pm$ 0,00	99,37

N = 3;  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA TRES MEDICIONES.  
p-Valor < 0,05.



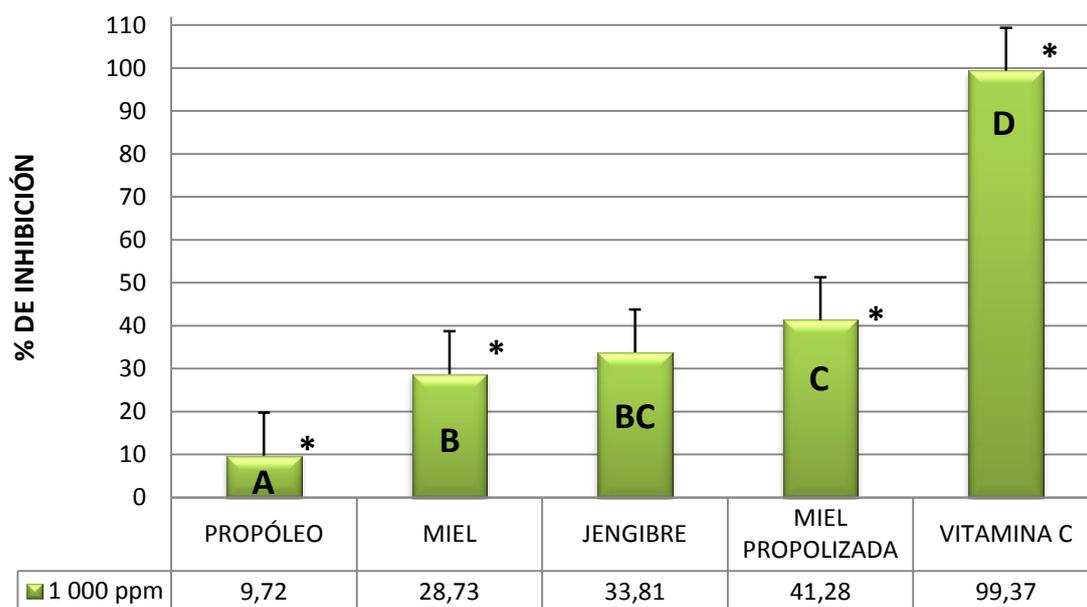
\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXPRESADA POR % DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO, MIEL, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA EN CONCENTRACIONES DE 10 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.**



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXPRESADA POR % DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO, MIEL, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA EN CONCENTRACIONES DE 100 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.**



\*: DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA. HSD DE TUKEY AL 95,00 % DE SIGNIFICANCIA. 4 GRUPOS: A, B, C, D. N = 3. p-VALOR < 0,05.

**GRÁFICO No. 9. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EXPRESADA POR % DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO, MIEL, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA EN CONCENTRACIONES DE 1 000 ppm. LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y NUTRICIÓN ANIMAL. FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS. ESPOCH. OCTUBRE DEL 2013.**

En el CUADRO No. 17 y en el GRÁFICO No. 7 se reportan los resultados de la determinación de la actividad antioxidante por inhibición de la polifenoloxidasas que nos indican a la concentración de 10 ppm la miel propolizada presentó el porcentaje más alto de inhibición con el 49,75 % en comparación al estándar de vitamina C que a la misma concentración alcanzó el 99,75 %, siguen el jengibre con 43,98%, la miel con 40,34 % y el propóleo con 39,77 %.

En el GRÁFICO No. 8 a concentración de 100 ppm el mejor porcentaje de inhibición presentó la miel propolizada con el 52,51 % siendo la mitad del presentado por la vitamina C de 100 %, le siguen el jengibre con 47,37 %, el propóleo con 40,4 % y la miel con 36,45 %.

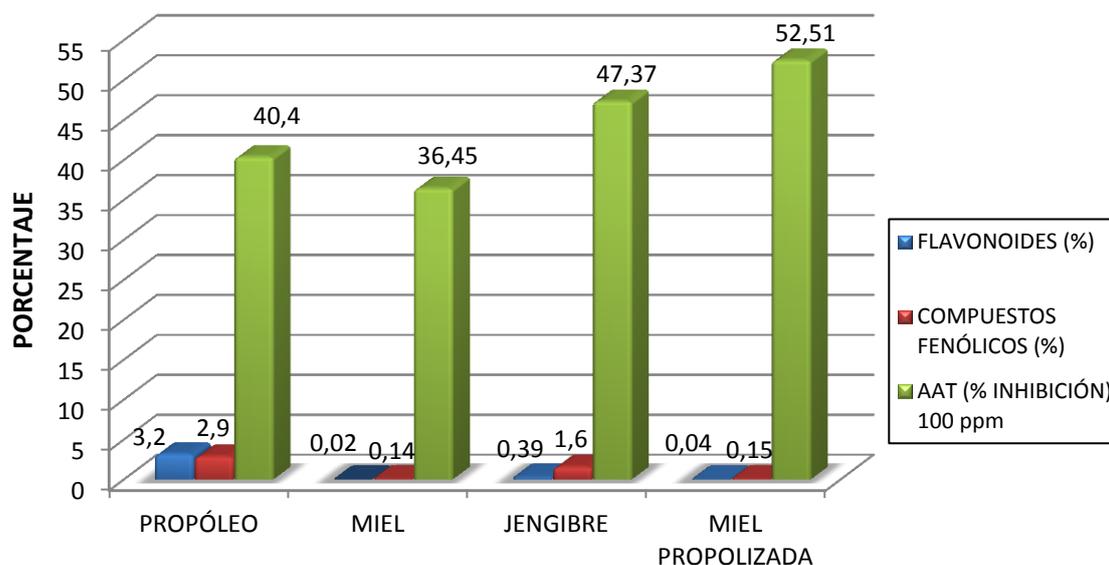
En el GRÁFICO No. 9 a concentración de 1 000 ppm se destacó la miel propolizada con 41,28 % en comparación a la vitamina C que reportó 99,37 %, seguido del jengibre con 33,81 %, la miel con 28,73 % y el propóleo con 9,72 % siendo el alto contenido de

resinas presente en el extracto un impedimento para realizar la adecuada lectura del propóleo a esta concentración.

Estudios realizados para medir la actividad antioxidante de propóleos de otros países son los realizados por Rodríguez, Y. et al. (2012) quien determinó valores de 190,41 ( $\mu\text{mol/g}$ ) para el método DPPH, 1918,41 ( $\mu\text{mol/g}$ ) para el método ABTS y 321,27 ( $\mu\text{mol/g}$ ) para el método FRAP; Palomino, L., et al. (2009) encontró entre  $33,9 \pm 9,7$  y  $324,6 \pm 15,0$ , y entre  $455,5 \pm 7,8$  y  $1,091 \pm 17,3$   $\mu\text{mol TE/g}$  de EEP (TEAC) en los sistemas DPPH y ABTS, respectivamente, en el método FRAP, la actividad se encuentra entre  $40,9 \pm 13,3$  y  $338,4 \pm 22,4$   $\mu\text{mol AAE/g}$  de EEP (AEAC), ambas en propóleos de Colombia. Velázquez, C. et al. (2007) indica valores de 75, 26 y 22 % por el método DPPH para muestras de México.

En la miel la National Honey Board (2010) establece valores de 1 a 16,95  $\mu\text{mol TE/g}$  para la actividad antioxidante en dependencia del origen de la miel, Vit, P. et al. (2008) encontró valores de 113,01 a 125,89  $\mu\text{mol de TE/g}$  en mieles de origen checo en tanto que Muñoz, O. et al. (2007) indican valores de 1,26 a 12,31  $\mu\text{mol de TE/g}$  en mieles chilenas relacionando estos valores con el contenido de flavonoides.

La miel propolizada presentó el resultado esperado, siendo la concentración a 100 ppm la que presentó la mayor actividad en base a este método, en tanto que el propóleo presentó dificultades para la determinación debido a las características de la muestra y los compuestos presentes en las mismas principalmente las resinas, que produjeron turbidez lo que impidió realizar una lectura de la absorbancia adecuada.



**GRÁFICO No. 10. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES EN LAS MUESTRAS DE PROPÓLEO, MIEL, JENGIBRE Y MIEL PROPOLIZADA.**

En el GRÁFICO No. 10 se establece la relación entre la concentración de compuestos fenólicos y de flavonoides y la actividad antioxidante y en el que se puede deducir que de estos dos parámetros no depende completamente dicha actividad ya que pueden existir condiciones como interacciones entre moléculas o con otras sustancias en que estos compuestos no actúen con total libertad sobre la enzima lo que limitaría la actividad de los mismos impidiendo determinar correctamente la actividad antioxidante.

### 3.6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó comparando los promedios de cada uno de los extractos con la Vitamina C que es el grupo control utilizando la prueba de ANOVA y el test de Tukey para determinar qué valores presentaban una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control, se utilizaron los programas estadísticos G-STAT y SPSS 19 y los resultados se indican a continuación:

**CUADRO No. 18. RESULTADO LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LOS EXTRACTOS VS LA VITAMINA C A CONCENTRACIÓN DE 10 ppm APLICANDO LA PRUEBA HSD DE TUKEY CON NIVEL DE CONFIANZA DEL 95,00 %. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19.**

<b>% DE INHIBICIÓN</b>					
<b>HSD de Tukey<sup>a</sup></b>					
<b>MUESTRAS</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0,05</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>PROPÓLEO</b>	3	39,8500			
<b>MIEL</b>	3	40,4100			
<b>JENGIBRE</b>	3		44,0500		
<b>MIEL PROP.</b>	3			49,8100	
<b>VITAMINA C</b>	3				99,7500
<b>Sig.</b>		,963	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

En el CUADRO No. 18 se indican los resultados obtenidos con la prueba HSD de Tukey con un nivel de confianza del 95,00 % y un nivel de significancia de 0,05 en los extractos a concentración de 10 ppm, las muestras se dividieron en 4 subconjuntos, existe diferencia significativa entre la vitamina C (subconj. D), miel propolizada (subconj. C) y el jengibre (subconj. B), en tanto que la miel y el propóleo son estadísticamente homogéneos a esta concentración ya que se ubican en el subconj. A, con un p-Valor > 0,05 de 0,963 que indica la igualdad de distribuciones, lo que se corrobora con el Test de Mann-Whitney ( $\alpha = 0,05$ ).

En el ANOVA (ANEXO No. 8) realizado para esta concentración se obtuvo un p-Valor de  $0,0004E^{-10}$  que es menor a 0,05 con lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias entre las muestras, ya que en este caso hay diferencia significativa entre 3 de las muestras analizadas.

**CUADRO No. 19. RESULTADO LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LOS EXTRACTOS VS LA VITAMINA C A CONCENTRACIÓN DE 100 ppm APLICANDO LA PRUEBA HSD DE TUKEY CON NIVEL DE CONFIANZA DEL 95,00 %. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19.**

<b>% DE INHIBICIÓN</b>					
<b>HSD de Tukey<sup>a</sup></b>					
<b>MUESTRAS</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0,05</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>PROPÓLEO</b>	3	36,5300			
<b>MIEL</b>	3	40,4767	40,4767		
<b>JENGIBRE</b>	3		47,4333	47,4333	
<b>MIEL PROP.</b>	3			52,5700	
<b>VITAMINA C</b>	3				100,0000
<b>Sig.</b>		,479	,081	,254	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

En el CUADRO No. 19 se indican los resultados obtenidos con la prueba HSD de Tukey con un nivel de confianza del 95,00 % y un nivel de significancia de 0,05 en los extractos a concentración de 100 ppm y obteniéndose 4 subconjuntos, se observa que existe homogeneidad estadística entre el propóleo y miel (subconj. A), miel y jengibre (subconj. B) y entre jengibre y miel propolizada (subconj. C), en los tres casos p-Valor > 0,05 que indica igualdad de distribuciones, se verificó con el test de Mann-Whitney ( $\alpha = 0,05$ ), la vitamina C (subconj. D) es significativamente diferente a las demás.

En el ANOVA (ANEXO No. 8) se obtuvo un p-Valor de  $0,0007E^{-6}$  menor al nivel de significancia de 0,05 con lo que se acepta la hipótesis alternativa de diferencias múltiples para esta concentración.

**CUADRO No. 20. RESULTADO LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LOS EXTRACTOS VS LA VITAMINA C A CONCENTRACIÓN DE 1 000 ppm APLICANDO LA PRUEBA HSD DE TUKEY CON NIVEL DE CONFIANZA DEL 95,00 %. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19.**

<b>% DE INHIBICIÓN</b>					
<b>HSD de Tukey<sup>a</sup></b>					
<b>MUESTRAS</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0,05</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>PROPÓLEO</b>	3	9,8400			
<b>MIEL</b>	3		28,8233		
<b>JENGIBRE</b>	3		33,8967	33,8967	
<b>MIEL PROP.</b>	3			41,3533	
<b>VITAMINA C</b>	3				99,3700
<b>Sig.</b>		1,000	,315	,079	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

En el CUADRO No. 20 se indican los resultados obtenidos con la prueba HSD de Tukey con un nivel de confianza del 95,00 % y nivel de significancia de 0,05 en los extractos a concentración de 1 000 ppm y obteniéndose 4 subconjuntos, entre la miel y el jengibre (subconj. B) y entre el jengibre y la miel propolizada existe homogeneidad estadística con p-Valor > 0,05 que indica igualdad de distribuciones y se verifica con el test de Mann-Whitney ( $\alpha = 0,05$ ), la vitamina C (subconj. D) y el propóleo (subconj. C) son significativamente diferentes.

En el ANOVA (ANEXO No. 8) se determinó un p-Valor de  $0,0008E^{-7}$ , menor al nivel de significancia de 0,05 lo que permite aceptar la hipótesis alternativa de las diferencias múltiples entre las muestras a esta concentración.

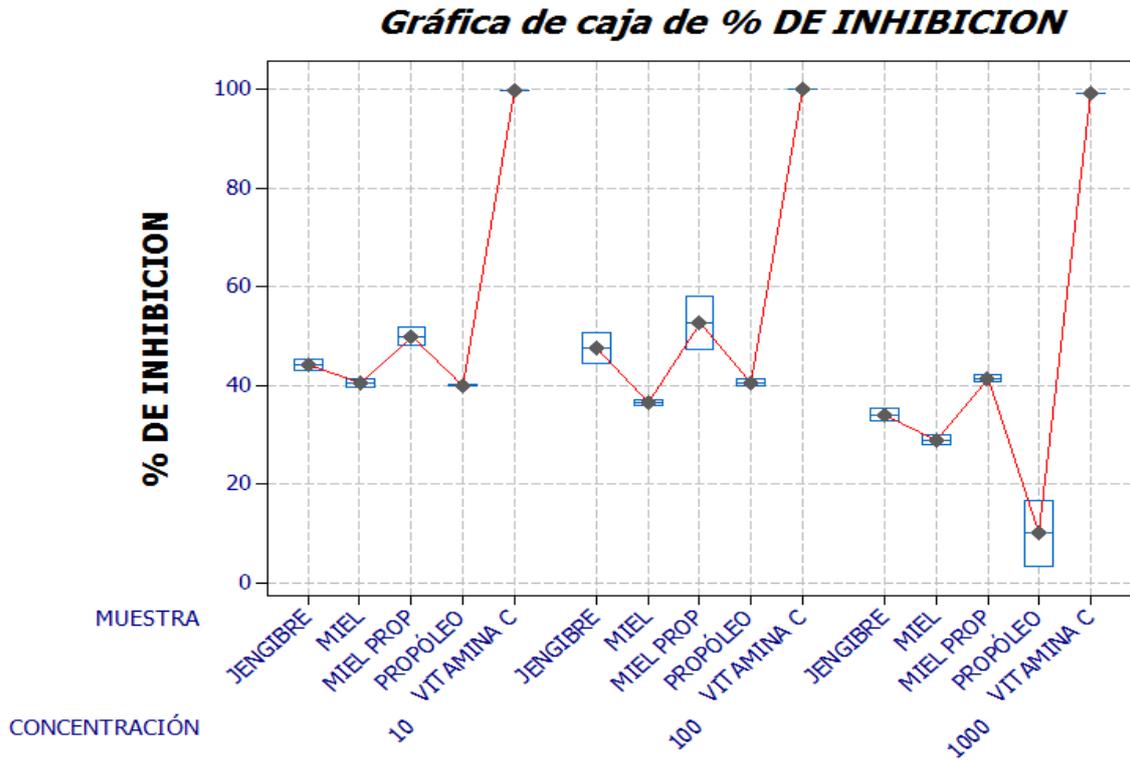


GRÁFICO No. 11. DIAGRAMA DE CAJAS DE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS EN CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1 00 ppm. PROGRAMA ESTADÍSTICO MINITAB 16.

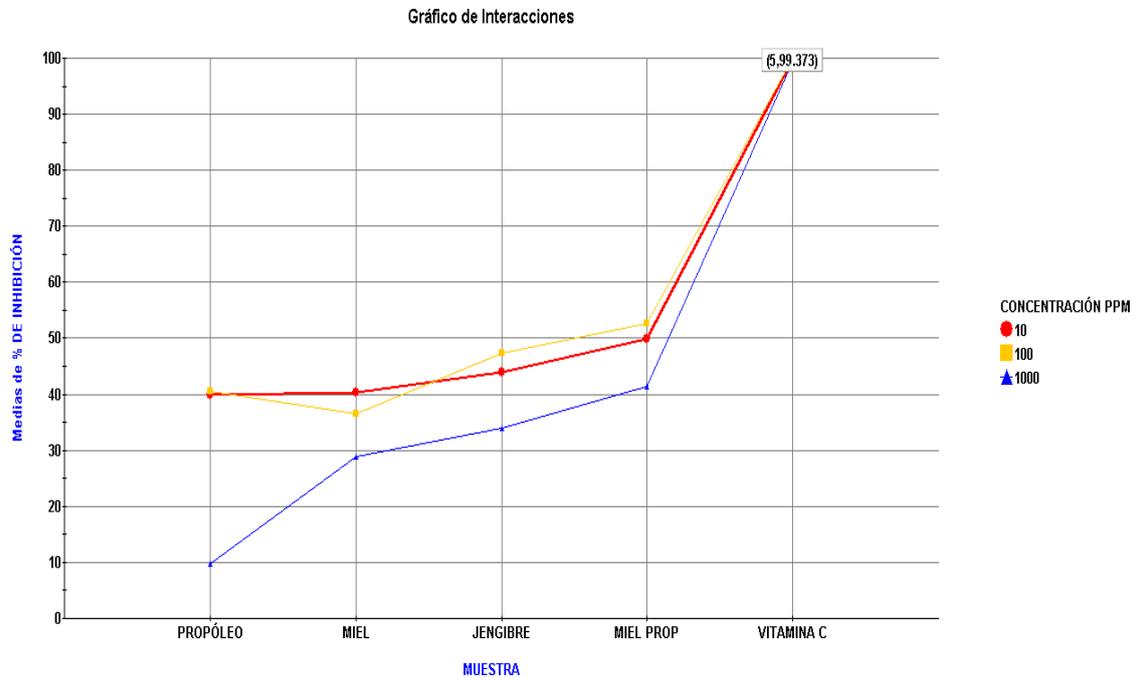


GRÁFICO No. 12. DIAGRAMA DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS PARA CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1 000 ppm. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT.

En base al GRÁFICO No. 11 donde se representan las cajas de % de inhibición a las tres concentraciones de los extractos, los datos del jengibre y la miel propolizada a 100 ppm y del propóleo a 1 000 ppm presentan mayor dispersión entre ellos, en este último caso se debe a la dificultad para realizar la medición lo que amplió la variación entre estos datos, en tanto que para los datos de las otras muestras se aprecia una dispersión cerrada entre los datos, lo que indica una buena precisión en el método empleado para la determinación de la actividad antioxidante.

En el GRÁFICO No. 12 observamos la interacción entre las medias de cada muestra a las tres concentraciones en donde la miel propolizada presento el mayor porcentaje de inhibición en los tres casos. El orden creciente por % de inhibición fue: propóleo, miel, jengibre, miel propolizada y vitamina C.

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

1. Con el análisis de parámetros físicos y químicos en base a normas técnicas nacionales e internacionales, tanto en las materias primas y en el producto terminado se establece que no existe una alteración evidente entre el valor nutritivo de Materia Prima vs. Producto final.
2. Las muestras presentaron diferentes concentraciones de compuestos fenólicos que en base a información bibliográfica son los responsables de varias propiedades biológicas como la actividad antioxidante en el propóleo, miel y jengibre. En la miel propolizada el poder antioxidante se vio incrementado por la presencia en la miel de vitamina C, antioxidante de poder comprobado y que por sinergismo con los compuestos fenólicos y flavonoides aportado por el propóleo y el jengibre pudieron aumentar dicha actividad biológica.
3. En todas las muestras se reportó actividad antioxidante, y presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, no se estableció una relación directa entre este contenido de componentes biológicamente activos y la actividad antioxidante, ya que un alto contenido de los mismos no asegura una mayor actividad. El método de inhibición de la polifenoloxidasas, cuya actividad se pudo medir con el control de parámetros físicos como temperatura y tiempo, lo que aseguró un ensayo bajo condiciones controladas y permitió obtener resultados que reflejan la acción de los antioxidantes a nivel biológico.
4. Se ratificó la hipótesis alternativa planteada para esta investigación verificándose que la miel Propolizada presentó un mayor poder antioxidante en comparación a la miel,

propóleo y jengibre, lo que la convierte en un nutracéutico que a más de proporcionar energía por el alto contenido de carbohidratos en especial azúcares simples (glucosa y fructosa) le proporciona al organismo otros componentes (fenoles y flavonoides) que ayudaran en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas y a mantener una condición de salud adecuada por la amplia gama de actividades biológicas que estos componentes brindan.

## **CAPÍTULO V**

### **5. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda realizar investigaciones sobre el potencial de los propóleos para la industria farmacéutica y cosmética además de que se debe establecer un protocolo en nuestro país para garantizar una buena calidad del mismo considerando la gran variedad botánica que existe en el Ecuador.
2. En las mieles se recomienda realizar una caracterización de las mismas en base a su Actividad Antioxidante y a su origen botánico usando métodos más confiables para la determinación de esta propiedad y con ello establecer un rango de calidad en base a estos parámetros.
3. En el jengibre se deben realizar más investigaciones sobre su poder antioxidante y su empleo en formulaciones fitofarmacéuticos.
4. Se recomienda aplicar métodos combinados para la determinación de la actividad antioxidante en los cuales se aplique técnicas químicas, enzimáticas y pruebas in vivo para obtener resultados verificables a nivel biológico.

## CAPÍTULO VI

### 6. RESUMEN

Se determinó el Potencial Nutracéutico y la Actividad Antioxidante de la Miel Propolizada elaborada en la empresa Apicare Cía. Ltda. de la ciudad de Riobamba. La investigación se efectuó en laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. La importancia del estudio radicó en verificar mediante ensayos químicos y enzimáticos la actividad inhibitoria de radicales libres capaces de alterar determinadas funciones biológicas, con un producto que aporta componentes nutritivos y activamente biológicos contra dichos radicales.

Se realizó el control de calidad de materias primas, en miel aplicando la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1 572 y propóleo con la Norma Rusa RTS-RSFSR-317-77. Se usó el método de Folin-Ciocalteau para cuantificar compuestos fenólicos, los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (GA) por 100 g de muestra, se determinó los siguientes valores: 2 911 mg en propóleo, 141 mg en miel, 1 592 mg en jengibre y 149 mg en miel propolizada, para flavonoides se aplicó el método del  $AlCl_3$ , se reportó valores en mg de catequina por 100 g de muestra de 3 192 mg, 19 mg, 386 mg y 36 mg para la respectiva muestra analizada, indicada anteriormente. La concentración de analito con mejor actividad antioxidante, validando el método de inhibición enzimática de polifenoloxidasas, reportada en miel propolizada corresponde a 100 ppm con 52,51 % superando al jengibre con 47,37 %, el propóleo con 40,40 % y la miel con 36,45 %. Concluimos que combinando miel con propóleo y jengibre existe mejor actividad antioxidante en comparación a materias primas por separado, categorizando al producto como un alimento con alto beneficio para la salud humana. Se recomienda realizar estudios aplicando otros métodos para cuantificar actividad antioxidante que complementen la presente investigación.

## SUMMARY

Nutraceutical Potential and Antioxidant Activity of propelized honey made by Apicare Company in the city of Riobamba were determined. The research was performed in the laboratory of the Faculty of Sciences at Superior Polytechnic School of Chimborazo. The importance of this study is to verify the inhibitory activity of free redicals that are able to alter some biological functions through enzymatic and chemistry essays.

The quality control of raw material in honey by applying the Technical Ecuadorian Norm INEN 1 572 and propel with the Russian Norm RTS-RSFSR-317-77 was applied. Folin-Ciocalteau method was used in order to quantify phenolic compounds; the results were expressed like mg of Gallic Acid (GA) by 100 g of sample, the following values were determined: 2 911 mg in própolis, 141 mg in honey, 1 592 mg in ginger and 149 mg in propelized honey, for flavonoids the  $AlCl_3$  method was applied, some values of mg of catechin were reported by 100 g of sample from 3 192 mg, 19 mg, 386 mg and 36 mg to the respective sample analyzed, mention before. The concentration of analyte with better antioxidant activity, validating the inhibition enzymatic method of polyphenoloxidase, reported on propelized honey corresponds to 100 ppm with 52,51 %, going upper ginger with 47,37 %, the propelis with 40,40 % and honey with 36,45 %. It is concluded that combining honey with propelis and ginger, a better antioxidant activity is present in comparison to raw material isolated. The product is categorized as good food for human consume. Performing studies through other methods in order to quantify antioxidant activity that complements this research is recommended.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **FONNEGRA, G. y otros.**, Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2da. Ed., Medellín - Colombia., Editorial Universitaria., 2007., Pp. 150-152.
2. **LUCERO, O.**, Guía de Prácticas de Bromatología I., S. ed., Riobamba - Ecuador., Editorial ESPOCH., 2011., Pp. 8-16.
3. **MACE, H.**, Manual completo de Apicultura., 2da. Ed., México D.F. - México., Continental S.A., 1985., Pp. 17, 203-229.
4. **NETZER, C.**, El gran libro de las curas milagrosas., 6ta. Ed., Madrid - España., EDAF. S.L., 2008., Pp. 239.

5. **PIERRE, J.**, Apicultura., 2da. Ed., Madrid - España., Mundi-Prensa., 1985., Pp. 292-328.
  
6. **POLAIVO, C.**, Manual Práctico del Apicultor., 4ta. Ed., Madrid - España., Cultural S.A., 2009., Pp. 269-282, 286-292.
  
7. **VILLAMAR, B.**, Producción y Comercialización de la miel de Abejas., 1ra. Ed., Lima - Perú., Palomino E.I.R.L., 2001., Pp. 57-90, 107-121.
  
8. **HERRERO, F.**, Lo que usted debe saber sobre las Abejas y la Miel., Cartilla de divulgación 16., Palencia - España., Caja., 2004., Pp. 5-11, 33-45.
  
9. **VIT, P.**, Iniciación a la Apiterapia., 1ra ed., Mérida - Venezuela., Venezolana, C.A., 2006., Pp. 7-9, 18-20.
  
10. **ABATE, J.**, La verdad sobre los Antioxidantes., Revista Tendencias., Vol. 14., Estados Unidos., 2013., Pp. 1.
  
11. **AL-DAODY, A. y otros.**, Chromatographic identification of some flavonoids compounds from "*Cyperus rotundas*" growing in Iraq., Tikrit journal., No. 1., Vol. 15., Mosul - Iraq., 2010., Pp. 1-5.

12. **ALVAREZ, S.**, Caracterización organoléptica y físico-química de Propóleos del Departamento de La Libertad, Perú., Revista The Biologist., No. 1., Vol. 10., Lima – Perú., 2012., Pp. 1-7.
  
13. **AVILÉS, H. y otros.**, Análisis Comparativo de la Calidad Físicoquímica, Microbiológica y Organoléptica de la Miel de Abeja (*Apis mellifera*) Producida en Diferentes Regiones de Perú., Revista de Investigación Universitaria., Universidad Peruana Unión., No. 1., Vol. 1., Perú., 2009., Pp. 1-7.
  
14. **CRUZADO, L. y otros.**, Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos., Revista Médica Vallejana., No. 2., Vol. 4., Lima - Perú., 2007., Pp. 1-14.
  
15. **ENRÍQUEZ, A. y otros.**, Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú., Revista Médica Vallejana., No. 1., Vol. 5., Junín - Perú., 2008., Pp. 3-11.
  
16. **GARCIA, Y. y otros.**, Potencial acción arteroprotectora de algunos productos apícolas., Revista CENIC., No. 2., Vol. 43., La Habana - Cuba., 2012., Pp. 1-9.

17. **GUTIÉRREZ, M. y otros.,** Miel de abejas: Una fuente de Antioxidantes., Revista Fuerza Farmacéutica., No. 12., Vol. 1., Mérida - Venezuela., 2008., Pp. 1-5.
  
18. **LOPEZ, A. y otros.,** Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades., Revista ANACEM., No. 1., Vol. 6., Zacatecas - México., 2012., Pp. 49-51.
  
19. **LOZINA, L. y otros.,** Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos., Revista Latinoamericana de Farmacia., No. 1., Vol. 29., Corrientes - Argentina., 2010., Pp. 1-9.
  
20. **MARTÍNEZ, J. y otros.,** Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección., Revista MVZ., No. 1., Vol. 17., Córdoba - España., 2012., Pp. 1-9.
  
21. **MAYOR, R.,** Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante., Revista del Instituto Médico Tropical., No. 2., Vol. 5., Asunción - Paraguay., 2010., Pp. 1-6.
  
22. **MAYTA, T. y otros.,** Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología., Revista Estomatol Herediana., No. 1., Vol. 22., Lima - Perú., 2012., Pp. 50-58.

- 23. MUÑOZ, O. y otros.,** Contenido de Flavonoides y Compuestos Fenólicos de mieles chilenas e Índice Antioxidante., Revista Química Nova., No. 4., Vol. 30., Brasil., 2007., Pp. 1-4.
- 24. NAVARRO, M. y otros.,** Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, Sonora., Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud Biotecnia., No. 3., Vol. 14., Sonora - México., 2012., Pp. 2-7.
- 25. PALOMINO, L. y otros.,** Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia)., VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica., Universidad de Antioquia., No. 3., Vol. 16., Medellín - Colombia., 2009., Pp. 1-8.
- 26. PEDREÑO, Y.,** Los antioxidantes polifenólicos, un complemento alimenticio saludable., Revista Eubacteria., No. 28., Murcia - España., 2012., Pp. 1-4.
- 27. PEÑA, R.,** Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos., Ciencia e Investigación Agraria., No. 1., Vol. 35., Santiago - Chile., 2008., Pp. 1-10.

28. **REYES, A. y otros.,** Antioxidantes: La magia de lo natural., Revista Académica de Investigación TLATEMOANI., No. 8., San Luis Potosí - México., 2011., Pp. 7-8.
  
29. **SAMARA, S. y otros.,** Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca., Revista de Investigación Científica y Tecnológica., No. 1., Vol. 9., Colombia., 2011., Pp. 9-11.
  
30. **UCZAY, J. y otros.,** Evaluación del propóleo como promotor de crecimiento en la carpa común (*Cyprinus carpio*)., Revista Científica FCV-LUZ., No. 5., Vol. 21., Palmeira das Missoes - Brasil., 2011., Pp. 1-6.
  
31. **ULLOA, J. y otros.,** La miel de abeja y su importancia., Revista Fuente., No. 2., Vol. 4., Nayarit - México., 2010., Pp. 1-4.
  
32. **VILORIA, J. y otros.,** Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia)., Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial., No. 1., Vol. 10., Medellín - Colombia., 2012., Pp. 1-10.
  
33. **VIT, P. y otros.,** Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante., Bioquímica Clínica Latinoamericana.,

Universidad de los Andes., No. 2., Vol. 42., Mérida - Venezuela., 2008., Pp. 1-9.

- 34. ARGENTINA., DIRECCIÓN PROVINCIAL DE EDUCACIÓN TÉCNICO PROFESIONAL., DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN AGRARIA., (DEA),** Manual de Apicultura., Buenos Aires - Argentina., (DEA), 2009., Pp. 15-26.
- 35. CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA., (MINSAP),** Droga Cruda., Métodos de Ensayo., NRSP 309., La Habana - Cuba., (MINSAP), 1992., Pp. 1-7.
- 36. CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA., (MINSAP),** Extractos Fluidos y Tinturas., Procesos tecnológicos., NRSP 311., La Habana - Cuba., (MINSAP), 1992., Pp. 1-6.
- 37. CUBA., MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA., (MINSAP),** Extractos Fluidos y Tinturas., Métodos de Ensayo., NRSP 312., La Habana - Cuba., (MINSAP), 1992., Pp. 1-5.
- 38. ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN),** Miel de Abejas., Requisitos., NTE INEN 1 572., Quito - Ecuador., (INEN), 2013., Pp. 1-6.

39. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Miel de Abejas., Determinación de la Densidad Relativa a 27 °C y de la Humedad., NTE INEN 1 632., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-8.
  
40. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Miel de Abejas., Determinación de Azúcares Reductores Totales, Sacarosa y la relación Fructosa - Glucosa., NTE INEN 1 633., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-10.
  
41. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Miel de Abejas., Determinación de la Acidez Total., NTE INEN 1 634., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-6.
  
42. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Miel de Abejas., Determinación del contenido de Sólidos Insolubles., NTE INEN 1 635., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-6.
  
43. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Miel de Abejas., Determinación de las Cenizas., NTE INEN 1 636., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-6.

44. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Miel de Abejas., Determinación del contenido de Hidroximetilfurfural (HMF)., NTE INEN 1 637., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-6.
  
45. **ECUADOR., INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN., (INEN).,** Especias y Condimentos., Requisitos., NTE INEN 2 532., Quito - Ecuador., (INEN)., 2013., Pp. 1-10.
  
46. **MÉXICO., NORMAS MEXICANAS., DIRECCIÓN NACIONAL DE NORMAS.,** Alimentos., Miel., Especificaciones y Métodos de Prueba., NMX - F - 036., México D.F. - México., 2000., Pp. 3-20.
  
47. **PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY.,** Normas de Estándar Internacional., USP XXVIII NF 18., 1985., Pp. 1267-1268, 1477, 2258, 2262, 2268, 2296, 2309-2310.
  
48. **AMAGUAYO, S.,** Elaboración de tabletas adelgazantes a partir de tres plantas existentes en la Provincia de Chimborazo a escala piloto., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba., **TESIS.,** 2013., Pp. 65-71.

- 49. BARAHONA, V.,** Evaluación de la Actividad Antioxidante y Valor Nutracéutico de las hojas y frutos de la Guanábana (*Annona muricata*), Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba., **TESIS.**, 2013., Pp. 42-59.
- 50. FALCONI, M.,** Elaboración y control de calidad de comprimidos fitofarmacéuticos a base de extractos de Manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*), Ajo (*Allium sativum*) y Jengibre (*Zingiber officinale*), Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Riobamba., **TESIS.**, 2011., Pp. 83-85.
- 51. MEDINA, M.,** Flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad., Facultad de Ciencias., Escuela de Química y Farmacia., Universidad Austral de Chile., Valdivia - Chile., **TESIS.**, 2012., Pp. 3-17, 32-36.
- 52. OBANDO, Y. y otros.,** Elaboración de un producto soluble a base de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) saborizada con limoncillo (*Cymbopogon citratus*), Facultad de Tecnologías., Escuela de Química., Universidad Tecnológica de Pereira., Pereira - Colombia., **TESIS.**, 2009., Pp. 48-77.
- 53. PALADINO, S.,** Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera l.*),

Facultad de Ciencias Agrarias., Universidad Nacional de Cuyo., Mendoza - Argentina., **TESIS.**, 2011., Pp. 12-15.

**54. RODRÍGUEZ, Y. y otros.,** Caracterización Físico-química y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento del Atlántico, Colombia., Facultad de Ciencias., Universidad Nacional de Colombia., Medellín, Antioquia - Colombia., **TESIS.**, 2012., Pp. 1-2.

**55. ZANDALEMA, E.,** Caracterización Físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique., Facultad de Veterinaria., Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos., Universidad Autónoma de Barcelona., Barcelona - España., **TESIS.**, 2008., Pp. 97-134.

#### **BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET**

**56. ALVARADO, L., BENEFICIOS DEL PROPÓLEO**

<http://www.gftaognosticaespiritual.org/wp-content/uploads/2013/07/17>

**57. ANTIOXIDANTES**

<http://www.alimentacionsana.com.ar/actualizaciones/nutrace>  
2013/09/18

**58. APACAME., NORMAS DE BRASIL., REGLAMENTO  
TÉCNICO PARA LA CALIFICACIÓN E  
IDENTIFICACIÓN DE LAS CUALIDADES DEL  
PROPÓLEO**

<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>

2013/10/09

**59. APICARE., HISTORIA**

<http://apicare.com.ec/index.html>

2013/07/22

**60. DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y  
ANTIOXIDANTES**

<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a13.pdf>

2013/09/14

**61. ECOFLOR., EL ORO PÚRPURA DE LAS ABEJAS, EL  
PROPÓLEO**

<http://www.ecoflores.com/documentos/ecoflor%20-%20pdf>

2013/05/22

**62. FUNDACIÓN EROSKI., LA MIEL ALIMENTO NUTRITIVO**

<http://ideasana.fundacioneroski.es/web/es/16/escuelapdf>

2013/10/24

**63. IKERKETAK., PROPÓLEO, EL “ANTIBIÓTICO” NATURAL  
DE LA COLMENA**

[http://www.kultura.ejgv.euskadi.net/contenidos/boletin\\_revist  
2013/10/21](http://www.kultura.ejgv.euskadi.net/contenidos/boletin_revist2013/10/21)

**64. JENGIBRE., ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS**

<http://www.doymafarma.com/jengibre.pdf>  
2013/04/02

**65. JENGIBRE., GENERALIDADES DEL RIZOMA**

<http://www.minec.gob.sv/caja/images/stories/fichas/hondupdf>  
2013/08/08

**66. LA EXCELENCIA DE LOS ANTIOXIDANTES**

<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/33797/1/arpdf>  
2013/09/14

**67. LABORATORIOS ABIES., JENGIBRE**

<http://www.laboratoriosabies.com/pdf/01%20-%20Jengibpdf>  
2013/09/22

**68. LLORENTE MARTÍNEZ, J., PRODUCTOS DE LA  
APICULTURA: MIEL**

<http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a13.pdf>  
2013/07/15

**69. MEDIGRAPHIC ARTEMISA., LOS NUTRACÉUTICOS. LO  
QUE ES CONVENIENTE SABER**

<http://www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-2009/sp093h.pdf>

2013/07/21

**70. MALDONADO, L. y otros., PROPOLEOS, PASADO Y  
PRESENTE**

<http://www.biblioteca.org.ar/libros/210155.pdf>

2013/10/15

**71. NATIONAL HONEY BOARD**

<http://www.honey.com/>

2013/10/17

**72. NUTRACÉUTICA ACTUAL**

<http://nutraceuticaactual.blogspot.com/2007/07/nutraceutico.>

2013/07/20

**73. PRODUCTOS APÍCOLAS**

<http://www.ual.es/personal/tcabello/Temarios/ApiTema10pdf>

2013/10/11

**74. PROPIEDADES MEDICINALES DEL PROPÓLEO**

<http://www.cursos-autosanacion.e/Propiedades-Medicinapdf>

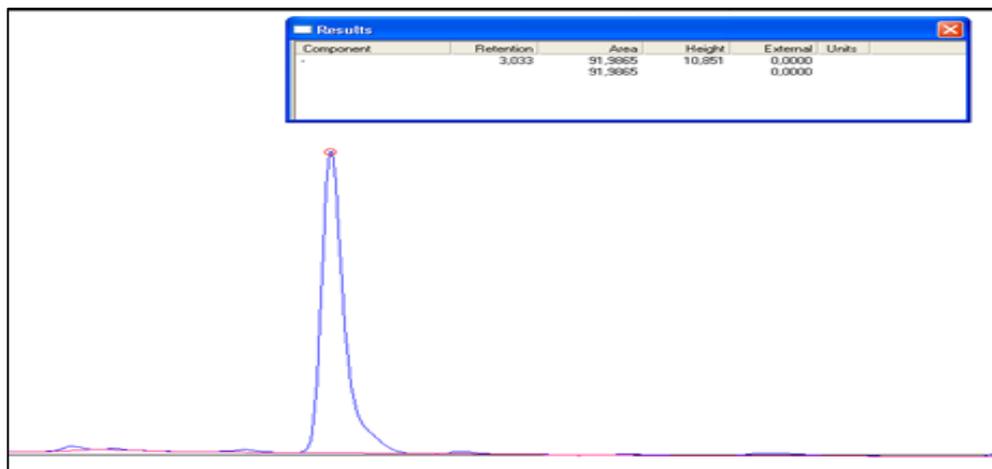
2013/07/25

**75. REDALYC., EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE DEL PROPÓLEOS DE LA REGIÓN  
DE MANZANILLO. PROVINCIA GRANMA. CUBA**  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=576>  
2013/08/16

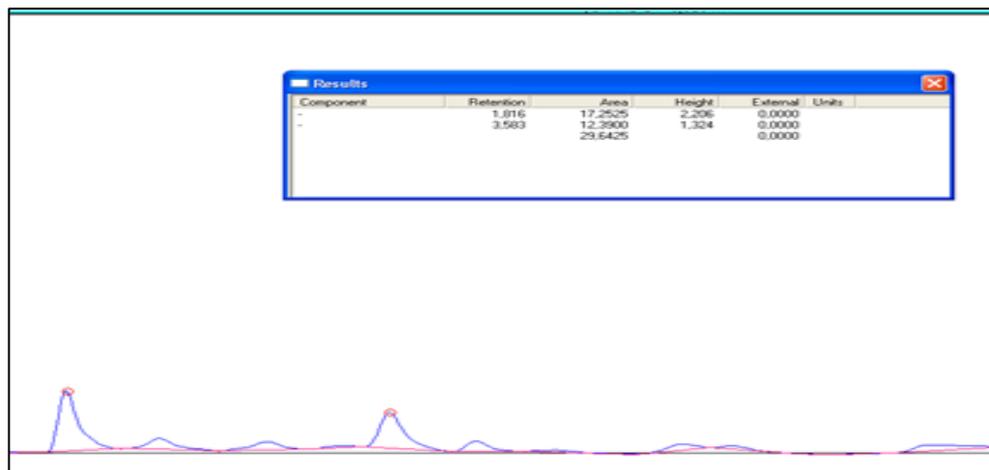
## CAPÍTULO VIII

### 8. ANEXOS

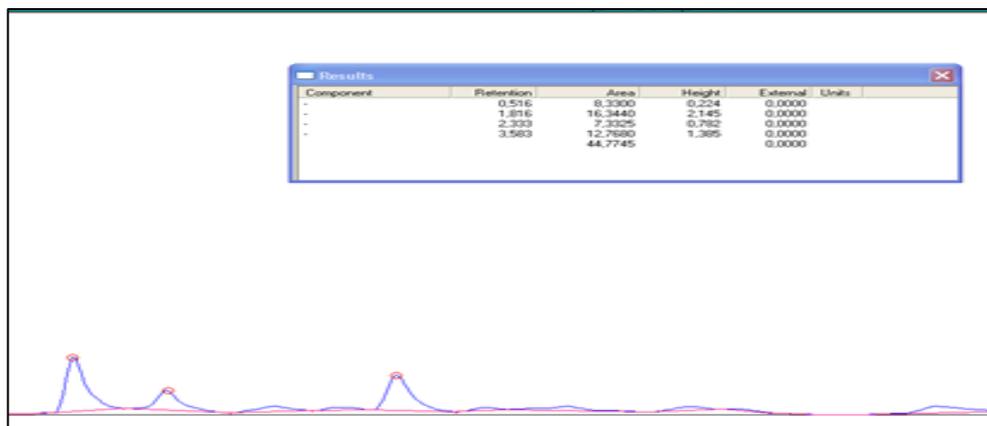
#### ANEXO No. 1. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE VITAMINA C.



#### ANEXO No. 2. CROMATOGRAMA DE VITAMINA C EN LA MIEL DE ABEJA.



**ANEXO No. 3. CROMATOGRAMA DE VITAMINA C EN LA MIEL PROPOLIZADA.**

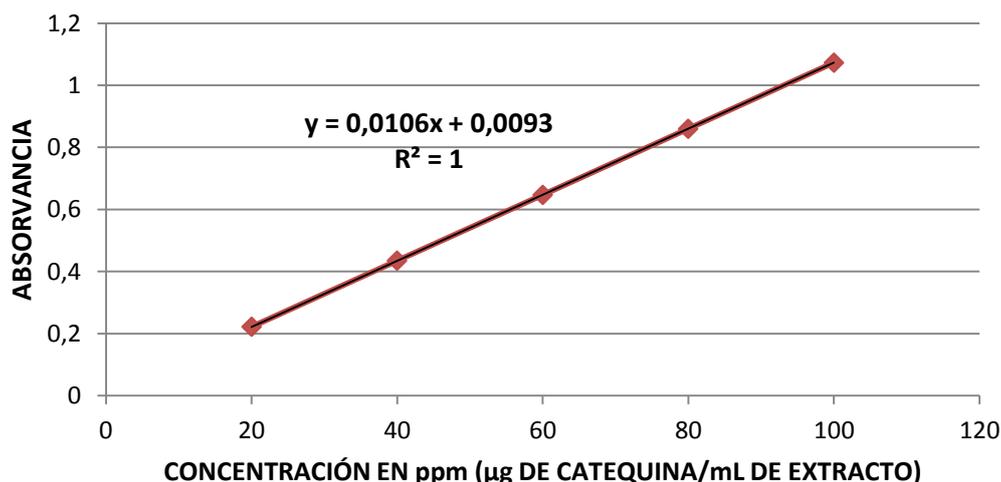


**ANEXO No. 4. ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE CATEQUINA COMO PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.**

**CUADRO No. 21. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES USANDO CATEQUINA COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 20, 40, 60, 80 Y 100 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

Concentración (ppm)	Absorbancia a 510 nm
20	0,222
40	0,435
60	0,647
80	0,860
100	1,073

HERNÁNDEZ, L. (2013)



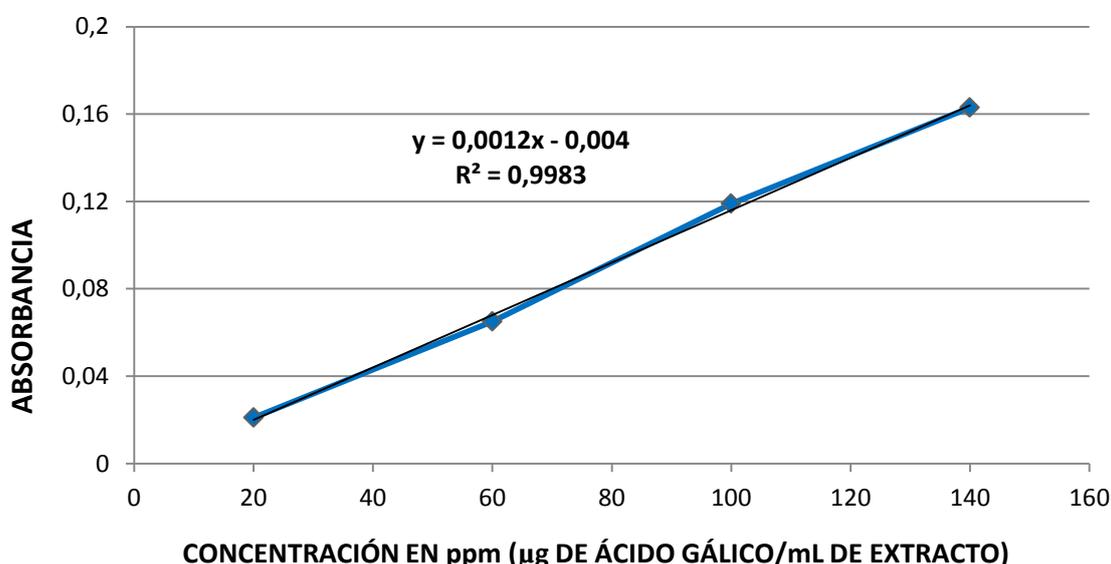
**GRÁFICO No. 13. CURVA DE ABSORVANCIA VS CONCENTRACIÓN DE RUTINA EN CONCENTRACIONES DE 20, 40, 60, 80 Y 100 PPM, PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. SEPTIEMBRE DEL 2013.**

**ANEXO No. 5. ELABORACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.**

**CUADRO No. 22. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 20, 60, 100 Y 140 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

Concentración (ppm)	Absorbancia a 765 nm
20	0,021
60	0,065
100	0,119
140	0,163

HERNÁNDEZ, L. (2013)



**GRÁFICO No. 14. CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO EN CONCENTRACIONES DE 20, 60, 100 Y 140 PPM, PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

**CUADRO No. 23. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES USANDO ÁCIDO GÁLICO COMO PATRÓN EN CONCENTRACIONES DE 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 Y 2 000 PPM. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.**

Concentración (ppm)	Absorbancia a 765 nm
500	0,558
800	0,819
1 100	1,055
1 400	1,287
1 700	1,476
2 000	1,735

HERNÁNDEZ, L. (2013)

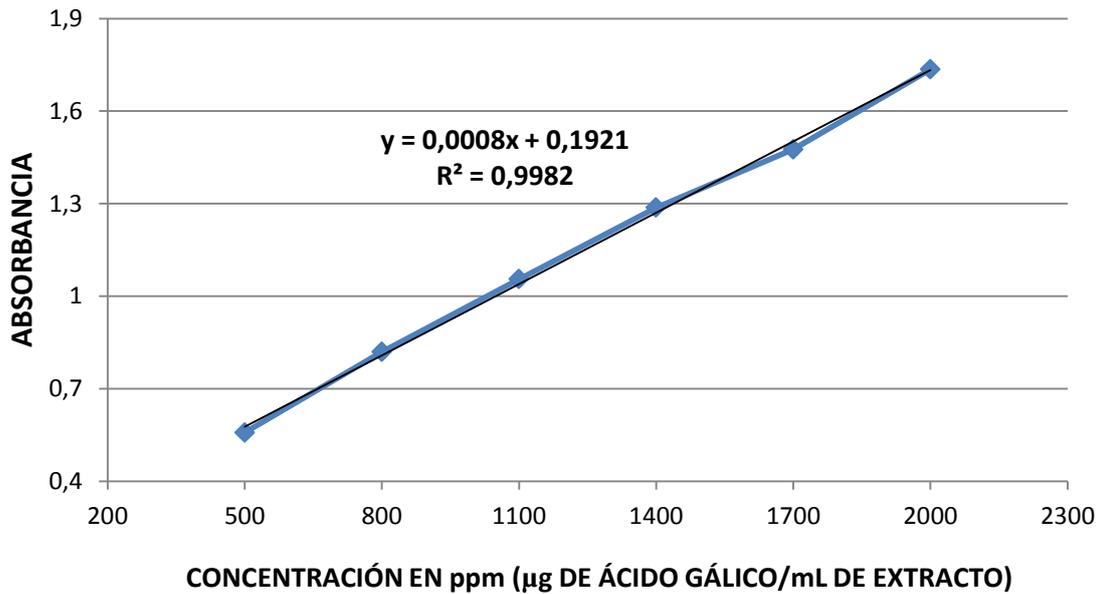


GRÁFICO No. 15. CURVA DE ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO EN CONCENTRACIONES DE 500, 800, 1 100, 1 400, 1 700 Y 2 000 PPM PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES. LABORATORIO DE QUÍMICA INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO DEL 2013.

ANEXO No. 6. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS BROMATOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE LA MIEL Y MIEL PROPOLIZADA. PROGRAMA ESTADÍSTICO G-STAT 2.1. SOFTWARE LIBRE.

CUADRO No. 24. TEST STUDENT DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD.

05/12/2013 04:02

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de HUMEDAD por MUESTRAS

Variable Respuesta:	HUMEDAD	
Variable Explicativa:	MUESTRAS	
Grupo	MIEL	MIEL PROP
Tamaños Muestrales	3	3
Medias:	18.9000	26.4000
Desviaciones Típicas:	0.1000	0.2000
E. E. de las Medias:	0.0577	0.1155

Varianza Conjunta: 0.0250  
E. E. de la Diferencia de Medias: 0.1291

Grados de Libertad: 4.0000  
Diferencia de Medias: -7.5000

Estimación

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: -7.5000 +/- 0.3584 [-7.8584, -7.1416]

t-Student

Hipótesis Nula: diferencia de medias = 0.0000  
Hipótesis Alternativa: no igual  
t-Student: -58.0948  
p-valor: 0.0005E-3

**CUADRO No. 25. TEST STUDENT DEL PORCENTAJE DE AZÚCARES TOTALES.**

05/12/2013 04:17

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de AZUCARES TOTALES por MUESTRAS

Variable Respuesta: AZUCARES TOTALES  
Variable Explicativa: MUESTRAS

Grupo	MIEL	MIEL PROP
Tamaños Muestrales	3	3
Medias:	79.0000	72.0500
Desviaciones Típicas:	2.0000	0.0500
E. E. de las Medias:	1.1547	0.0289

Varianza Conjunta: 2.0012  
E. E. de la Diferencia de Medias: 1.1551

Grados de Libertad: 4.0000  
Diferencia de Medias 6.9500

Estimación

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: 6.9500 +/- 3.2070 [3.7430, 10.1570]

t-Student

Hipótesis Nula: diferencia de medias = 0.0000  
Hipótesis Alternativa: no igual  
t-Student: 6.0170  
p-valor: 0.0038

**CUADRO No. 26. TEST STUDENT DEL PORCENTAJE DE CENIZAS.**

05/12/2013 04:28

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de CENIZAS por MUESTRAS

Variable Respuesta: CENIZAS  
Variable Explicativa: MUESTRAS

Grupo	MIEL	MIEL PROP
Tamaños Muestrales	3	3
Medias:	0.1159	0.1545
Desviaciones Típicas:	0.0310	0.0262
E. E. de las Medias:	0.0179	0.0151

Varianza Conjunta: 0.0008  
E. E. de la Diferencia de Medias: 0.0234

Grados de Libertad: 4.0000  
Diferencia de Medias -0.0386

Estimación

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: -0.0386 +/- 0.0650 [-0.1036, 0.0264]

t-Student

Hipótesis Nula: diferencia de medias = 0.0000  
Hipótesis Alternativa: no igual  
t-Student: -1.6482  
p-valor: 0.1746

**CUADRO No. 27. TEST STUDENT DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA.**

05/12/2013 04:40

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de PROTEÍNA por MUESTRAS

---

Variable Respuesta:	PROTEÍNA	
Variable Explicativa:	MUESTRAS	
<b>Grupo</b>	<b>MIEL</b>	<b>MIEL PROP</b>
-----		
Tamaños Muestrales	3	3
Medias:	1.9841	1.3933
Desviaciones Típicas:	0.0690	0.1750
E. E. de las Medias:	0.0398	0.1011
-----		

Varianza Conjunta: 0.0177  
 E. E. de la Diferencia de Medias: 0.1086

Grados de Libertad: 4.0000  
 Diferencia de Medias 0.5908

**Estimación**

-----

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: 0.5908 +/- 0.3016 [0.2892, 0.8923]

**t-Student**

-----

Hipótesis Nula: diferencia de medias = 0.0000

Hipótesis Alternativa: no igual

t-Student: 5.4389

p-valor: 0.0055

**CUADRO No. 28. TEST STUDENT PARA EL PORCENTAJE DE VITAMINA C.**

05/12/2013 04:44

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de VITAMINA C por MUESTRAS

---

Variable Respuesta:	VITAMINA C	
Variable Explicativa:	MUESTRAS	
<b>Grupo</b>	<b>MIEL</b>	<b>MIEL PROP</b>
-----		
Tamaños Muestrales	3	3
Medias:	1.3622	1.4216
Desviaciones Típicas:	0.0153	0.0134
E. E. de las Medias:	0.0088	0.0078
-----		

Varianza Conjunta: 0.0002  
 E. E. de la Diferencia de Medias: 0.0117

Grados de Libertad: 4.0000  
 Diferencia de Medias -0.0595

**Estimación**

-----

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: -0.0595 +/- 0.0326 [-0.0921, -0.0269]

**t-Student**

-----

Hipótesis Nula: diferencia de medias = 0.0000

Hipótesis Alternativa: no igual

t-Student: -5.0669

p-valor: 0.0071

**CUADRO No. 29. TEST STUDENT PARA EL VALOR CALÓRICO.**

06/12/2013 18:53

Estimación y Contraste de Dos Medias Poblacionales de ENERGÍA por MUESTRAS

Variable Respuesta: **ENERGÍA**  
 Variable Explicativa: **MUESTRAS**

Grupo	MIEL	MIEL PROP.
Tamaños Muestrales	3	3
Medias:	1354.0567	1229.9333
Desviaciones Típicas:	1.1550	5.2948
E. E. de las Medias:	0.6668	3.0570

Varianza Conjunta: **14.6847**  
 E. E. de la Diferencia de Medias: **3.1289**

Grados de Libertad: **4.0000**  
 Diferencia de Medias **124.1233**

Estimación

I.C. al 95.00% para la diferencia de medias: **124.1233 +/- 8.6871 [115.4362, 132.8105]**

t-Student

Hipótesis Nula: **diferencia de medias = 0.0000**  
 Hipótesis Alternativa: **no igual**  
 t-Student: **39.6703**  
 p-valor: **0.0002E-2**

**ANEXO No. 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19. SOFTWARE LIBRE.**

**CUADRO No. 30. ANOVA, TEST DE TUKEY Y TEST DE MANN-WHITNEY A NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0,05 Y CONFIANZA DEL 95,00 % PARA LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES.**

**ANOVA**

**FLAVONOIDES TOTALES**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	21124759,433	3	7041586,478	49863,024	,000
Intra-grupos	1129,749	8	141,219		
Total	21125889,182	11			

**Comparaciones múltiples  
FLAVONOIDES TOTALES**

**HSD de Tukey**

(I) MUESTRAS	(J) MUESTRAS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROPÓLEO	MIEL	3173,58000 <sup>*</sup>	9,70287	,000	3142,5080	3204,6520
	JENGIBRE	2806,25667 <sup>*</sup>	9,70287	,000	2775,1847	2837,3287
	MIEL PROP.	3156,25333 <sup>*</sup>	9,70287	,000	3125,1813	3187,3253
MIEL	PROPÓLEO	-3173,58000 <sup>*</sup>	9,70287	,000	-3204,6520	-3142,5080
	JENGIBRE	-367,32333 <sup>*</sup>	9,70287	,000	-398,3953	-336,2513
	MIEL PROP.	-17,32667	9,70287	,346	-48,3987	13,7453
JENGIBRE	PROPÓLEO	-2806,25667 <sup>*</sup>	9,70287	,000	-2837,3287	-2775,1847
	MIEL	367,32333 <sup>*</sup>	9,70287	,000	336,2513	398,3953
	MIEL PROP.	349,99667 <sup>*</sup>	9,70287	,000	318,9247	381,0687
MIEL PROP.	PROPÓLEO	-3156,25333 <sup>*</sup>	9,70287	,000	-3187,3253	-3125,1813
	MIEL	17,32667	9,70287	,346	-13,7453	48,3987
	JENGIBRE	-349,99667 <sup>*</sup>	9,70287	,000	-381,0687	-318,9247

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

**FLAVONOIDES TOTALES**

**HSD de Tukey<sup>a</sup>**

MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
MIEL	3	18,5567		
MIEL PROP.	3	35,8833		
JENGIBRE	3		385,8800	
PROPÓLEO	3			3192,1367
Sig.		,346	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
<b>1</b>	La distribución de FLAVONOIDES TOTALES es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,046	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

**CUADRO No. 31. ANOVA, TEST DE TUKEY Y TEST DE MANN-WHITNEY A NIVEL DE SIGNIFICANCIA DE 0,05 Y CONFIANZA DEL 95,00 % PARA LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.**

**ANOVA**

**CONTENIDO DE FENOLES TOTALES**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15921280,612	3	5307093,537	2479091,065	,000
Intra-grupos	17,126	8	2,141		
Total	15921297,738	11			

**Comparaciones múltiples**

**CONTENIDO DE FENOLES TOTALES**

**HSD de Tukey**

(I) MUESTRAS	(J) MUESTRAS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROPÓLEO	MIEL	2770,30000*	1,19464	,000	2766,4743	2774,1257
	JENGIBRE	1319,16667*	1,19464	,000	1315,3410	1322,9923
	MIEL PROP.	2761,68333*	1,19464	,000	2757,8577	2765,5090
MIEL	PROPÓLEO	-2770,30000*	1,19464	,000	-2774,1257	-2766,4743
	JENGIBRE	-1451,13333*	1,19464	,000	-1454,9590	-1447,3077
	MIEL PROP.	-8,61667*	1,19464	,000	-12,4423	-4,7910
JENGIBRE	PROPÓLEO	-1319,16667*	1,19464	,000	-1322,9923	-1315,3410
	MIEL	1451,13333*	1,19464	,000	1447,3077	1454,9590
	MIEL PROP.	1442,51667*	1,19464	,000	1438,6910	1446,3423
MIEL PROP.	PROPÓLEO	-2761,68333*	1,19464	,000	-2765,5090	-2757,8577
	MIEL	8,61667*	1,19464	,000	4,7910	12,4423
	JENGIBRE	-1442,51667*	1,19464	,000	-1446,3423	-1438,6910

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

**CONTENIDO DE FENOLES TOTALES**

**HSD de Tukey<sup>a</sup>**

MUESTRAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
MIEL	3	140,8300			
MIEL PROP.	3		149,4467		
JENGIBRE	3			1591,9633	
PROPÓLEO	3				2911,1300
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

**ANEXO No. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS A CONCENTRACIONES DE 10, 100 Y 1 000 ppm. PROGRAMA ESTADÍSTICO SPSS 19. SOFTWARE LIBRE.**

**CUADRO No. 32. ANOVA, TEST DE TUKEY Y TEST DE MANN-WHITNEY A NIVEL DE SIGNIFICANCIA DEL 0,05 Y CONFIANZA DEL 95,00 % PARA EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS A CONCENTRACIÓN DE 10 ppm.**

**ANOVA**

**% DE INHIBICIÓN**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7774,609	4	1943,652	1726,463	,000
Intra-grupos	11,258	10	1,126		
Total	7785,867	14			

**Comparaciones múltiples**

**% DE INHIBICIÓN**

**HSD de Tukey**

(I) MUESTRAS	(J) MUESTRAS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROPÓLEO	MIEL	-,56000 <sup>*</sup>	,86633	,963	-3,4112	2,2912
	JENGIBRE	-4,20000 <sup>*</sup>	,86633	,005	-7,0512	-1,3488
	MIEL PROP.	-9,96000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-12,8112	-7,1088
	VITAMINA C	-59,90000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-62,7512	-57,0488
MIEL	PROPÓLEO	,56000 <sup>*</sup>	,86633	,963	-2,2912	3,4112
	JENGIBRE	-3,64000 <sup>*</sup>	,86633	,012	-6,4912	-,7888
	MIEL PROP.	-9,40000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-12,2512	-6,5488
	VITAMINA C	-59,34000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-62,1912	-56,4888
JENGIBRE	PROPÓLEO	4,20000 <sup>*</sup>	,86633	,005	1,3488	7,0512
	MIEL	3,64000 <sup>*</sup>	,86633	,012	,7888	6,4912
	MIEL PROP.	-5,76000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-8,6112	-2,9088
	VITAMINA C	-55,70000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-58,5512	-52,8488
MIEL PROP.	PROPÓLEO	9,96000 <sup>*</sup>	,86633	,000	7,1088	12,8112
	MIEL	9,40000 <sup>*</sup>	,86633	,000	6,5488	12,2512
	JENGIBRE	5,76000 <sup>*</sup>	,86633	,000	2,9088	8,6112
	VITAMINA C	-49,94000 <sup>*</sup>	,86633	,000	-52,7912	-47,0888
VITAMINA C	PROPÓLEO	59,90000 <sup>*</sup>	,86633	,000	57,0488	62,7512
	MIEL	59,34000 <sup>*</sup>	,86633	,000	56,4888	62,1912
	JENGIBRE	55,70000 <sup>*</sup>	,86633	,000	52,8488	58,5512
	MIEL PROP.	49,94000 <sup>*</sup>	,86633	,000	47,0888	52,7912

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

MANN-WHITNEY MIEL Vs. PROPÓLEO

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de % DE INHIBICIÓN es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,513	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

CUADRO No. 33. ANOVA, TEST DE TUKEY Y TEST DE MANN-WHITNEY A NIVEL DE SIGNIFICANCIA DEL 0,05 Y CONFIANZA DEL 95,00 % PARA EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS A CONCENTRACIÓN DE 100 ppm.

ANOVA

% DE INHIBICIÓN

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7918,258	4	1979,565	242,628	,000
Intra-grupos	81,588	10	8,159		
Total	7999,847	14			

Comparaciones múltiples

% DE INHIBICIÓN  
HSD de Tukey

(I) MUESTRAS	(J) MUESTRAS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROPÓLEO	MIEL	3,94667	2,33221	,479	-3,7288	11,6222
	JENGIBRE	-6,95667	2,33221	,081	-14,6322	,7188
	MIEL PROP.	-12,09333	2,33221	,003	-19,7688	-4,4178
	VITAMINA C	-59,52333	2,33221	,000	-67,1988	-51,8478
MIEL	PROPÓLEO	-3,94667	2,33221	,479	-11,6222	3,7288
	JENGIBRE	-10,90333	2,33221	,006	-18,5788	-3,2278
	MIEL PROP.	-16,04000	2,33221	,000	-23,7155	-8,3645
	VITAMINA C	-63,47000	2,33221	,000	-71,1455	-55,7945
JENGIBRE	PROPÓLEO	6,95667	2,33221	,081	-,7188	14,6322
	MIEL	10,90333	2,33221	,006	3,2278	18,5788
	MIEL PROP.	-5,13667	2,33221	,254	-12,8122	2,5388
	VITAMINA C	-52,56667	2,33221	,000	-60,2422	-44,8912
MIEL PROP.	PROPÓLEO	12,09333	2,33221	,003	4,4178	19,7688
	MIEL	16,04000	2,33221	,000	8,3645	23,7155
	JENGIBRE	5,13667	2,33221	,254	-2,5388	12,8122
	VITAMINA C	-47,43000	2,33221	,000	-55,1055	-39,7545
VITAMINA C	PROPÓLEO	59,52333	2,33221	,000	51,8478	67,1988
	MIEL	63,47000	2,33221	,000	55,7945	71,1455
	JENGIBRE	52,56667	2,33221	,000	44,8912	60,2422
	MIEL PROP.	47,43000	2,33221	,000	39,7545	55,1055

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

**MANN-WHITNEY MIEL Vs. PROPÓLEO**

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de % DE INHIBICIÓN es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,050	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

**MANN-WHITNEY PROPÓLEO Vs. JENGIBRE**

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de % DE INHIBICIÓN es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,050	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

**MANN-WHITNEY JENGIBRE Vs. MIEL PROPOLIZADA**

**Resumen de prueba de hipótesis**

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de % DE INHIBICIÓN es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,275	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

**CUADRO No. 34. ANOVA, TEST DE TUKEY Y TEST DE MANN-WHITNEY A NIVEL DE SIGNIFICANCIA DEL 0,05 Y CONFIANZA DEL 95,00 % PARA EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS A CONCENTRACIÓN DE 1 000 ppm.**

**ANOVA**

**% DE INHIBICIÓN**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13689,400	4	3422,350	368,579	,000
Intra-grupos	92,853	10	9,285		
Total	13782,252	14			

Comparaciones múltiples

% DE INHIBICIÓN  
HSD de Tukey

(I) MUESTRAS	(J) MUESTRAS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROPÓLEO	MIEL	-18,98333*	2,48801	,000	-27,1716	-10,7951
	JENGIBRE	-24,05667*	2,48801	,000	-32,2449	-15,8684
	MIEL PROP.	-31,51333*	2,48801	,000	-39,7016	-23,3251
	VITAMINA C	-89,53000*	2,48801	,000	-97,7182	-81,3418
MIEL	PROPÓLEO	18,98333	2,48801	,000	10,7951	27,1716
	JENGIBRE	-5,07333	2,48801	,315	-13,2616	3,1149
	MIEL PROP.	-12,53000*	2,48801	,004	-20,7182	-4,3418
	VITAMINA C	-70,54667*	2,48801	,000	-78,7349	-62,3584
JENGIBRE	PROPÓLEO	24,05667	2,48801	,000	15,8684	32,2449
	MIEL	5,07333	2,48801	,315	-3,1149	13,2616
	MIEL PROP.	-7,45667	2,48801	,079	-15,6449	,7316
	VITAMINA C	-65,47333*	2,48801	,000	-73,6616	-57,2851
MIEL PROP.	PROPÓLEO	31,51333	2,48801	,000	23,3251	39,7016
	MIEL	12,53000*	2,48801	,004	4,3418	20,7182
	JENGIBRE	7,45667	2,48801	,079	-,7316	15,6449
	VITAMINA C	-58,01667*	2,48801	,000	-66,2049	-49,8284
VITAMINA C	PROPÓLEO	89,53000*	2,48801	,000	81,3418	97,7182
	MIEL	70,54667*	2,48801	,000	62,3584	78,7349
	JENGIBRE	65,47333*	2,48801	,000	57,2851	73,6616
	MIEL PROP.	58,01667*	2,48801	,000	49,8284	66,2049

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

MANN-WHITNEY MIEL Vs. JENGIBRE

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de % DE INHIBICIÓN es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,050	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

MANN-WHITNEY JENGIBRE Vs. MIEL PROPOLIZADA

Resumen de prueba de hipótesis

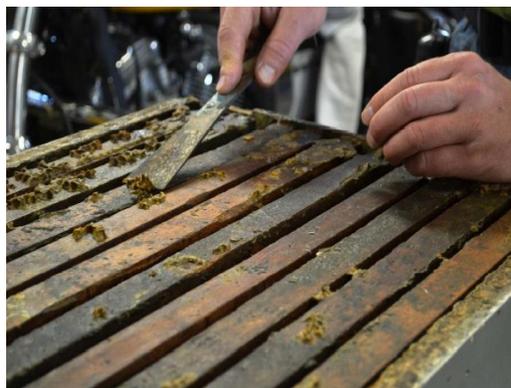
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de % DE INHIBICIÓN es la misma entre las categorías de MUESTRAS.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,050	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

**ANEXO No. 9. RECOLECCIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS.**



**MIEL**



**PROPÓLEO**



**JENGIBRE**

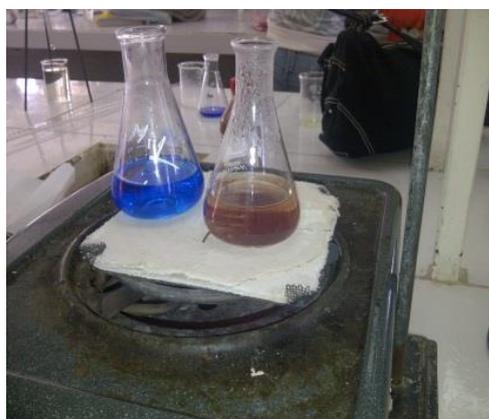
**MIEL PROPOLIZADA**

**FOTOGRAFÍA No. 4. MATERIAS PRIMAS USADAS PARA LA ELABORACIÓN DE LA MIEL PROPOLIZADA.**

**ANEXO No. 10. CONTROL DE CALIDAD DE LA MIEL DE ABEJA.**



**HUMEDAD**



**AZÚCARES REDUCTORES  
TOTALES Y SACAROSA**



**CENIZAS**



**SÓLIDOS INSOLUBLES**



**ACIDEZ**



**HIDROXIMETILFURFURAL**

**FOTOGRAFÍA No. 5. PRUEBAS FÍSICO - QUÍMICAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA MIEL.**

**ANEXO No. 11. CONTROL DE CALIDAD DEL PROPÓLEO.**



**CERAS**

**IMPUREZAS MECÁNICAS**



**ÍNDICE DE OXIDACIÓN**

**FLAVONOIDES**



**CONTENIDO DE FLAVONOIDES**

**ÍNDICE DE YODO**

**FOTOGRAFÍA No. 6. PRUEBAS FÍSICO – QUÍMICAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DEL PROPÓLEO.**

**ANEXO No. 12. CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.**



**EXTRACTOS ETANÓLICOS**



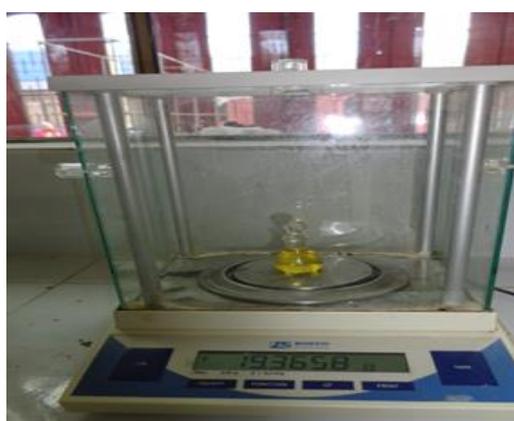
**CENIZAS TOTALES**



**CENIZAS SOLUBLES EN H<sub>2</sub>O E  
INSOLUBLES EN HCl**



**ÍNDICE DE REFRACCIÓN**



**DENSIDAD RELATIVA**



**pH**

**FOTOGRAFÍA No. 7. PARÁMETROS FÍSICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS**

**ANEXO No. 13. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.**

---



**ENSAYO DE RESINAS**



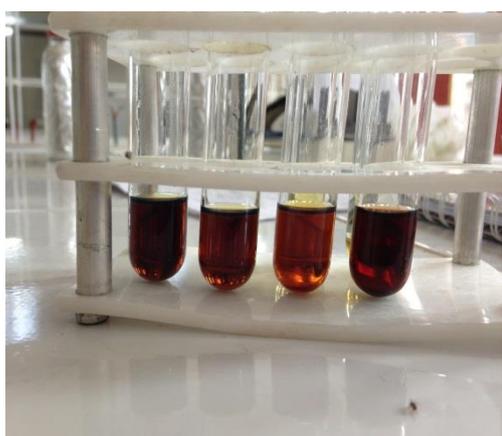
**ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS**



**ENSAYO DE BORNTRAGER**



**ENSAYO DE FEHLING**



**ENSAYO DE FeCl<sub>3</sub>**



**ENSAYO DE CATEQUINAS**

**FOTOGRAFÍA No. 8. ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS.**

**ANEXO No. 14. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES.**

---



**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**



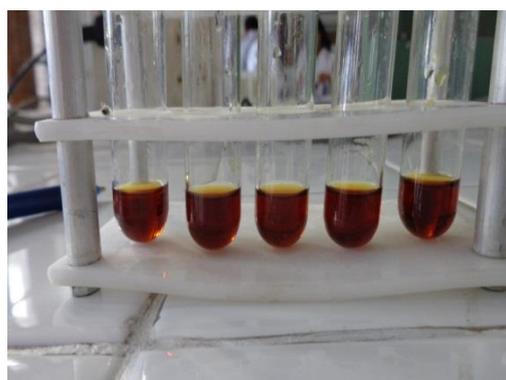
**ENSAYO DE FOLIN-CIOCALTEAU**



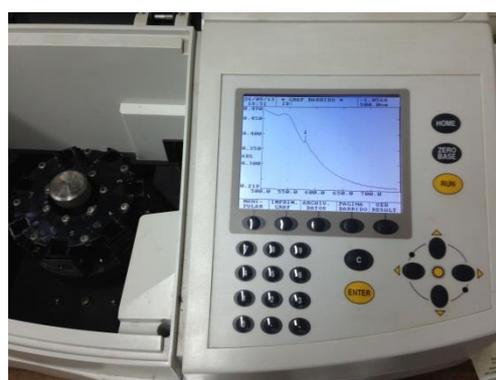
**PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN**



**ENSAYO DE  $AlCl_3$**



**PATRÓN DE RUTINA PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN**



**MEDICIÓN DE LA ABSORVANCIA A 765 nm PARA FOLIN Y 520 nm PARA  $AlCl_3$**

**ANEXO No. 15. EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PPO**

---



**PESADO DE LA MANZANA**



**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA MANZANA**



**FILTRACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO**



**REFRIGERACIÓN A -6 °C**

**FOTOGRAFÍA No. 10. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA PPO.**

**ANEXO No. 16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

---



**PRERARACIÓN DE LAS MUESTRAS**



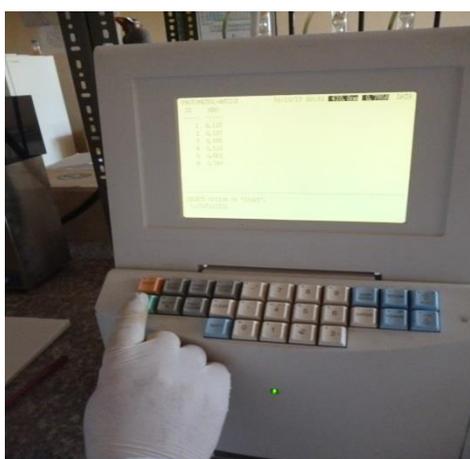
**OBTENCIÓN DE LAS DILUCIONES**



**DILUCIONES A 10, 100 Y 1 000 ppm**



**LECTURA EN EL UV**



**MEDICION A 420 nm**

ANEXO. No. 17. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

CUADRO No. 35. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOLOXIDASA.

Muestra	Concentración (ppm)	$\Delta$ Absorbancia	% Inhibición de la PPO	Promedio
<b>Blanco</b>	-	0,796	0,00	0,00
	-	0,798	0,00	
	-	0,801	0,00	
<b>Propóleo</b>	10	0,481	39,72	39,85
		0,479	39,98	
		0,480	39,85	
	100	0,469	41,23	40,48
		0,481	39,72	
		0,475	40,48	
1 000	0,772	3,26	9,84	
	0,667	16,42		
	0,7195	9,84		
<b>Miel</b>	10	0,483	39,47	40,41
		0,468	41,35	
		0,476	40,41	
	100	0,511	35,97	36,53
		0,502	37,09	
		0,507	36,53	
1 000	0,576	27,82	28,82	
	0,660	29,83		
	0,568	28,82		
<b>Jengibre</b>	10	0,456	42,86	44,05
		0,437	45,24	
		0,447	44,05	
	100	0,445	44,24	47,43
		0,394	50,63	
		0,4195	47,43	
1 000	0,538	32,58	33,89	
	0,517	35,21		
	0,528	33,89		
<b>Miel Propolizada</b>	10	0,386	51,63	49,81
		0,415	47,99	
		0,401	49,81	
	100	0,335	58,02	52,57
		0,422	47,12	
		0,379	52,57	
1 000	0,473	40,73	41,35	
	0,463	41,98		
	0,468	41,35		
<b>Vitamina C</b>	10	0,002	99,75	99,75
	100	0,000	100	100
	1 000	0,005	99,37	99,37