

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE EN MUESTRAS COMERCIALES DE MIEL PROPOLIZADA**

LINA MARCELA IDROBO CAICEDO



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2019**

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE EN MUESTRAS COMERCIALES DE MIEL PROPOLIZADA**

LINA MARCELA IDROBO CAICEDO

**Trabajo de grado en modalidad de investigación presentado como requisito
para optar al título de Química**

Director:

RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ, PhD.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN).

Departamento de Química

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN**

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Director

Ricardo Benítez Benítez. Ph.D.

Jurado

Maite del Pilar Rada M. Ph.D.

Jurado

Juan Carlos Argoti B. Ph.D.

Popayán, Cauca, 31 de Enero del 2019

DEDICATORIA

A Dios por brindarme vida, salud, fortaleza y sabiduría para poder desarrollar mi carrera de pregrado con satisfacción y el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A la memoria de mi padre Víctor Manuel Idrobo, que a pesar que la vida no le alcanzó, su espíritu siempre vivirá en mí y sus sueños continuaron conmigo y hoy se están haciendo realidad.

A mi madre Ana Rocío Caicedo, por ser la fuente de mi inspiración, por ser una mujer luchadora y de gran corazón, por ser tan incondicional, por acompañarme a llorar, a reír, a soñar y por darme alas para volar sin olvidar el camino de regreso.

A mi hermana Astrid Julieth Idrobo, por sus cuidados, su compañía y por hacer de mis sueños los suyos e hinchar su corazón de orgullo al verme triunfar.

A todos ustedes gracias por demostrarme su amor, por ser mi motor, mi compañía y mi apoyo. Los amo inmensamente.

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero expresar la gratitud que siento hacia todas las personas que han estado presentes estos años. Esta carrera ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación y no hubiese sido posible sin la cooperación de todas y cada una de las personas que nombraré, muchas de las cuales han sido un fuerte soporte.

Quiero agradecer de forma muy especial a mi director de tesis, el doctor Ricardo Benítez Benítez, por permitirme hacer parte de su grupo de investigación y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de grado. Agradezco su confianza y apoyo en todo momento, sus consejos y su dedicación a mi formación como investigadora, la manera en la que ha guiado mis ideas y el haberme facilitado siempre los medios para llevarlas a cabo.

Quiero agradecer a toda mi familia. A mi madre por su continua comprensión y respaldo y ser mi apoyo incondicional. A mi hermana Astrid, por ser esencial siempre y confiar en mi capacidad para llegar hasta aquí. A mi madrina y a María Moreno por ser mis otras madres y brindarme siempre su amor.

De manera muy especial quiero agradecer a la Universidad del Cauca, a todo el personal del Departamento de Química, ya que cada uno siempre ha colaborado de forma muy positiva sin ponerme ningún impedimento. Al grupo de investigación en Química de Productos Naturales, sus profesores y estudiantes por su colaboración. A los jurados por su recepción y colaboración en la revisión del documento.

También muestro mi agradecimiento a mis compañeros de inicio de carrera: Alejandra Sarasty, Edith Muñoz, Lina Ortiz, Santiago Córdoba, Arley Jiménez y Juan Carlos Ortiz, por todos los momentos vividos durante estos años, por estar en los momentos de felicidad y sufrimiento.

Gracias a los compañeros que conocí durante el transcurso de carrera: Andrés Parra, Adrián Palechor, Andrés Delgado, Jorge Parra, Harold Bermúdez, Santiago Salamanca, Andrés Fernández, Diana Gómez, Alexis Muelas y Jeison Cortes por todos los momentos vividos, por brindarme su amistad y colaboración.

A mis amigos de la vida: Dayana Peña, Diana Caicedo, Carolina Cardona, Natalia Angulo, Natalia Bayuelo, David Ramírez, Anyela Bermúdez, Alexander Angulo y Paula Walteros por escucharme en los momentos difíciles de mi carrera, por darme siempre el apoyo y la confianza para superar los obstáculos.

A todos aquellos que no he nombrado pero que de una u otra manera han formado parte de este gran sueño.

CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	2
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 OBJETIVO GENERAL	4
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	5
4.1 MIEL	5
4.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA MIEL	5
4.3 PROPÓLEO	8
4.4 MIEL PROPOLIZADA	9
4.5 LA APICULTURA EN COLOMBIA	9
4.6 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO Y RADICALES LIBRES	10
4.7 COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	10
4.8 COMPUESTOS FENÓLICOS	11
4.9 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PRODUCTOS DE COLMENA	13
4.10 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	15
4.11 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES	16
4.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	16
4.12.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	17
4.12.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS	17
4.13 ESTUDIOS PREVIOS	18

5.	METODOLOGÍA	21
5.1	ADQUISICIÓN DE MUESTRAS	21
5.2	REQUERIMIENTOS FISICOQUÍMICOS NORMATIVOS PARA MIEL	23
5.2.1	Sólidos insolubles en agua	23
5.2.2	Contenido de humedad	23
5.2.3	Contenido aparente de azúcar reductor	24
5.2.4	Contenido aparente de sacarosa	25
5.2.5	Contenido de sustancias minerales (cenizas)	25
5.2.6	Conductividad eléctrica	26
5.2.7	Acidez libre, láctónica y total	26
5.2.8	Índice de la diastasa	27
5.3	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	28
5.3.1	Extracción en fase sólida	28
5.3.2	Extracción líquido-líquido	29
5.4	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	29
5.4.1	Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	29
5.4.2	Determinación del contenido de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio	30
5.5	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	31
5.5.1	Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH	31
5.5.2	Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de ABTS	32
5.6	DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICO	

	MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	33
5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
6.1	REQUERIMIENTOS FISICOQUÍMICOS NORMATIVOS	35
6.2	EXTRACCIONES DE COMPUESTOS FENÓLICOS	41
6.3	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	43
6.3.1	Contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	43
6.3.2	Contenido de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio.	44
6.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS DPPH Y ABTS	46
6.4.1	Actividad antioxidante por el método DPPH	46
6.4.2	Actividad antioxidante por el método de ABTS	48
6.5	DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	52
7.	CONCLUSIONES	59
8.	RECOMENDACIONES	61
9.	BIBLIOGRAFÍA	62
10.	ANEXOS	66
10.1	REACTIVOS Y EQUIPOS	66
10.1.1	Reactivos	66
10.1.2	Equipos	67
10.2	ESTADÍSTICA	68
10.2.1	Sólidos insolubles	68

10.2.2	Humedad	69
10.2.3	Contenido aparente de azúcar reductor	70
10.2.4	Cenizas	71
10.2.5	Conductividad eléctrica	72
10.2.6	pH	73
10.2.7	Acidez libre, láctónica y total	74
10.2.8	Contenido aparente de sacarosa	77
10.2.9	Índice de la diastasa	78
10.2.10	Extracción líquido - líquido	79
10.2.11	Extracción en fase sólida	81
10.2.12	Fenoles totales	82
10.2.13	Flavonoides totales	84
10.2.14	Actividad antioxidante por DPPH	85
10.2.15	Actividad antioxidante por ABTS	86
10.2.16	Coeficiente de correlación de Pearson para pruebas antioxidantes	88
10.3	ESPECTROS DE MASAS Y FRAGMENTACIONES	89
10.4	CURVAS DE CALIBRACIÓN	144
10.4.1	Fenoles totales	144
10.4.2	Flavonoides totales	145
10.4.3	Actividad antioxidante por DPPH	147
10.4.4	Actividad antioxidante por ABTS	148

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

A.A	Ácido ascórbico
Abs	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2'azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico
AG	Ácido gálico
Cat	Catequina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EEPS	Extracto etanólico propóleo Santander
EEPT	Extracto etanólico propóleo Tunía
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
HMF	Hidroximetilfurfural
Inh	Inhibición
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
MPS	Miel propolizada Santander
MPS-EFS	Miel propolizada Santander - extracción en fase sólida
MPS-ELL	Miel propolizada Santander - extracción líquido – líquido
MPT	Miel propolizada Tunía
MPT-EFS	Miel propolizada Tunía - extracción en fase sólida
MPT-ELL	Miel propolizada Tunía - extracción líquido – líquido
MS	Miel Santander
msnm	metros sobre el nivel del mar
MT	Miel Tunía
PCET	Transferencia de electrones acoplada a protones
RDA	Retro Diels-Alder
SPLET	Transferencia secuencial de protones y electrones
Trolox	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta – visible
α-T	α-Tocoferol

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características de las muestras comerciales.	22
Tabla 2. Resultados de los parámetros fisicoquímicos obtenidos para muestras de miel y miel propolizada.	36
Tabla 3. Concentraciones de los extractos.	42
Tabla 4. Contenido total de fenoles y flavonoides para las muestras de miel, extracto de propóleo, miel propolizada y sus extractos.	46
Tabla 5. Actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS para los controles, muestras de miel, extracto de propóleo, miel propolizada y sus extractos.	51
Tabla 6. Fragmentaciones de los compuestos fenólicos analizados por espectrometría de masas.	52
Tabla 7. Resultados de compuestos fenólicos presentes en las muestras.	57
Tabla 8. Reactivos y solventes.	66
Tabla 9. Equipos.	67
Tabla 10. Pruebas estadísticas para el contenido de sólidos insolubles en miel y miel propolizada.	68
Tabla 11. Pruebas estadísticas para el contenido de humedad en muestras de miel y miel propolizada.	69
Tabla 12. Pruebas estadísticas para el contenido de azúcares reductores en muestras de miel y miel propolizada.	70
Tabla 13. Pruebas estadísticas para el contenido de cenizas en muestras de miel y miel propolizada.	71
Tabla 14. Pruebas estadísticas para el contenido de conductividad eléctrica en muestras de miel y miel propolizada.	72
Tabla 15. Pruebas estadísticas para el análisis de pH en muestras de miel y miel propolizada.	73
Tabla 16. Pruebas estadísticas para el análisis de acidez libre en muestras de miel y miel propolizada.	74
Tabla 17. Pruebas estadísticas para el análisis de acidez láctica en muestras de miel y miel propolizada.	75
Tabla 18. Pruebas estadísticas para el análisis de acidez total en muestras de miel y miel propolizada.	76
Tabla 19. Pruebas estadísticas para el contenido aparente de sacarosa en	

muestras de miel y miel propolizada.	77
Tabla 20. Pruebas estadísticas para la actividad de diastasa en muestras de miel y miel propolizada.	78
Tabla 21. Pruebas estadísticas para la extracción líquido - líquido en muestras de miel y miel propolizada, expresadas como mg/mL.	79
Tabla 22. Pruebas estadísticas para la extracción líquido - líquido en muestras de miel y miel propolizada, expresadas como %m/m.	80
Tabla 23. Pruebas estadísticas para las extracciones en muestras de miel propolizada expresadas como mg/mL.	81
Tabla 24. Pruebas estadísticas para las extracciones en muestras de miel propolizada expresadas como %m/m.	82
Tabla 25. Pruebas estadísticas para el contenido de fenoles totales en muestras y extractos.	82
Tabla 26. Pruebas estadísticas para el contenido de flavonoides totales en muestras y extractos.	84
Tabla 27. Pruebas estadísticas la actividad antioxidante por DPPH en muestras y extractos.	85
Tabla 28. Pruebas estadísticas la actividad antioxidante por ABTS en muestras y extractos.	86
Tabla 29. Coeficiente de correlación de Pearson para el contenido de fenoles, flavonoides totales y actividades antioxidantes.	88
Tabla 30. Resultados para la curva de calibración de ácido gálico.	144
Tabla 31. Resultados para la curva de calibración con catequina.	145
Tabla 32. Curvas de calibración para la actividad antioxidante en la miel de Tunía.	147
Tabla 33. Curvas de calibración para la actividad antioxidante en miel de Tunía.	148

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica de las clases de ácidos fenólicos.	12
Figura 2. Estructura básica de un flavonoide.	12
Figura 3. Estructuras básicas de las clases de flavonoides.	13
Figura 4. Reacción patrón de ácido gálico con reactivo Folin-Ciocalteu ¹⁰ .	16
Figura 5. Formación del complejo catequina-Al ¹¹ .	16
Figura 6. Reacción del DPPH radical con el compuesto antioxidante ¹² .	17
Figura 7. Reacción del ABTS radical con el compuesto antioxidante.	18
Figura 8. Productos comerciales.	21
Figura 9. Fragmentación del ácido gálico.	54
Figura 10. Fragmentación del ácido ferúlico.	55
Figura 11. Reacción general retro Diels-Alder para flavonoides.	56
Figura 12. Fragmentación de la luteolina.	56
Figura 13. Fragmentación del kaempferol.	56
Figura 14. Fragmentos principales del ácido gálico.	89
Figura 15. Fragmentos principales del ácido caféico.	93
Figura 16. Fragmentos principales del ácido <i>p</i> -coumárico.	97
Figura 17. Fragmentos principales del ácido protocatecúico.	101
Figura 18. Fragmentaciones del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico.	105
Figura 19. Fragmentos principales del ácido ferúlico.	109
Figura 20. Fragmentos principales de la luteolina.	113
Figura 21. Fragmentos principales del kaempferol.	117
Figura 22. Fragmentos principales de la quercetina.	121
Figura 23. Fragmentos principales de la vanilina.	125
Figura 24. Fragmentos principales de la apigenina.	129
Figura 25. Fragmentos principales de la Isoharmnetina.	133
Figura 26. Curva de calibración con ácido gálico.	145
Figura 27. Imagen obtenida de la curva de calibración con ácido gálico.	145
Figura 28. Curva de calibración con catequina.	146
Figura 29. Imagen obtenida para la curva de calibración con catequina.	146
Figura 30. Curva de absorbancia e inhibición para la miel Tunía (3).	147
Figura 31. Imagen obtenida para la inhibición del radical DPPH en la muestra de miel de Tunía.	147
Figura 32. Curva de absorbancia e inhibición para la miel Tunía (1).	148
Figura 33. Imagen obtenida para la inhibición del radical ABTS en la muestra de miel de Tunía.	148

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Pág.
Ecuación 1. Determinación de sólidos insolubles en agua.	23
Ecuación 2. Corrección del índice de refracción de las muestras a 20 °C ¹⁹ .	24
Ecuación 3. Determinación del contenido de azúcares reductores ²¹ .	24
Ecuación 4. Contenido aparente de sacarosa.	25
Ecuación 5. Determinación del porcentaje de cenizas.	25
Ecuación 6. Acidez libre.	26
Ecuación 7. Acidez láctica.	26
Ecuación 8. Acidez total.	26
Ecuación 9. Índice de diastasa.	27
Ecuación 10. Concentración de extracto.	28
Ecuación 11. Concentración de extracto.	29
Ecuación 12. Cálculo para hallar la concentración de fenoles en muestra.	30
Ecuación 13. Cálculo para hallar la concentración de flavonoides en muestra.	31
Ecuación 14. Inhibición del radical DPPH.	32
Ecuación 15. Inhibición del radical ABTS.	33

1. RESUMEN

Las composiciones químicas de la miel y el propóleo varían de acuerdo a la especie de abeja, origen, clima, región geográfica y flora alrededor de la colmena, por esa razón, es importante efectuar el estudio de estos productos de la colmena en diferentes regiones del departamento del Cauca. En el presente estudio se realizó un análisis de los perfiles fenólicos de muestras comerciales de miel, miel propolizada y propóleo provenientes de zonas de Santander de Quilichao y Tunía en el departamento del Cauca, mediante el uso de espectrometría de masas con ionización por electrospray, además se evaluaron y se estimaron estadísticamente los parámetros fisicoquímicos, contenidos fenólicos totales y flavonoides totales, así como sus actividades antioxidantes por los métodos DPPH y ABTS.

La espectrometría de masas hizo posible la identificación cualitativa de 12 compuestos fenólicos: 6 ácidos fenólicos y 6 flavonoides.

Los parámetros fisicoquímicos se encontraron dentro de los rangos establecidos por el INVIMA para las mieles, mostrando algunas características distintivas entre ellas, como su conductividad y actividad de diastasa. El extracto de propóleo de Santander mostró los valores más altos de actividad antioxidante por DPPH ($CI_{50}=0,244\pm 0,006$ y mg/mL) y ABTS ($CI_{50}=0,771\pm 0,015$ mg/mL), contenido total de fenoles ($890,206\pm 6,108$ mg AG/g muestra) y flavonoides ($15,237\pm 0,102$ mg CAT/g muestra) por lo que se puede considerar como un producto de calidad para la industria alimentaria y farmacéutica, mientras que la miel de Tunía presentó los valores más bajos de actividad antioxidante por DPPH ($CI_{50}=197,400\pm 1,446$ mg/mL) y ABTS ($CI_{50}=230,200\pm 5,434$ mg/mL), contenido total de fenoles ($0,775\pm 0,010$ mg AG/g muestra) y flavonoides ($0,035\pm 0,003$ mg Cat/g muestra). Una correlación ($r=0,610$) se observó entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante por ABTS.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los seres humanos consumen medicamentos para tratar las enfermedades producidas por el estrés oxidativo, sin embargo, los medicamentos sintéticos usados en los últimos años pueden ocasionar efectos adversos sobre la salud humana y es por esto, que actualmente se recurre a la medicina tradicional y al tratamiento y prevención de enfermedades con productos naturales que en teoría presentan propiedades antioxidantes. Entre estos productos se encuentran la miel y el propóleo, los cuales han sido usados por los humanos desde sus inicios, principalmente en medicina alternativa.

En el departamento del Cauca se comercializa un nuevo producto conocido como miel propolizada, el cual es obtenido mediante la combinación de miel y extracto de propóleo, con la idea de que el producto tenga mejores propiedades que sus productos puros, sin embargo, el problema radica en que estos artículos comerciales no presentan estudios de calidad y actividad biológica; es por esto que se plantea realizar el estudio fisicoquímico exigido por el INVIMA, para observar la calidad de la miel de origen y como varían estos parámetros en la miel propolizada. Se busca también, examinar y comparar la actividad biológica a través del análisis del contenido de compuestos con actividad antioxidante en miel propolizada, miel y propóleo producidos en dos apícolas del departamento del Cauca con el fin de llevar a cabo una comprobación científica del potencial con el cual se comercializan dichos productos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

3.1.1 Evaluar la capacidad antioxidante, composición de ácidos fenólicos y flavonoides en dos muestras de miel propolizada disponibles comercialmente en la ciudad de Popayán-Cauca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar el contenido total de polifenoles y flavonoides mediante los métodos colorimétricos de Folin-Ciocalteu y tricloruro de aluminio respectivamente.

3.2.2 Determinar la capacidad antioxidante total mediante los métodos DPPH y ABTS.

3.2.3 Aplicar un método estadístico para el análisis de resultados sobre la extracción y determinación de ácidos fenólicos y flavonoides.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 MIEL

La miel es una solución sobresaturada de azúcares, de los cuales la fructosa y la glucosa son los principales componentes junto con el agua. Otros azúcares, proteínas, enzimas, carotenoides, compuestos fenólicos, aminoácidos libres, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales también se encuentran en ella. Puede originarse a partir de especies de plantas únicas o múltiples, y su composición bioquímica se ve afectada por la fuente floral¹. Adicionalmente, es considerada como un alimento de alta calidad, al que se le atribuye propiedades funcionales, las cuales han sido investigadas desde hace muchos años, demostrando propiedades beneficiosas asociadas a los niveles de compuestos bioactivos, principalmente fenólicos².

4.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA MIEL

Las características fisicoquímicas de la miel se deben evaluar para conocer su calidad e identificar si se presentan adulteraciones en su composición; de igual modo, indica los procesos químicos que estos hayan podido sufrir debido a una mala manipulación. En consecuencia, se creó la Resolución 1057 del INVIMA (Colombia 2010) la cual establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel para consumo humano y define las características fisicoquímicas que debe contener para su comercialización³. Los parámetros a evaluar son los siguientes:

Sólidos insolubles: La extracción de la miel se realiza por diferentes métodos como la centrifugación de los panales desoperculados sin larvas. Otra de las

técnicas de obtención de miel es por compresión de los panales, sin larvas, con o sin la aplicación de calor moderado; y, un tercer método, es mediante el drenaje de los panales desoperculados sin larvas. Estos procesos buscan una extracción efectiva de la miel de los panales y eliminar material grueso contaminante, tales como insectos o sus restos, larvas o granos de arena, o del mismo polen, material definido como insoluble, representado en impurezas que deterioran la calidad del producto final y cuyos valores máximos permitidos son reportados por la norma mundial y definidos según el tipo de extracción empleada; así, para mieles prensadas se exige no más del 0,5 % y para las mieles extraídas por otros métodos no más del 0,1 % de contenido total de sólidos insolubles³.

Contenido de humedad: El grado de humedad en la miel es empleado como parámetro para determinar el momento de la cosecha; los valores permitidos no deben superar el 20%. Un alto contenido de humedad favorece los procesos de fermentación por levaduras, lo que conlleva a la contaminación del producto y a su rápida degradación³.

Contenido aparente de azúcar reductor: La miel es una mezcla compuesta principalmente en un 70 % por los carbohidratos glucosa y fructosa. Su tercer componente mayoritario es el agua. También contiene otros tipos de azúcares minoritarios. Los azúcares reductores son aquellos que poseen un grupo carbonilo intacto y que, a través del mismo, pueden reaccionar con otras moléculas, lo que provoca la alteración de las proteínas mediante la reacción de glucosilación no enzimática, también denominada reacción de Maillard³.

Contenido aparente de sacarosa: La enzima más importante de la miel es la α -glucosidasa, ya que es la responsable de muchos de los cambios que ocurren en la miel; también se conoce como invertasa o sucrasa y convierte el disacárido sacarosa de la miel en sus constituyentes monosacáridos fructosa y glucosa. Es por esto, que las mieles maduras deben presentar un contenido mínimo de

sacarosa. El reglamento exige un porcentaje menor a 10⁴.

Contenido de sustancias minerales (cenizas): Los minerales que contiene la miel son: fósforo, magnesio, calcio, hierro, sodio y potasio. En la evaluación del contenido de cenizas de productos apícolas como la miel, la magnitud del contenido de cenizas es una variable, el cual se puede utilizar para diferenciar tipos de miel o reconocer alguna adulteración de las mismas. En el caso de las mieles florales, el contenido de cenizas es bajo comparado con el de mieles de mielada, mientras que en el caso de adulteraciones con melaza, su alto contenido de cenizas (alrededor de 10 %) conlleva a un marcado incremento de estas³.

Conductividad eléctrica: La conductividad eléctrica se define como la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica, la cual depende de la presencia de iones, de su concentración, movilidad y temperatura. En muestras de miel, la conductividad eléctrica se define como 1 mL de una solución de 20 g de miel en base seca, en 100 mL de agua, medida a 20 °C (68 °F)³.

Acidez: La acidez libre está relacionada con las sustancias ácidas valorables por titulación directa con hidróxido de sodio hasta un pH menor a 8,5. La acidez láctica se determina mediante la adición de hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH superior a 9.5 y permite la cuantificación de estructuras condensadas conocidas como lactonas, mediante la valoración del hidróxido de sodio que no es consumido en la hidrólisis de dichas estructuras. La acidez total corresponde a la suma de los valores de acidez libre y láctica. La acidez de una muestra de miel es una característica que eventualmente se puede emplear como parámetro de diferenciación entre muestras de miel de diferentes regiones u orígenes³.

Índice de la diastasa: La diastasa es una enzima presente naturalmente en mieles frescas, cuyos niveles disminuyen durante el almacenamiento o calentamiento. Su actividad es un indicador de la calidad de la miel, que guarda una

estrecha relación con la frescura y su manipulación³ y tiene como función principal la conversión de azúcares complejos en simples. La actividad diastasa de la miel se mide como el tiempo de reacción, en el cual una masa definida de miel degrada una cantidad dada de almidón hasta un punto final preestablecido. Se indica como número de diastasa (ND).

Número diastasa: cantidad de enzima en 1 g de miel que degrada a 0,01 g de almidón en el punto final preestablecido, en 1 hora a 40 °C, bajo las condiciones indicadas en este método. Los resultados son expresados en unidades Gothe (o unidades Schade) por gramo de miel³.

4.3 PROPÓLEO

El propóleo es una sustancia resinosa, de color oscuro, recolectada por abejas de brotes de hoja, flor, tallos y grietas en la corteza de muchas especies de árboles. Este material se transporta a la colmena y se mezcla con cera de abejas, produciendo una sustancia fuertemente adhesiva, que durante siglos se ha utilizado en todo el mundo en la medicina tradicional. Las abejas (*Apis mellifera*) usan el propóleo como sellador para proteger sus colmenas de los invasores, el calor, la humedad y el viento. Generan este producto al recolectar sustancias resinosas de los exudados de ciertas plantas que se modifican al mezclarse con enzimas, polen y cera; generalmente está compuesto de resinas (50%), ceras (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y otras sustancias orgánicas y minerales (5%)⁵. El propóleo se ha usado tradicionalmente por sus propiedades antioxidantes y medicinales (antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, hepatoprotectora e inmunomoduladora). Entre los compuestos identificados en este producto, se deben destacar los compuestos fenólicos, puesto que son los principales responsables de su actividad farmacológica y biológica⁵. La presencia de estos compuestos bioactivos en el propóleo, está fuertemente influenciada por

la vegetación y el clima en la región donde se encuentran las abejas⁵.

4.4 MIEL PROPOLIZADA

La miel con propóleo, conocida comercialmente como miel propolizada es un nuevo producto alimenticio preparado con miel y extracto de propóleo en proporciones establecidas por cada comercializador, que presenta mejores propiedades funcionales que la miel pura, ya que a las cualidades de la miel se le añaden las propiedades presentes en el propóleo; existen productos con distintos grados de contenido de propóleo y estos dependen del gusto del consumidor, debido a que el propóleo presenta un carácter amargo, lo cual hace que no sea apetecido como producto puro, por tanto, se ha creado este nuevo producto con mejores características organolépticas para el consumidor⁶.

4.5 LA APICULTURA EN COLOMBIA

La apicultura en Colombia ha tenido avances significativos en aspectos científicos y tecnológicos que son relevantes para la modernización e industrialización del sector en el país. A través de cooperativas, asociaciones y de la misma Cadena Productiva de las Abejas y Apicultura (CPAA) se ha impulsado el consumo de productos como la miel, polen y propóleo a razón de sus bondades nutricionales y nutraceuticas³.

Actualmente la apicultura puede ser desarrollada en la mayor parte del territorio nacional, se excluyen áreas con climas selváticos, en los cuales la humedad y diversidad de depredadores no lo permiten. La producción de miel se da principalmente en áreas por debajo de los 1.000 msnm. La Costa Caribe se destaca por ser tradicionalmente la de mayor producción de miel y los promedios reportados para la región son de 35 kg/colmena/año³.

Por su parte, el departamento del Cauca ocupa el séptimo puesto en producción de miel y otros productos de colmena a nivel nacional (178 Toneladas en 2014)³.

4.6 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y RADICALES LIBRES

Los radicales libres son especies químicas reactivas que tienen un único electrón desapareado en sus orbitales más externos. Esta configuración electrónica es altamente energética, lo que hace que los radicales libres sean químicamente inestables y muy reactivos. Cuando se producen en alimentos o tejidos biológicos, reaccionan fácilmente con moléculas cercanas, como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, produciendo diferentes especies radicales y no radicales que, en la mayoría de los casos, son perjudiciales para los humanos⁷.

El oxígeno molecular es un radical libre estable pero también un compuesto esencial para la vida y la función celular. En los sistemas vivos, la metabolización del oxígeno molecular produce radicales centrados en oxígeno, a través de una variedad de procesos fisiológicos. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se encuentran entre las clases más importantes de especies radicales en los sistemas alimentarios y en los alimentos basados en lípidos e incluyen especies cargadas y neutras como los radicales de aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), radicales alcoxilo (RO^{\cdot}) y radicales peroxilo (ROO^{\cdot}). Sin embargo, no son las únicas especies de radicales involucrados, las especies reactivas de nitrógeno (ERN), por ejemplo, peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) y óxido nítrico ($^{\cdot}NO$), también son relevantes⁷.

4.7 COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias químicas que inhiben la reacción de oxidación de los radicales libres, mediante el intercambio de uno de sus propios electrones con

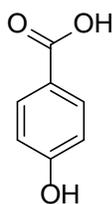
las moléculas de radicales libres para estabilizarlos. La mayoría de los antioxidantes se clasifican de acuerdo con sus características estructurales, pero también pueden clasificarse según su origen en el cuerpo humano como endógeno o exógeno. El cuerpo humano produce moléculas antioxidantes (endógenas) pero también puede obtenerlas de fuentes externas (exógenas) como alimentos y/o suplementos. Los antioxidantes endógenos incluyen antioxidantes enzimáticos tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasas, que previenen la formación de ERO. Los antioxidantes endógenos también incluyen algunos eliminadores de radicales para suprimir o romper las reacciones en cadena, como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), bilirrubina, ácido úrico, etc. Los alimentos, las hierbas y las especias son la principal fuente de antioxidantes polifenólicos exógenos como los ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas y cumarinas⁷.

Una ingesta de alimentos ricos en antioxidantes dentro de los cuales se encuentran la miel y el propóleo, por su contenido de polifenoles y vitaminas, es una terapia eficaz para mantener la salud de los seres vivos, previniendo el ataque de ERO y ERN, además de ser una estrategia para el tratamiento de enfermedades degenerativas⁷.

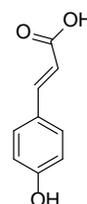
4.8 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol. Están contenidos principalmente en plantas y alimentos y son un grupo heterogéneo de productos de unos 10.000 compuestos: algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos solubles en agua, mientras que otros son polímeros muy grandes e insolubles⁸.

Estructuralmente, los ácidos fenólicos son fenoles que poseen un resto ácido carboxílico que puede unirse directamente al anillo aromático (derivados del ácido benzoico) o unirse a un residuo alquilo (derivados del ácido hidroxicinámico). Las variaciones en la posición y naturaleza de los sustituyentes en este esqueleto básico conducen a una variedad de antioxidantes. Los derivados benzoicos como los ácidos protocatecúicos, vanílicos y gálicos y los derivados hidroxicinámicos como los ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico se encuentran entre los antioxidantes más comunes y potentes⁸. La figura 1 muestra las estructuras básicas de los ácidos fenólicos.



Ácidos *p*-hidroxibenzoicos



Ácidos *p*-hidroxicinámicos

Figura 1. Estructura básica de las clases de ácidos fenólicos.

Cuando el anillo fenólico se une a través de enlaces éster, éter o acetal, se obtiene una amplia gama de polifenoles más complejos. Los flavonoides comprenden la clase más abundante de polifenoles vegetales con varios miles de estructuras químicas identificadas. Ellos comparten un esqueleto de carbono de difenilo propano, dos anillos de benceno (A y B, figura 2) unidos por una cadena de tres carbonos lineal, esta cadena central generalmente forma un anillo de pirano cerrado (C) con uno de los anillos de benceno.

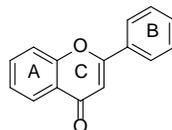


Figura 2. Estructura básica de un flavonoide.

Los flavonoides han adquirido notoriedad debido a su interesante actividad biológica, dentro de las cuales se pueden destacar: propiedades antimicrobianas,

anticancerígenas, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos⁸.

Los flavonoides se pueden clasificar en las subclases flavanoles, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas y taninos condensados (figura 3). Esta subdivisión se basa principalmente en la presencia (o ausencia) de un doble enlace del anillo C (medio) y grupos hidroxilo en los anillos A y B⁸.

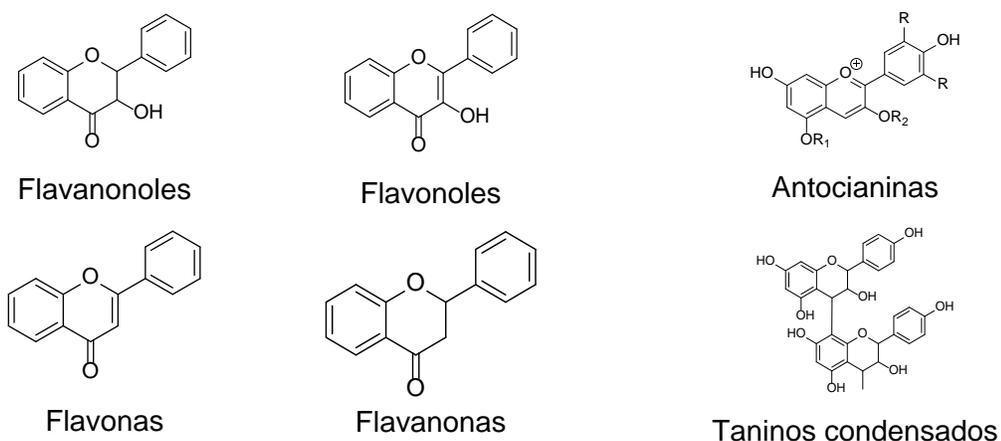


Figura 3. Estructuras básicas de las clases de flavonoides.

4.9 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PRODUCTOS DE COLMENA

En la literatura se reportan diversos métodos para extraer compuestos fenólicos en miel y propóleo. A continuación se describen algunos de estos métodos de extracción:

Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica preparativa para limpiar la muestra previamente a la cuantificación y/o futura concentración del analito que

está presente en la muestra. El término “extracción en fase sólida” es debido a que el material de soporte utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas. Los analitos son absorbidos en el soporte y luego eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades entre el material absorbente y la fase móvil utilizada.

Para la extracción de compuestos fenólicos en miel se utilizan generalmente como fase estacionaria resinas como Amberlite XAD-2 o C18⁹. En el caso del propóleo, este tipo de extracción no es adecuado, debido a la presencia de material resinoso, que imposibilita la separación.

Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es una técnica de uso frecuente para aislar compuestos orgánicos a partir de su fuente natural. Se basa en las propiedades de solubilidad de la sustancia a extraer y del solvente utilizado⁹. En el caso de la miel, los solventes a usar para la extracción de compuestos fenólicos por lo general son los solventes en los que los carbohidratos presentan insolubilidad como los éteres, ésteres y algunos alcoholes.

Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una operación básica o unitaria mediante la cual se separan uno o varios constituyentes solubles contenidos en un sólido inerte mediante la utilización de un disolvente adecuado. Las operaciones implicadas son⁹:

- Cambio de fase del soluto. Esta etapa se considera prácticamente instantánea.
- Difusión del soluto a través del disolvente contenido en los poros del sólido inerte.
- Transferencia del soluto desde las inmediaciones de la interfase sólido-

líquido hasta el seno de la masa principal de disolvente⁹.

El propóleo para fines comerciales se extrae generalmente mediante maceración del producto con adición de solvente, el cual permite extraer los polifenoles con el uso de una mezcla de solventes etanol-agua en diferentes proporciones.

4.10 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales y alimentos. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico ($\text{H}_3\text{Mo}_{12}\text{O}_{40}\text{P}$ y $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]$) y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (W_8O_{13} y Mo_8O_{23}), cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total; por tal razón, el reactivo de Folin-Ciocalteu, puede reaccionar con compuestos no fenólicos, como son el ácido ascórbico, los azúcares y los aminoácidos, produciéndose así una sobrevaloración del contenido fenólico¹⁰.

La medida de polifenoles por el ensayo de Folin-Ciocalteu se cuantifica por espectrofotometría con base a una recta patrón de ácido gálico¹⁰. La reacción patrón se puede observar en la figura 4:

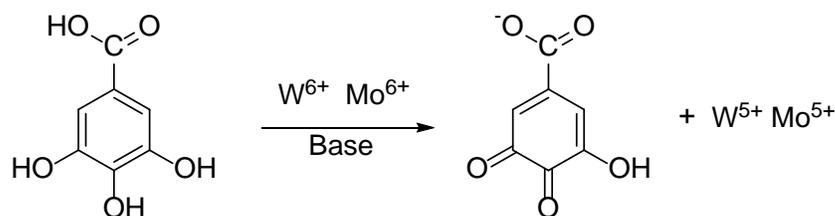


Figura 4. Reacción patrón de ácido gálico con reactivo Folin-Ciocalteu¹⁰.

4.11 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

El ensayo de determinación de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio se fundamenta en la capacidad del catión aluminio para formar complejos estables con flavonoides en metanol, que producen un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción en el análisis espectrofotométrico. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia con otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Este método se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 510 nm con base a una recta patrón de catequina o quercetina¹¹. La figura 5 presenta la reacción de un flavonoide con el cloruro de aluminio.

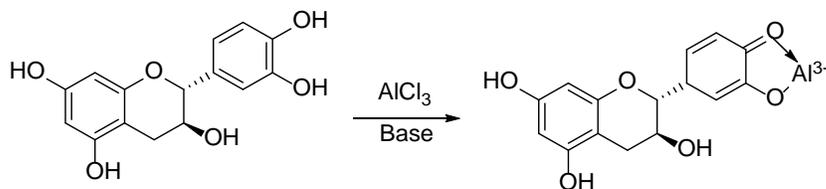


Figura 5. Formación del complejo catequina-Al¹¹.

4.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la evaluación de la actividad antioxidante se han utilizado alrededor de 11 métodos *in vitro* en materiales biológicos. Los métodos más comúnmente usados para medir la actividad antioxidante en plantas y alimentos son aquellos que

involucran compuestos cromógenos de naturaleza radical que estimulan las especies reductoras de oxígeno, por ejemplo, los métodos ABTS y DPPH¹².

4.12.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

El ensayo DPPH se basa en la desaparición del radical cromógeno púrpura 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) por la acción de los antioxidantes, lo cual produce una disminución de la absorbancia a 515 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (HAT), la forma reducida del radical se acompaña de pérdida de color. La actividad se expresa como concentración inhibidora media CI_{50} . Se refiere a la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH. Por lo tanto, un CI_{50} inferior significa una mejor actividad de los radicales de barrido o actividad antioxidante¹². La figura 6 presenta la reacción entre un compuesto antioxidante con el radical DPPH.

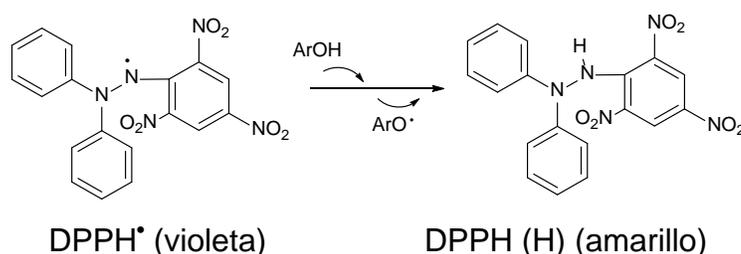


Figura 6. Reacción del DPPH radical con el compuesto antioxidante¹².

4.12.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

El ensayo ABTS fue reportado por primera vez por Miller y Rice-Evans en 1993. Se basa en la desaparición del catión radical ABTS^{•+} [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] por la acción de los antioxidantes. El ABTS es oxidado por los radicales peróxido u otros oxidantes a su forma de catión radical

ABTS^{•+}, el cual es de color intenso, y la capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con el radical ABTS^{•+}¹¹. La capacidad relativa de los antioxidantes donantes de hidrógeno para eliminar ABTS^{•+}, se puede medir espectrofotométricamente a 734 nm¹².

El catión radical (ABTS^{•+}), se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz, en un tiempo de 12 a 16 h. El persulfato potásico y el ABTS reaccionan estequiométricamente (1:0.5). Una vez generado el radical la medida se realiza mediante un ensayo de post adición¹¹. La figura 7 muestra la reacción de un compuesto antioxidante con el radical ABTS:

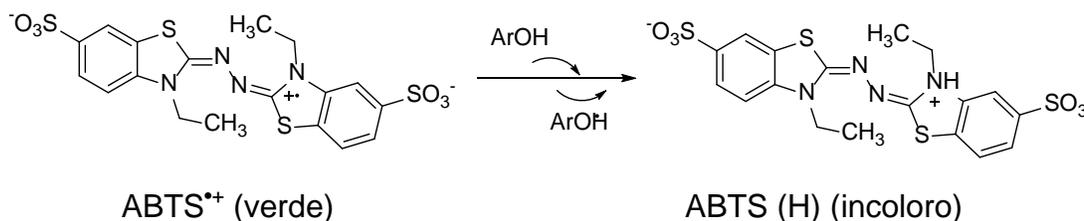


Figura 7. Reacción del ABTS radical con el compuesto antioxidante¹².

4.13 ESTUDIOS PREVIOS

La miel y el propóleo han sido alimentos a los que se les han realizado múltiples estudios a nivel mundial, debido a los diferentes resultados obtenidos que están relacionados directamente con su composición, clima y ubicación geográfica de la zona.

Mouhoubi-Tafinine, Ouchemoukh y Tamendjari (2016)¹³, realizaron estudios en 4 muestras de miel y 3 muestras de propóleo recolectados en Argelia; optimizaron la extracción de compuestos fenólicos probando cuatro solventes distintos (agua,

etanol 50%, etanol 85% y metanol 50%), y determinaron como mejor solvente de extracción agua para la miel y etanol 85% para el propóleo, mediante el análisis del contenido de fenoles, flavonoides, carotenoides y ácido ascórbico.

Mariela Patrignani y colaboradores (2018)¹⁴, correlacionaron el contenido de componentes volátiles, con el origen botánico, mediante análisis melisopalinológico en 25 muestras de miel de varias regiones de Argentina. Encontraron como compuestos comunes en la mayoría de las muestras: 3,8-*p*-mentatrieno, ciclopropilidenmetilbenceno, 1,2,4-trimetilbenceno y α -pineno y 7 compuestos más que pueden estar relacionados con el origen botánico de las muestras.

En Colombia también se han realizado varios estudios en productos de colmena, entre ellos se encuentra el trabajo de Rossana Palomino y colaboradores (2010)¹⁵, quienes realizaron el estudio antimicrobiano en una muestra de propóleo del municipio de La Unión (Antioquia). Las evaluaciones contra los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, y de actividad antibacteriana, contra *Bacillus subtilis* (esporulada), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*, demostrando un efecto del propóleo en la inhibición del crecimiento en todos los casos.

Otro estudio colombiano de estos productos es el de Urrego J. (2017)¹⁶, en donde realizó la caracterización fisicoquímica de 10 muestras miel de dos regiones del departamento de Antioquia, analizando los parámetros fisicoquímicos contemplados por la normativa colombiana. Urrego concluyó que todas las mieles cumplían con los parámetros normativos para la comercialización, además recomendó establecer criterios de selección de muestras por época de producción, para abarcar el año calendario, lo que permitirá conocer las distintas características de las mieles producidas en el año.

En el departamento del Cauca, especialmente en el grupo de investigación en Química de Productos Naturales, se han realizado investigaciones relacionadas con miel express, es decir, miel producida por la alimentación de abejas con jugos de frutas o diversas plantas, entre ellos, se encuentra el trabajo realizado por Benítez, R., Tandioy, A. & Astaiza (2004)¹⁷, denominado: Incremento del nivel proteico de la miel express, alimentando a las abejas (*Apis mellifera*) con jarabe a partir de leche de soya (*Glycine max*). En este estudio, se realizó la investigación del contenido proteico y nivel de aminoácidos, con particular interés en aminoácidos esenciales, cuando se alimentan las abejas con un jarabe de leche de soya. Concluyeron que la concentración de proteína en las mieles express es mayor que en la miel natural.

Escandón, S., (2006)¹⁷ en el trabajo titulado: Determinación y cuantificación del eucaliptol (1,8-Cineol) en miel express de eucalipto (*Eucaliptus sp.*) mediante cromatografía de gases; jarabes con extracto de eucalipto para alimentar abejas y obtener mieles con el principio activo de esta planta conocida como eucaliptol (1,8-cineol), realizando inicialmente en la miel extracciones por ultrasonido con mezclas de solventes orgánicos y su posterior análisis por cromatografía de gases con detector de ionización de llama, se logró enriquecer las mieles con el principio activo.

Otro trabajo es el de Lenis, L., Ruales, C. & Benitez (2007)¹⁸, titulado: Determinación y cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A, presentes en la miel express de Stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el desarrollo de este trabajo, se alimentaron las abejas mediante el suministro de jarabes preparados a base de extracto de stevia para la obtención de un producto denominado miel express de stevia, también se cuantificaron esteviósidos y rebaudiósidos, obteniendo concentraciones de esteviósido en un rango de 0,97-2,8 mg/g y de rebaudiósido A en un rango de 3,0 – 6,0 mg/g.

5. METODOLOGÍA

A continuación se presenta la metodología empleada en la realización del trabajo.

5.1 ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

Se analizaron dos muestras comerciales de miel, dos muestras de miel propolizada y dos del extracto etanólico de propóleo, adquiridas de la apícola El Ventanal localizada en el corregimiento de Tunía, municipio de Piendamó-Cauca y las otras de Agroindustrias Savia localizada en el municipio de Santander de Quilichao-Cauca. Las muestras se adquirieron pocos días después de ser producidas por las apícolas y se conservaron en sus recipientes comerciales a temperatura ambiente, sin incidencia de la luz solar hasta posteriores análisis. La figura 8 presenta los productos comerciales adquiridos de miel, miel propolizada y propóleo respectivamente para la realización del trabajo.



Productos Apícola El Ventanal



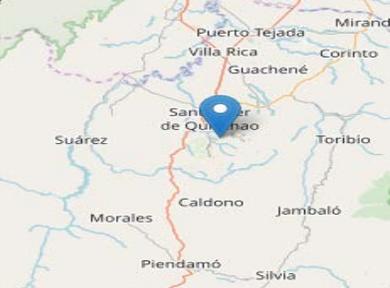
Productos Agroindustrias Savia.

Figura 8. Productos comerciales.

De acuerdo con la información suministrada por los proveedores, las mieles son origen floral, tropical y procesadas mediante prensado, por tanto, son las características a tener en cuenta según los requisitos de la norma del INVIMA analizados en la sección de resultados (Tabla 2). En la tabla 1 se presentan las

características más relevantes para los productos comerciales analizados.

Tabla 1. Características de las muestras comerciales.

	MT	MPT	EEPT	MS	MPS	EEPS
Preparación*	---	100 g MT 10 g EEPT	40 g propóleo 100 g alcohol alimentario 76%	---	100 g MS 3 g EEPS	50 g propóleo 100 g alcohol alimentario 76%
Cantidad del producto comercial	375 mL	200 mL	60 mL	375 mL	150 mL	60 mL
Fecha obtención del producto (envasado)	04/03/2018	06/03/2018	04/03/2018	20/02/2018	25/02/2018	22/02/2018
Flora presente en los alrededores de las colmenas	Cordoncillo (<i>Piper aduncum</i>), balso (<i>Ochroma pyramidale</i>), eucalipto (<i>Eucalyptus sp</i>), guayabo (<i>Psidium guajava</i>), arrayan (<i>Luma apiculata</i>), limón (<i>Citrus x limón</i>), mandarina (<i>Citrus reticulata</i>), salvia (<i>Salvia officinalis</i>), zarza (<i>Rubus</i>), maní forrajero (<i>Arachis pintoi</i>), café (<i>Coffea</i>)			Limón (<i>Citrus x limón</i>), mandarina (<i>Citrus reticulata</i>), mango (<i>Mangifera indica</i>), guayabo (<i>Psidium guajava</i>), grosella (<i>Ribes rubrum</i>), guamo (<i>Inga edulis</i>), chicharrón (<i>Calea sessiliflora sp.</i>), incienso (<i>Plectranthus madagascariensis</i>) y sangre de drago (<i>Croton draco</i>).		
Localización exacta de obtención	Vereda Quebrada Grande Tunía N 2°40'4.123" O 76°32'15.693 1.800 msnm			Vereda La Palomera, Santander de Quilichao N 2°57'20.088" O 76°25'31.296" 1071 msnm		
Localización en el mapa						

*Reportado por cada empresa.

5.2 REQUERIMIENTOS FISICOQUÍMICOS NORMATIVOS PARA MIEL

Las características fisicoquímicas de las muestras de miel se evaluaron para determinar con antelación si cumplen con los requisitos sanitarios y de calidad establecidos por la resolución 1057 del INVIMA y para descartar la presencia de algún tipo de adulteración. Los análisis fueron: sólidos insolubles en agua, contenido de humedad, contenido aparente de azúcar reductor, contenido aparente de sacarosa, contenido de sustancias minerales (cenizas), conductividad eléctrica, acidez libre, lactónica y total e índice de la diastasa. Todos los procedimientos experimentales de cada requisito se realizaron por triplicado y se aplicaron como lo establece la AOAC Internacional¹⁹.

5.2.1 Sólidos insolubles en agua

Se pesaron $3,0000 \pm 0,0020$ g de miel o miel propolizada, seguido de la adición de agua destilada a 80 °C hasta completa disolución; posteriormente, se filtró la solución a través de un papel filtro cualitativo previamente pesado usando un equipo Buchner y se transfirió a una estufa (Fisher Scientific) a 80 °C por 2 horas; se dejó la muestra en un desecador hasta temperatura ambiente y finalmente se pesó²⁰. El contenido de sólidos insolubles se determinó aplicando la ecuación 1:

$$\% \text{sólidos insolubles en agua} = \frac{\text{masa (sólidos + papel filtro) } - \text{masa papel filtro}}{\text{masa de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 1. Determinación de sólidos insolubles en agua²⁰.

5.2.2 Contenido de humedad

Se adicionó una gota de miel o miel propolizada en un refractómetro (Abbe Mark II) y se midió el valor del índice de refracción y la temperatura de la muestra;

finalmente se determinó el contenido de humedad mediante la relación entre el índice de refracción a 20 °C y el contenido de agua indicada en una tabla proporcionada por la AOAC¹⁹.

Para la corrección del índice de refracción a una temperatura de 20 °C, se aplicó la ecuación 2:

$$IR_{\text{corregido}} = \text{Índice de Refracción} + (0,00023 \times |\text{Temperatura medida} - 20 \text{ °C}|)$$

Ecuación 2. Corrección del índice de refracción de las muestras a 20 °C¹⁹.

5.2.3 Contenido aparente de azúcar reductor

Se prepararon las siguientes soluciones: sacarosa 10 g/L (tres días antes del ensayo), solución indicadora de azul de metileno 0,2%, soluciones de miel o miel propolizada 1%, Fehling A y Fehling B tal y como lo indica la AOAC¹⁹.

Se pipetearon 5 mL de Fehling A y 5 mL de Fehling B; posteriormente se añadieron 7 mL de agua destilada y un agitador magnético. Cuando la solución se encontraba en ebullición, se adicionó 1 mL de azul de metileno y se inició la titulación rápida de la muestra a la solución en ebullición hasta una coloración rojo ladrillo. El resultado de azúcares reductores se calcula en %m/m (tomada del requerimiento establecido por el INVIMA²¹), aplicando la ecuación 3:

$$\% \frac{m}{m} = \frac{(\text{mL de miel consumidas en la titulación}) \times (\text{Concentración } \% \frac{m}{v})}{\text{masa de la muestra}}$$

Ecuación 3. Determinación del contenido de azúcares reductores²¹.

5.2.4 Contenido aparente de sacarosa

Para determinar el contenido aparente de sacarosa, se prepararon las soluciones descritas a continuación:

- Solución de miel o miel propolizada al 1,25%
- Solución de miel o miel propolizada al 1,25%, seguido de la adición de 5 mL de HCl concentrado y calentamiento en baño maría a 65 °C por 10 minutos para producir la inversión.

Seguido a esto, se adicionó cada solución en un tubo para polarímetro de 100 mm y se midió la rotación óptica de las soluciones anteriores con el uso de un polarímetro ATAGO AP-300.

El contenido aparente de sacarosa se determinó usando la ecuación 4:

$$\text{Sacarosa aparente} = \frac{\text{Rotación óptica de la solución} - \text{Rotación óptica de la solución invertida}}{0,884}$$

Ecuación 4. Contenido aparente de sacarosa¹⁹.

5.2.5 Contenido de sustancias minerales (cenizas)

Se pesaron 2,0000 ± 0,0020 g de miel o miel propolizada en un crisol de porcelana, que posteriormente se sometieron a calcinación usando una rampa de 3.5 °C/min durante 3 horas hasta llegar a una temperatura de 600 °C, la cual se mantuvo por 7 horas. Seguidamente, las muestras se transfirieron a un desecador cuando la mufla se encontraba a una temperatura menor a 100 °C; finalmente, las muestras se pesaron a temperatura ambiente. El contenido de cenizas se calculó con el uso de la ecuación 5:

$$\%Cenizas = \frac{\text{Peso (cenizas + crisol)} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Ecuación 5. Determinación del porcentaje de cenizas¹⁹.

5.2.6 Conductividad eléctrica

Se prepararon soluciones de miel o miel propolizada al 20% (p/v) (en base a materia seca) en agua destilada desionizada sin CO₂ y se midió la conductividad a 20 ° C en un conductímetro Orión - Modelo105. Los resultados se expresaron en miliSiemens por centímetro (mS / cm)²⁰.

5.2.7 Acidez libre, láctónica y total

Se pesaron 10,0000 ± 0,0200 g de muestras de miel o miel propolizada y se disolvieron en 75 mL de agua desionizada y se colocó en agitación magnética. A continuación, se midió el valor del pH inicial con un potenciómetro y se procedió a titular con NaOH 0,05 N hasta un pH de 8,5 (acidez libre); posteriormente, se agregaron 10 mL de NaOH 0,05 N y se tituló la solución con HCl 0,05 N hasta un pH de 8,3 (acidez láctónica). La acidez total es la suma de la acidez libre y láctónica²⁰.

La acidez libre, láctónica y total se calculan aplicando las ecuaciones 6, 7 y 8 respectivamente:

$$Acidez\ libre = \frac{(mL\ NaOH\ 0,05\ N\ (muestra) - mL\ NaOH\ 0,05\ N\ (blanco)) \times 50^*}{g\ muestra}$$

Ecuación 6. Acidez libre²⁰.

$$Acidez\ láctónica = \frac{[(mL\ NaOH\ 0,05\ N - mL\ NaOH\ 0,05\ N\ (blanco)) \times 10^* - (mL\ HCl\ 0,05\ N - mL\ HCl\ 0,05\ N\ (blanco))] \times 50^*}{g\ muestra}$$

Ecuación 7. Acidez láctónica²⁰.

*Factores para expresar la acidez en meq/1000 g muestra

$$Acidez\ total = Acidez\ libre + acidez\ láctónica$$

Ecuación 8. Acidez total²⁰.

5.2.8 Índice de la diastasa

La actividad de diastasa se determinó usando una solución tamponada de almidón soluble al 2% y miel o miel propolizada al 20% incubada en un baño termostático a 40° C. Se extrajeron alícuotas de 1 mL de solución de miel a intervalos de 2 minutos y se añadió 0.5 mL de almidón, seguido de la adición de 1 mL de yodo 0,0007 N; la solución se mezcló y se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro UV. El ensayo finalizó cuando la absorbancia medida se encontraba por debajo de 0,235 y el índice de diastasa se calculó realizando una curva de calibración del tiempo de toma de alícuotas vs la absorbancia, y se extrapolo para determinar el tiempo exacto en el que la absorbancia es 0,235. Los resultados se expresaron en grados Shade como los mililitros de almidón al 1% hidrolizado por una enzima en 1 g de miel en 1 h.

La ecuación 9 describe el cálculo del índice de diastasa:

$$\text{Índice de diastasa} = \frac{60 \times 0,1 \times 1,0}{t \times 0,01 \times 2,0} = \frac{300}{t}$$

Ecuación 9. Índice de diastasa¹⁹.

Dónde:

60= factor para convertir en horas los minutos

0,1= cantidad en gramos de almidón usada en el ensayo

0,01= son los gramos de almidón necesarios que debe degradar en 1 hora la cantidad de enzima que corresponde a la actividad unidad de la amilasa.

5.3 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Se realizaron dos tipos de extracciones de compuestos fenólicos en las muestras de miel y miel propolizada con el fin de comparar cual extracción presentaba la mejor actividad antioxidante y con ella analizar cualitativamente los compuestos fenólicos mediante espectrometría de masas.

5.3.1 Extracción en fase sólida

La extracción de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a Tahir et al., 2017²². Se pesó $1 \pm 0,0040$ g de muestras de miel o miel propolizada y se disolvieron en 4 mL de agua desionizada, se ajustaron a pH 2 con HCl (0,1%) y se sometieron a ultrasonidos durante 15 minutos a 25 °C. Se acondicionó un cartucho con $4 \pm 0,0005$ g de C18 mediante el paso de 5 mL de metanol (HPLC). Las soluciones de miel se adicionaron en los cartuchos y se lavaron con 5 mL con agua desionizada acidificada (pH 2) para eliminar todos los azúcares y otros componentes polares de la miel. Los compuestos fenólicos absorbidos se eluyeron con 5 mL de metanol, seguido de concentración en evaporador rotatorio (40 °C, 90 rpm); el extracto se pesó y reconstituyó en 5 mL de metanol (HPLC). Los extractos se filtraron a través de un filtro de membrana de $0,22 \mu\text{m}^{22}$. Todos los análisis se realizaron por triplicado. El extracto se guardó en viales ámbar hasta posteriores análisis. La concentración fue expresada en (mg extracto/mL metanol).

$$\text{Concentración de extracto} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso (extracto + balón)} - \text{Peso balón}}{5 \text{ mL (metanol)}}$$

Ecuación 10. Concentración de extracto.

5.3.2 Extracción líquido-líquido

La extracción de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a Biluca et al, 2017²³. Se homogeneizaron $5 \pm 0,011$ g de muestras de miel y miel propolizada en 5 mL de solución de cloruro de sodio al 2% y se mezclaron durante 5 minutos bajo agitación constante en un vortex. La muestra diluida se extrajo cinco veces con 10 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro durante 15 minutos y luego se filtraron, seguido de concentración en un evaporador rotatorio (40 °C, 90 rpm). El extracto seco fue pesado y reconstituido en 5 mL de metanol (grado HPLC) y filtrado a través de filtros de $0.22 \mu\text{m}^{23}$. Todos los análisis se realizaron por triplicado. El extracto se guardó en viales ámbar hasta posteriores análisis. La concentración fue expresada en (mg extracto/ mL metanol).

$$\text{Concentración de extracto } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Peso (extracto + balón)} - \text{Peso balón}}{5 \text{ mL (metanol)}}$$

Ecuación 11. Concentración de extracto.

5.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

5.4.1 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo usando el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita por Álvarez-Suarez et al., 2010²⁴ con modificaciones: Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico en metanol como estándar, a concentraciones de 10, 15, 25, 35, 45 y 55 $\mu\text{g/mL}$. Se mezclaron 200 μL de cada solución con 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 800 μL de carbonato de sodio al 7,5 %, se agitó y se dejó por 30 minutos en la

oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro UV-vis²⁴.

Para la cuantificación de fenoles totales en las muestras de miel, miel propolizada, extractos de miel propolizada y extractos de propóleo, se pesaron $0,2500 \pm 0,0045$ g en 10 mL de metanol, se realizó el procedimiento descrito anteriormente y se realizaron diluciones con el fin de obtener una absorbancia que estuviera dentro de la curva de calibración (Anexos, 9.4.1). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados en mg Ácido gálico/ 100 g muestra, y su determinación fue realizada empleando la ecuación 12:

$$\text{Concentración muestra} \left(\frac{\text{mg AG}}{\text{g muestra}} \right) = \text{concentración según curva de calibración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{\text{volumen muestra (mL)}}{\text{Peso muestra (g)}}$$

Ecuación 12. Cálculo para hallar la concentración de fenoles en muestra.

5.4.2 Determinación del contenido de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio

La determinación de flavonoides totales se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Álvarez-Suarez et al., 2010²⁴ con modificaciones: Se realizó una curva de calibración utilizando catequina en metanol como estándar a concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL. Posteriormente se tomaron 140 µL de cada concentración y se añadieron 52,5 µL de nitrito de sodio al 5% y 805 µL de agua desionizada; se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos y después se añadieron 210 µL de cloruro de aluminio al 2,5 %, se agitó y se dejó reposar por 6 minutos. Seguido de esto, se adicionaron 350 µL de solución hidróxido de sodio 1M y 350 µL de agua desionizada, se mezcló y se dejó reposar durante 5 minutos; finalmente se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS a 510 nm.

Para la cuantificación de flavonoides totales en todas las muestras y extractos, se pesaron $3 \pm 0,0400$ g en 5 mL de metanol y se realizó el procedimiento descrito anteriormente; se realizaron diluciones en algunas muestras con el fin de obtener una absorbancia que estuviera dentro de la curva de calibración (Anexos, 9.4.2). Los resultados fueron expresados en mg Cat/100 g muestra, y su determinación fue realizada empleando la ecuación 13:

$$\text{Concentración muestra} \left(\frac{\text{mg Cat}}{\text{g muestra}} \right) = \text{concentración obtenida por extrapolación} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{\text{volumen muestra (mL)}}{\text{Peso muestra (g)}}$$

Ecuación 13. Cálculo para hallar la concentración de flavonoides en muestra.

5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.5.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Gül & Pehlivan, 2018¹, con modificaciones: Se pesaron 3 mg del radical DPPH• y se disolvieron en 100 mL de metanol. Posteriormente se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 515 nm, ajustando la solución a 0.800 ± 0.03 mediante concentración o dilución. Se realizaron curvas de ácido ascórbico (2-12 ppm), trolox (2,5-12,5 ppm) y α -tocoferol (5-25 ppm) como controles de referencia. Se realizaron curvas para cada muestra en rangos de concentración tal que se obtuviera una inhibición cercana a 0,500 dentro de la curva (Anexos 9.4.3). Para el análisis de las muestras, los extractos y los controles de referencia, se mezclaron 600 μ L de cada solución de la curva con 1200 μ L de DPPH, se agitaron y se mantuvieron en la oscuridad durante 15 minutos, finalmente, se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 515 nm¹. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, la absorbancia del control consistía en reemplazar el

volumen de muestra por metanol. La inhibición del radical libre DPPH se calculó mediante la ecuación 14:

$$\text{Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia control}}{\text{Absorbancia control}}$$

Ecuación 14. Inhibición del radical DPPH.

Los resultados de la actividad antioxidante fueron registrados en una gráfica de concentración vs inhibición, para obtener la ecuación lineal y mediante análisis de regresión obtener la concentración necesaria para obtener una inhibición de 0.500, la cual se expresa como CI_{50} .

5.5.2 Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método de ABTS

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Gül & Pehlivan, 2018¹, con modificaciones: Para la preparación del radical ABTS^{•+} se pesaron 18 mg de ABTS y se disolvieron en 54 mL de solución buffer fosfato pH 7,2. Después, se añadieron 6 mL de persulfato de potasio 2,45 mM y se dejó reposar en la oscuridad y a temperatura ambiente por 16 h para la formación del radical.

Transcurrido el tiempo, 30 mL de la solución de ABTS^{•+} se diluyó con solución buffer y metanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.020 a 734 nm.

Se realizaron curvas de ácido ascórbico (10-100 ppm), trolox (15-125 ppm) y α -tocoferol (10-100 ppm) como controles de referencia. Se realizaron curvas para cada muestra en rangos de concentración tal que se obtuviera una inhibición cercana a 0,500 dentro de la curva (Anexos, 9.4.4). Para el análisis de las muestras, los extractos y los controles de referencia, se mezclaron 80 μ L de las

soluciones de diferentes concentraciones con 1520 µL de ABTS, se agitaron y se mantuvieron en la oscuridad durante 7 minutos, finalmente, se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 734 nm¹. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, la absorbancia del control consistía en reemplazar el volumen de muestra por metanol. La inhibición del radical libre ABTS se calculó usando la ecuación 15:

$$\text{Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia control}}{\text{Absorbancia control}}$$

Ecuación 15. Inhibición del radical ABTS.

Los resultados de la actividad antioxidante fueron registrados en una gráfica de concentración vs inhibición, para obtener la ecuación lineal y mediante análisis de regresión obtener la concentración necesaria para obtener una inhibición de 0,500 de los radicales libres, la cual se expresa como CI₅₀.

5.6 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se utilizó un espectrómetro de masas LCQ FLEET de la unidad de análisis industrial del departamento de Química, Universidad del Cauca, equipado con una sonda de ionización por electrospray (ThermoFisher Scientific) con detector de trampa de iones. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de iones positivos. Los parámetros de la fuente de iones fueron los siguientes: voltaje de la fuente 5 kV, voltaje capilar -20 V, voltaje de la lente del tubo 78 V, temperatura capilar 275 ° C, gas envolvente y flujo de gas auxiliar (N₂) 35 y 10 (unidades arbitrarias).

Para los estudios de fragmentación, se realizó una exploración dependiente de los datos mediante la implementación de la disociación inducida por colisión (CID). La

energía de colisión normalizada de la celda (CID) se estableció entre 20 y 35 eV dependiendo el compuesto a analizar.

Los flavonoides y los ácidos fenólicos se identificaron de acuerdo con sus características espectrales: espectros de masas, masa precisa y fragmentación característica. Se aisló cada masa del compuesto a analizar y se aplicaron energías de colisión variadas para observar los fragmentos característicos. Para identificar los compuestos de interés en cada muestra, se utilizó el mecanismo de fragmentación y los fragmentos característicos se confirmaron utilizando la biblioteca de espectros de masas CD NIST 2014.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Statistics 23.0 Comand, desarrollado por IBM (USA). Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar. Inicialmente se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para establecer el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas. Seguidamente, las diferencias significativas se calcularon mediante la prueba de ANOVA de un factor, seguida de la prueba de diferencia mínima significativa TUKEY ($p \leq 0.05$) y los grupos se mostraron con letras diferentes en las tablas. Además, se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson para las pruebas antioxidantes, fenoles y flavonoides totales para comparar si existe relación entre los resultados de las pruebas.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 REQUERIMIENTOS FISICOQUÍMICOS NORMATIVOS

Los parámetros fisicoquímicos en las mieles de Tunía y Santander se ajustaron a las normas establecidas por el INVIMA, es decir, cumplen con las normas de calidad y no presentan adulteraciones. En la tabla 2 se muestran los valores permisibles de los requisitos fisicoquímicos que exige el INVIMA en la resolución 1057 de 2010 para una miel de calidad y los resultados para cada parámetro expresado como la media \pm desviación estándar (n=3).

Los sólidos insolubles en agua es un parámetro que permite establecer la calidad higiénica de la miel o la determinación de impurezas macroscópicas. En las mieles se pueden encontrar impurezas de origen animal como partes de insectos y vegetal como epidermis, fragmentos de raíz, semillas, residuos resinosos, tejido conductor y fragmentos de plantas. Las impurezas macroscópicas llegan a la miel por inadecuados procesos de cosecha, por deterioro del material de las colmenas, por inadecuado manejo y almacenamiento de la miel²⁵, es por esto que el INVIMA exige un valor menor al 0.5% para este tipo de mieles prensadas. Teniendo en cuenta los resultados de la tabla 2, se observa que todas las mieles investigadas cumplieron con este requisito; la miel de Santander presentó menor porcentaje de sólidos insolubles que la miel de Tunía, por su parte, las mieles propolizadas presentaron un aumento en el valor de este parámetro y es debido al contenido de extracto de propóleo añadido, es decir, el producto resultante de la extracción del propóleo puede tener residuos sólidos del material original, resultando así en un aumento normal de sólidos insolubles en las muestras de miel propolizada.

Tabla 2. Resultados de los parámetros fisicoquímicos obtenidos para muestras de miel y miel propolizada.

Requerimiento	Valores permisibles (INVIMA Resolución 1057 de 2010)	MT	MS	MPT	MPS
Sólidos insolubles en agua (%)	≤ 0.1 para miel diferente a la prensada ≤ 0.5 para miel prensada	0,248 ^b ±0,014	0,214 ^a ±0,011	0,312 ^c ±0,008	0,276 ^b ±0,016
Contenido de humedad (%)	≤ 20 ≤ 21 para mieles de origen tropical	19,000 ^b ±0,100	17,533 ^a ±0,153	21,000 ^d ±0,100	20,200 ^c ±0,100
Contenido aparente de azúcar reductor (%m/m)	≥45 (miel de mielato) ≥60 (miel floral)	77,633 ^c ±0,889	87,350 ^d ±2,538	53,933 ^a ±0,153	63,517 ^b ±1,320
Contenido aparente de sacarosa	≤ 5 ≤ 10 para mieles de origen tropical	0,051 ^c ±0,002	0,033 ^b ±0,002	0,016 ^a ±0,001	0,029 ^b ±0,005
Contenido de sustancias minerales (cenizas) (%m/m)	≤ 0.6	0,538 ^a ±0,006	0,540 ^a ±0,004	0,658 ^b ±0,034	0,576 ^a ±0,008
Conductividad eléctrica (mS/cm)	≤ 0.8	0,486 ^c ±0,004	0,254 ^a ±0,004	0,603 ^d ±0,003	0,434 ^b ±0,002
pH	No requerido	3,91 ^b ±0,03	3,68 ^a ±0,01	4,51 ^d ±0,01	4,05 ^c ±0,07
Acidez Libre (meq ácido/1000g)	≤ 50	33,436 ^b ±2,567	40,805 ^c ±1,437	28,339 ^a ±0,183	29,936 ^{a,b} ±0,151
Acidez láctica (meq ácido/1000g)	No requerido	31,713 ^b ±2,434	38,614 ^c ±1,461	27,470 ^a ±0,145	28,855 ^{a,b} ±0,224
Acidez total (meq ácido/1000g)	No requerido	65,149 ^b ±5,000	79,419 ^c ±2,893	55,808 ^a ±0,215	58,791 ^{a,b} ±0,374
Actividad de diastasa (escala Shade)	≥ 8	44,152 ^d ±0,914	26,432 ^c ±0,139	22,184 ^a ±0,068	24,858 ^b ±0,319

^{a,b,c,d} Valores en fila con distinta letra son significativamente diferentes.

*Tabla tomada de la norma del INVIMA con resolución 1057 de 2010²¹.

Es de gran importancia tener conocimiento del contenido de humedad en la miel, ya que este se relaciona con el contenido de microorganismos, los cuales conducen a fermentaciones indeseables durante el almacenamiento causadas por la acción de levaduras osmotolerantes que dan como resultado la formación de alcohol etílico y dióxido de carbono; el alcohol se puede oxidar aún más a ácido acético y agua dando como resultado un sabor agrio que reduce la calidad de este producto²⁶. Además, también es importante porque se considera que es un parámetro útil para describir la humedad y la viscosidad de la miel. Teniendo en cuenta los valores permisibles de la tabla 2, se puede observar que ambas mieles cumplen con el requisito de humedad ($\leq 21\%$). La miel de Santander presentó un menor contenido de humedad en relación con la miel de Tunía; este contenido de agua depende de varios factores, por ejemplo, la temporada de cosecha realizada entre los meses de febrero y marzo, los cuales son meses de temporada de precipitaciones bajas con mayor intensidad en la zona de Popayán²⁷, encontrándose la región de Tunía cercana a esta zona; el grado de madurez alcanzado en la colmena y los incomparables factores ambientales de las dos regiones, ya que la región de Santander es una zona más cálida, con menor altura sobre el nivel del mar y con menos precipitación que la región de Tunía. Las muestras de miel propolizada presentaron un aumento en el contenido de humedad, el cual es debido a la adición del EEP (extracto que contiene etanol y agua), puesto que la miel propolizada de Santander presenta menor relación miel: propóleo, por ende menor contenido de humedad que la miel propolizada de Tunía. Finalmente, según los resultados estadísticos, se observa que cada tipo de miel presenta diferencias significativas, por tanto, en este parámetro es relevante el tipo de región y la forma de obtención y preparación de las muestras.

Las abejas obreras secretan la enzima invertasa por las glándulas hipofaríngeas y esta enzima tiene la función de invertir la sacarosa en fructosa y glucosa. Las mieles que presentan un alto grado de madurez deben presentar un alto contenido de glucosa y fructosa, estando estos en su mayor composición y un bajo contenido

de sacarosa²⁵. El INVIMA reporta que las mieles de origen floral deben presentar un contenido mayor a 60% m/m. Ambas mieles cumplieron con este parámetro. El análisis de medias de Tukey (anexos, tabla 12) indica que las mieles son significativamente diferentes; por su parte, la miel de Santander presenta el mayor contenido de azúcares reductores, seguido de la miel de Tunía, atribuyendo a la miel de Santander un mayor grado de maduración antes de su cosecha; por su parte, las mieles propolizadas presentan una disminución proporcional de azúcares reductores respecto a sus mieles de origen y sus valores se deben a una menor concentración de azúcares por la adición de extracto de propóleo.

La norma del INVIMA establece que el contenido de sacarosa no debe superar el 10% para muestras de miel de origen tropical, ya que durante la maduración de la miel la sacarosa sufre un proceso de inversión, convirtiéndose en glucosa y fructosa, disminuyendo así su contenido en mieles; además, este parámetro puede indicar una adulteración de mieles por adición de azúcar casera. En la tabla 2 se observa que el contenido de sacarosa es muy bajo para todas las mieles, por consiguiente, no existe adulteración por azúcar añadido y las mieles presentan un alto grado de maduración.

El contenido de cenizas y la conductividad eléctrica, dependen de los minerales presentes en la miel. La ceniza proporciona una medida directa del residuo inorgánico después de la carbonización, mientras que la conductividad eléctrica mide todas las sustancias orgánicas e inorgánicas ionizables²⁶. Las mieles consideradas en este estudio presentaron un contenido similar de cenizas y ambas cumplen con el requisito establecido (≤ 0.6 %). En cuanto a las mieles propolizadas, se nota un leve aumento en el contenido mineral, debido al aporte mineral del propóleo y su diferencia se debe a la proporción de propóleo en las muestras, ya que la miel propolizada de Tunía presenta una mayor proporción de propóleo, por ende presenta mayor contenido mineral que la miel propolizada de Santander. Según el análisis de comparación de medias de Tukey (anexos, tabla

13), se observa que las dos mieles y la miel propolizada de Santander no son significativamente diferentes, por lo que el aporte del propóleo en la miel propolizada de Santander es muy mínima y es debido a la poca cantidad de propóleo usado en la preparación del producto; teniendo en cuenta las igualdades de medias, se puede analizar que el contenido mineral no es afectado por el tipo de región y el tipo de plantas utilizadas por las abejas para extraer el néctar.

La conductividad de la miel depende, además de los minerales, de las sales, los ácidos orgánicos, las proteínas, los azúcares y los polioles. Los valores de conductividad eléctrica de las mieles variaron notablemente. La conductividad eléctrica de la miel de Tunía es casi el doble de la miel de Santander; esta variación puede estar influenciada por la salinidad y textura de los suelos, la facilidad de las plantas para absorber iones, movilidad de iones en zonas con buena precipitación, aguas de lluvia y de riego con elevado contenido de sales, fertilizantes y aguas residuales. La miel propolizada de Tunía presenta mayor contenido de conductividad eléctrica que la miel propolizada de Santander y esto es debido a la contribución de la miel y propóleo a la muestra, dado que la miel de Tunía presenta buena conductividad eléctrica y se suma la contribución del extracto de propóleo que presenta una mayor proporción en la muestra. Según el análisis de comparación de medias de Tukey (anexos, tabla 14), las cuatro muestras analizadas presentan diferencias significativas, por tanto, el tipo de región y proporción en el contenido de propóleo de cada muestra si afecta este parámetro.

La acidez libre de la miel se puede expresar teniendo en cuenta la presencia de ácidos orgánicos, particularmente el ácido glucónico que es obtenido por la oxidación enzimática de la glucosa, en equilibrio con sus lactonas o ésteres e iones inorgánicos, como el fosfato y el cloruro, además, se encuentran ácidos como el fórmico, acético, cítrico, málico, oxálico, tartárico, pirúvico y succínico²⁶. Todas las muestras se encontraron por debajo del valor establecido para acidez

libre (≤ 50). La acidez más alta la presentó la miel de Santander, seguido de la miel de Tunía, por tanto, la miel de Santander presenta más ácidos orgánicos disociados; además, las mieles propolizadas presentaron menor contenido de acidez libre que sus mieles de origen, y por ende mayor valor de pH, esto es debido a que el pH del propóleo se encuentra alrededor de 4.3-7.3^{28 29}, es decir, más básico que el pH de la miel, por ende, el propóleo añadido causará un aumento en el valor de pH en las mieles propolizadas; la miel propolizada de Tunía presenta mayor contenido de propóleo, resultando en un aumento del valor del pH, respecto a la miel propolizada de Santander. Según la tabla 16 mostrada en la sección de anexos, el análisis de Tukey muestra que no hay diferencias entre las mieles propolizadas, pero si existe diferencia entre las mieles, es decir, que la cantidad de propóleo añadido afecta de la misma manera la acidez libre en las muestras de miel propolizada, mientras que la región si afecta significativamente la acidez libre en las muestras de miel.

La acidez láctica puede considerarse como una reserva potencial de acidez ya que la reserva en lactonas origina ácidos cuando la miel se alcaliniza. Tanto la acidez libre como la acidez láctica aumentan durante el almacenamiento, siendo mayor el incremento de las lactonas que de los ácidos libres. Durante el envejecimiento de la miel se da un aumento de la acidez debido a la acción de la glucosa oxidasa, que transforma los azúcares en ácidos³⁰. Teniendo en cuenta que no existe una normativa para este parámetro y que las muestras analizadas no presentaron almacenamiento, ya que fueron adquiridas una vez obtenidas, se puede decir que en las mieles existe una gran reserva de acidez láctica y una vez producido el almacenamiento o envejecimiento en las muestras, los productos comenzarán a ser más ácidos, disminuyendo su tiempo en el mercado. Según el análisis de Tukey (anexos, tabla 17), se presenta la misma tendencia que en la acidez libre, dando a conocer que no existen diferencias significativas entre las mieles propolizadas, pero si entre las mieles, mostrando mayor contenido de acidez láctica la miel de Santander, que la miel de Tunía, por tanto, teniendo en

cuenta éste análisis, la miel de Tunía podría ser el producto que presente mayor durabilidad en el mercado.

El tratamiento térmico para la miel puede dar como resultado la desnaturalización de las enzimas presentes de forma natural. La actividad de diastasa se usa comúnmente como una medida de la frescura de la miel, porque su actividad disminuye en la miel vieja o calentada, además, es un indicativo de la adulteración de mieles con almidón, ya que la actividad de esta enzima disminuiría notoriamente debido a que su función es catalizar la hidrólisis del almidón²⁵. El INVIMA exige un contenido de la enzima (≥ 8), y se observa en la tabla 2 que todas las muestras superaron este valor. La miel de Tunía presentó la mayor actividad, seguido de la miel de Santander, teniendo en cuenta que las muestras de miel se recogieron durante el mismo período, las diferencias en la actividad de diastasa podrían atribuirse a la variación en las condiciones climáticas entre ambas áreas; la región de Santander³¹ presenta un clima con un promedio de temperatura más alto que la miel de Tunía³², por tanto, su actividad es menor. Las mieles propolizadas presentaron una actividad menor de la enzima debido a una menor concentración de miel en las muestras por el extracto de propóleo añadido, sin embargo, ninguna de las muestras se encontró por debajo del límite permitido, que puede tomarse como un índice de frescura de todas las muestras y sin adulteración con almidón.

6.2 EXTRACCIONES DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En la tabla 3 se presentan los resultados de las concentraciones obtenidas en los dos tipos de extracciones realizadas.

Tabla 3. Concentraciones de los extractos.

	[]	MT	MS	MPT	MPS
Extracción L-L	mg/mL	8,267 ^a ±0,503	8,467 ^a ±0,611	10,667 ^b ±0,702	15,800 ^c ±0,400
	%m/m	0,826 ^a ±0,050	0,846 ^a ±0,061	1,066 ^b ±0,068	1,578 ^c ±0,038
Extracción EFS	mg/mL	---	---	8,200 ^b ±0,400	6,133 ^a ±0,503
	%m/m	---	---	4,095 ^b ±0,187	3,059 ^a ±0,245

^{a,b,c,d} Valores en fila con distinta letra son significativamente diferentes.

Teniendo en cuenta los dos tipos de extracción de compuestos fenólicos realizados para las muestras de miel propolizada, se observa que los porcentajes de extracción más bajos se obtuvieron en la extracción líquido - líquido, además, teniendo en cuenta el rendimiento, la extracción en fase sólida fue más eficiente debido al uso de 1 gramo de muestra en el procedimiento, mientras que en la extracción líquido – líquido se usaron 5 gramos de muestra, y es por esto que se presenta una mayor concentración de extracto. No obstante, más adelante se comprobará que se presentó mayor actividad antioxidante en las muestras obtenidas mediante la extracción líquido – líquido, es decir, que en este tipo de extracción se obtuvo una mayor concentración de polifenoles y por tal motivo, se realizó únicamente la extracción líquido-líquido para las muestras de miel.

La extracción líquido-líquido resultó ser más eficiente que la extracción en fase sólida en la separación de compuestos fenólicos, debido a que el solvente usado en la extracción líquido – líquido fue acetato de etilo, el cual presenta la ventaja de solubilizar los compuestos fenólicos, y separarlos de los azúcares interferentes, ya que los carbohidratos de la miel son insolubles en este tipo de disolventes. La desventaja que presentó la extracción en fase sólida fue que al usar el agua como eluyente para eliminar los componentes interferentes de la matriz como los azúcares, algunos compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido caféico, apigenina, kaempferol, entre otros son parcialmente solubles, lo que conduce a una disminución en la concentración de polifenoles extraídos.

Teniendo en cuenta lo anterior, se utilizó la extracción líquido-líquido para la extracción de polifenoles en las muestras de miel y miel propolizada y su posterior análisis cualitativo mediante espectrometría de masas.

6.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES

6.3.1 Contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Como se observa en la tabla 4 y el análisis ANOVA de un factor mostrado en la tabla 25, sección de anexos, existieron diferencias significativas entre las mieles, extractos de mieles propolizadas y extractos de propóleo en el contenido de polifenoles totales (expresados como mg de Ácido gálico/ g muestra). El extracto de propóleo de Santander presentó el mayor contenido de fenoles totales, mientras que la miel de Tunía presentó el menor contenido.

Estudios presentados por Ranneh et al.³³ y Ferreira et al.³⁴, en el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en cuatro muestras de miel de Malasia y Portugal respectivamente, reportan valores entre 0,200-0,710 mg AG/g muestra, es decir, valores más bajos que los reportados en las muestras de miel de este trabajo, por tanto, se observa que a pesar de que las muestras de mieles analizadas son el grupo que presenta menor contenido de polifenoles, respecto a otros estudios, estas mieles exhiben un buen contenido de fenoles totales. Dicho de otro modo, las mieles caucanas presentan superioridad en el contenido de polifenoles respecto a otros países de estudio.

Estudios en el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en veinte extractos etanólicos de propóleo en Corea y China como los de Choi et al.³⁵

y Ahn et al³⁶, reportan valores entre 43-300 mg AG/ g muestra. Comparando los resultados publicados con los obtenidos en este estudio, se observa que la muestra de propóleo de Tunía presentó contenido similar a los reportados anteriormente, mientras que el extracto de propóleo de Santander presentó 4,8 veces más contenido de fenoles totales que los extractos de propóleo mencionados, lo que quiere decir que a pesar del uso de 10 g más de propóleo de Santander para la extracción, este presenta un contenido mucho mayor de fenoles totales, deduciendo que es un producto potencialmente bueno.

Teniendo en cuenta los resultados, las mieles puras son el grupo que presenta un bajo contenido de polifenoles y el aumento que se presenta en el contenido para las mieles propolizadas se debe al aporte que brindan los extractos de propóleo, especialmente para la miel propolizada de Tunía, que contiene una mayor proporción de propóleo. Sin embargo, y como lo presenta el análisis comparativo de medias de Tukey (anexos, tabla 25), no se presentan diferencias significativas entre las mieles y mieles propolizadas, pero en los extractos realizados en las mieles propolizadas, se observa un aumento en el contenido de fenoles totales, excepto para la extracción líquido-líquido en la miel propolizada de Santander, lo que indica que las extracciones son confiables, debido a que eliminan gran parte de los interferentes, los cuales pueden ser azúcares que se encuentran en forma glicosilada con fenoles³⁷, es decir, unidos a una o más moléculas de azúcar.

6.3.2 Contenido de flavonoides totales por el método de tricloruro de aluminio.

En la tabla 4 y el análisis ANOVA de un factor mostrado en la sección de anexos (tabla 26), se observa que existen diferencias significativas entre las mieles, extractos de mieles propolizadas y extractos de propóleo en el contenido de flavonoides totales expresados, como mg de catequina/ g muestra. Similar al contenido de fenoles totales, el extracto de propóleo de Santander presentó el

mayor contenido de flavonoides totales, mientras que la miel de Tunía presentó el menor contenido.

Ranneh et al.³³ y Ferreira et al.³⁴ reportan contenidos de flavonoides totales en muestras de miel entre 0,065-0,600 mg de catequina/g muestra, lo que indica que las muestras de miel analizadas presentan menores contenidos de flavonoides respecto a estos estudios, por tanto, las mieles analizadas son ricas en polifenoles y pobres en flavonoides.

Igualmente, Choi et al.³⁵ y Ahn et al.³⁶ reportan en sus estudios contenidos de flavonoides totales en extractos de propóleo entre 8.3-168 mg catequina/g muestra, demostrando que el contenido de flavonoides en las muestras de extractos de propóleo analizadas se encuentran en ese rango, pero presentan un bajo contenido respecto a estudios.

Similar al contenido de polifenoles, las mieles propolizadas presentan un aumento en el contenido de flavonoides debido al aporte que brindan los extractos de propóleo, en este caso mayoritariamente para la miel propolizada de Santander, por la contribución del mayor contenido de flavonoides que presenta el propóleo de esta región. Sin embargo, el análisis comparativo de medias de Tukey (anexos, tabla 26), indica que no se presentan diferencias significativas entre las mieles y miel propolizadas, pero observando los extractos realizados en las mieles propolizadas, se presenta un aumento en el contenido de flavonoides totales, principalmente para los extractos de miel propolizada de Santander que superan al extracto de propóleo de Tunía, además se observa que los dos tipos de extractos en la misma muestra no presentan diferencias significativas, indicando que ambas extracciones son favorables para el contenido de flavonoides ya que se eliminan gran parte de los azúcares que son interferentes en la medida y que se pueden encontrar en forma glicosilada principalmente con los flavonoides³⁷.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para el contenido total de fenoles y flavonoides.

Tabla 4. Contenido total de fenoles y flavonoides para las muestras de miel, extracto de propóleo, miel propolizada y sus extractos.

Muestras	Fenoles totales (mg AG/ g muestra)	Flavonoides totales (mg Cat/ g muestra)
MT	0,775 ^a ±0,010	0,035 ^a ±0,003
MS	0,996 ^a ±0,019	0,079 ^a ±0,002
MPT	2,215 ^a ±0,012	0,097 ^a ±0,003
MPT-EFS	53,279 ^c ±0,297	5,189 ^b ±0,196
MPT-ELL	25,167 ^b ±0,089	5,497 ^b ±0,322
MPS	1,025 ^a ±0,012	0,173 ^a ±0,005
MPS-EFS	25,990 ^b ±0,173	10,172 ^d ±0,106
MPS-ELL	5,870 ^a ±0,056	10,291 ^d ±0,074
EEPT	186,474 ^d ±0,427	9,191 ^c ±0,234
EEPS	890,206 ^e ±6,108	15,237 ^e ±0,102

^{a,b,c,d} Valores con distinta letra son significativamente diferentes

6.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS DPPH Y ABTS

6.4.1 Actividad antioxidante por el método DPPH

En la tabla 5 se presentan los valores de CI_{50} obtenidos para los distintos controles, tipos de muestras y extractos. Cabe resaltar que para el caso de los valores expresados como CI_{50} , una mayor concentración de extracto requerida para atrapar los radicales significa una menor actividad antioxidante.

Una forma de comprobar si los resultados en esta metodología se encuentran

bien, es mediante el análisis de controles, es decir, compuestos que son conocidos y reportados con una buena actividad antioxidante como el ácido ascórbico, trolox y α -tocoferol. Se observa en la tabla 5 que estos controles mostraron la mayor actividad antioxidante respecto a las muestras de trabajo y que el ácido ascórbico y el trolox presentaron actividades antioxidantes similares. Al comparar los resultados con los controles, se observa que los controles presentan 30 veces más actividad antioxidante respecto al extracto de propóleo de Santander y 24.700 veces más que la miel de Tunía. Por tanto, comprobar esto, es un indicio de que la metodología y los resultados se realizaron de una buena manera.

Además, se observa en la tabla 5, que se obtuvo un resultado similar a los obtenidos en fenoles y flavonoides totales; la miel de Tunía presentó la menor actividad antioxidante y el extracto de propóleo de Santander la mayor actividad antioxidante respecto a las muestras. Reiterando que la miel de Tunía es la muestra con menor contenido de compuestos con actividad antiradicalaria mientras que el extracto de propóleo de Santander es la muestra con mayor contenido de compuestos de interés.

El análisis de comparación de medias de Tukey (anexos, tabla 27), muestra que no existen diferencias significativas para los tres controles, los extractos de mieles propolizadas y el extracto etanólico de propóleo de Santander, mientras que las demás muestras son significativamente diferentes, dando como resultado que las extracciones realizadas en las mieles propolizadas eliminan de manera satisfactoria los compuestos interferentes presentes en la matriz. Además, se observa que la actividad antioxidante es mejor en los extractos líquido – líquido debido a que el solvente usado para la extracción no es afín con los azúcares interferentes, extrayendo en mayor proporción los compuestos de interés.

Estudios realizados por Ferreira et al.³⁴, reportan valores de CI_{50} (mg/mL) en

actividad antioxidante por DPPH para muestras de mieles portuguesas entre 90-160 mg/mL, rango dentro del cual se encuentra la miel de Santander ($CI_{50}=76,517\pm 0,629$ mg/mL), mientras que la miel de Tunía presenta un CI_{50} mucho mayor, es decir, una actividad antioxidante muy baja ($CI_{50}=197,400\pm 1,446$ mg/mL), aproximadamente 2,6 veces más que la actividad antioxidante de MS. Por lo que entre las mieles, la miel de Santander es la que presenta mejor actividad antioxidante.

6.4.2 Actividad antioxidante por el método de ABTS

En la tabla 5 se presentan los valores de CI_{50} obtenidos para los controles, tipos de muestras y sus extractos.

Los valores de CI_{50} son mayores en ABTS que en DPPH, por lo que los controles son más afines a reaccionar con los radicales DPPH. Además, se observa que en el método DPPH fueron mejores el ácido ascórbico y el trolox, pero en el método ABTS fue mejor el α -tocoferol, por lo que este último es más afín a reaccionar con el radical ABTS que con el radical DPPH.

De la misma manera, se observa que la menor actividad antioxidante es presentada en la miel de Tunía ($CI_{50}=230,200\pm 5,434$) y la muestra con mayor actividad es el extracto de propóleo de Santander ($CI_{50}=0,771\pm 0,015$). Esta última prueba reafirma que estas muestras son las que presentan menor y mayor cantidad de fenoles, flavonoides, vitaminas, enzimas, vitaminas y aminoácidos respectivamente.

El análisis de comparación de medias de Tukey (anexos, tabla 28), muestra que no existen diferencias significativas para los tres controles, los extractos de mieles propolizadas y el extracto etanólico de propóleo de Santander, mientras que las demás muestras son significativamente diferentes, por tanto, las extracciones son

una gran alternativa para aislar compuestos fenólicos en muestras de miel. También, se observa que la actividad antioxidante es mejor en los extractos líquido – líquido.

El coeficiente de correlación de Pearson presentado en anexos (tabla 29), muestra que existe una buena correlación entre las actividades antioxidantes ($r=0,968$), indicando que casi la totalidad de los compuestos con actividad antioxidante presentes en las muestras reaccionan con los radicales DPPH y ABTS, mientras que presenta una correlación media para fenoles totales y baja para flavonoides totales, dando a entender que la actividad antioxidante está dada en su mayoría por compuestos fenólicos y en menor proporción por flavonoides. Sin embargo, no se puede considerar que la actividad antioxidante se deba solo a la presencia de fenoles, puesto que en su composición química, la miel puede presentar otros metabolitos secundarios que debido a su estructura contribuyan a su eficacia antioxidante como el ácido ascórbico, tocoferoles (vitamina E), algunos azúcares, carotenoides, aminoácidos y enzimas como la catalasa y peroxidasa

La tendencia en la actividad antioxidante es muy parecida entre los métodos DPPH y ABTS, la única diferencia radica entre los extractos líquido-líquido de las muestras. En el caso de la inhibición por DPPH, la muestra que presenta mayor actividad es MPS-ELL, mientras que en la inhibición por ABTS, presenta mayor actividad MPT-ELL, no obstante, las diferencias entre ellas son muy bajas.

Se observa un aumento significativo en los valores de actividades antioxidantes de las mieles propolizadas, respecto a sus mieles de origen, enfatizando nuevamente que la mayor actividad determinada en estas muestras está dada por el aporte de propóleo que presentan.

El extracto etanólico de propóleo de Tunía presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos que las mieles, mieles propolizadas y sus extractos, sin

embargo, presenta menor contenido de flavonoides que los extractos en las mieles propolizadas de Santander y menor actividad antioxidante que todos los extractos de mieles propolizadas, lo que indica que los extractos de miel propolizada presentan un mayor contenido de flavonoides y otros compuestos con actividad antioxidante, resultando así en una mayor actividad antioxidante.

Realizando un análisis más detallado en los resultados de los 3 controles usados en las dos pruebas antioxidantes, se observa que el ácido ascórbico y el trolox presentaron valores similares en las actividades antioxidantes respecto al α -tocoferol, esto se debe a que en el caso del ácido ascórbico, las especies reactivas de oxígeno toman electrones a partir del ascorbato, formando primero monodehidroascorbato y luego dehidroascorbato, es decir, es un donante de dos hidrógenos, el trolox es una molécula estructuralmente similar al α -tocoferol pero fácilmente soluble en medios acuosos que puede donar un hidrógeno, mientras que el α -tocoferol es un antioxidante lipofílico que presenta un alcohol aromático cuyo grupo OH puede donar un hidrógeno, sin embargo, su menor actividad antioxidante se debe al hecho de ser lipofílico y presentar una cinética más lenta³⁸.

Finalmente, en la actualidad, existe poca información sobre el consumo de compuesto fenólicos procedentes de la dieta, es por tanto necesario que las tablas de composición de alimentos incluyan datos sobre el contenido de compuestos fenólicos de interés nutricional de los alimentos con el objetivo de poder cuantificar la ingesta real de los mismos. Un estudio publicado por Navarro Gonzales et al.³⁹, estimó que la ingesta media de polifenoles de los finlandeses es de 863 mg/día, considerando que esta población tiene una dieta rica en polifenoles por la cantidad de frutos rojos que ingieren. Además, se estimó una ingesta diaria también para los sicilianos de 663,7 mg/día e incluso para los españoles de 820,0 mg/día. Por lo que concluyen que a nivel mundial se debe asociar un consumo elevado de polifenoles que sea >600 mg/día. En Colombia existe mayor disponibilidad de alimentos con alto contenido de polifenoles como frutas y

verduras, destacando el cacao, las legumbres, la cebolla, las uvas y otros frutos rojos. Además del alto consumo de té y café, por lo que la ingesta diaria puede ser menor que la de los países anteriormente nombrados, sin embargo, se observa en la tabla 5 que los productos de colmena analizados se encuentran por debajo de la ingesta recomendable (600 mg/día), por lo que se recomienda complementar la alimentación con productos con alto contenido de estos compuestos antioxidantes.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS.

Tabla 5. Actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS para los controles, muestras de miel, extracto de propóleo, miel propolizada y sus extractos.

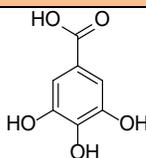
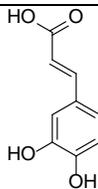
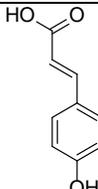
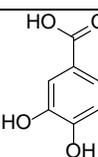
Muestras	Actividad antioxidante DPPH	Actividad antioxidante ABTS
	CI ₅₀ (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)
A.A	0,008 ^a ±0,000	0,077 ^a ±0,000
α-T	0,013 ^a ±0,001	0,059 ^a ±0,001
Trolox	0,007 ^a ±0,000	0,079 ^a ±0,001
MT	197,400 ^f ±1,446	230,200 ^f ±5,434
MS	76,517 ^e ±0,629	86,750 ^e ±0,726
MPT	10,459 ^d ±0,124	71,200 ^d ±0,469
MPS	7,887 ^c ±0,135	19,052 ^c ±0,017
MPT-EFS	1,266 ^a ±0,007	4,415 ^a ±0,125
MPT-ELL	0,745 ^a ±0,009	0,839 ^a ±0,006
MPS-EFS	0,842 ^a ±0,008	1,588 ^a ±0,033
MPS-ELL	0,619 ^a ±0,004	0,865 ^a ±0,005
EEPT	5,467 ^b ±0,007	11,942 ^b ±0,105
EEPS	0,244 ^a ±0,006	0,771 ^a ±0,015

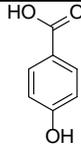
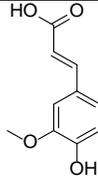
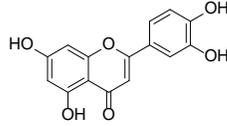
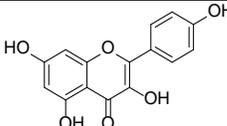
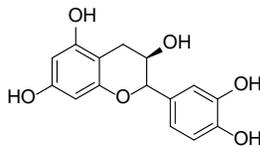
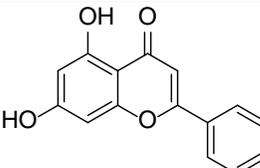
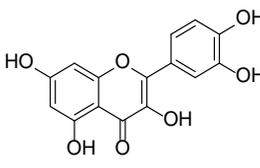
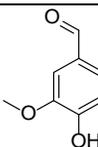
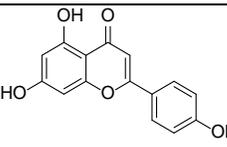
^{a,b,c,d} Valores con distinta letra son significativamente diferentes.

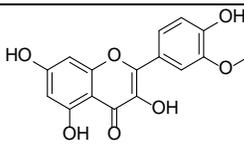
6.5 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En ausencia de estándares, la identificación de polifenoles se basa en la búsqueda de la masa de la molécula y su fragmentación. La búsqueda en masa exacta y el estudio de las vías de fragmentación descritas en la literatura y en la biblioteca (NIST) permitieron obtener la mayor información estructural posible. De esta manera, fue posible identificar seis ácidos fenólicos y seis flavonoides. La Tabla 6 resume los datos obtenidos para los 14 compuestos analizados en cada extracto de muestra por espectrometría de masas y los fragmentos que se tuvieron en cuenta para identificarlos.

Tabla 6. Fragmentaciones de los compuestos fenólicos analizados por espectrometría de masas.

Compuestos fenólicos	Masa exacta	Estructura	Fragmentos (m/z)
Ácido gálico	170.021523		153 [M-OH] 125 [M-COOH]
Ácido caféico	180.042258		163 [M-OH] 135 [M-COOH]
Ácido <i>p</i> -coumárico	164.047344		163 [M-H] 148 [M-OH] 119 [M-(COOH)]
Ácido protocatecúico	154.026608		137 [M-OH] 109 [M-COOH]

Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	138.031694		121 [M-OH] 93 [M-COOH]
Ácido Ferúlico	194.057909		177 [M-OH] 149 [M-COOH] 163 [M-OCH ₃]
Luteolina	286.047737		285 [M-H] 269 [M-OH] 258 [M-CO]
Kaempferol	286.047737		269 [M-OH] 258 [M-CO] 257 [M-CHO]
Catequina	290.079039		272 [M-OH] 262 [M-CO] 123 [M-C ₉ H ₁₁ O ₃] 107 [M-C ₉ H ₁₁ O ₄]
Crisina	254.057909		236 [M-OH] 226 [M-CO] 152 [M-C ₈ H ₆] 124 [M-C ₉ H ₆ O]
Quercetina	302.042652		273 [M-CHO] 257 [M-CHO ₂] 245 [M-C ₂ HO ₂] 137 [M-C ₉ H ₉ O ₃]
Vanilina	152.047344		151 [M-H] 137 [M-CH ₃] 123 [M-CHO]
Apigenina	270.052824		253 [M-OH] 242 [M-CO] 227 [M-C ₂ H ₂ O]

			213 [M-C ₂ O ₂ H]
			315 [M-H]
Isoharmnetina	316.058302		297 [M-OH]
			287 [M-CO]

Los espectros de masas de los compuestos fenólicos analizados para cada muestra comercial, se obtuvieron a energías de colisión entre 20-40 eV y se muestran en la sección 10.3 de anexos. Inicialmente, la energía de colisión se mantuvo a 10 eV para transmitir iones de cada molécula con el fin de obtener un pico bien formado para esta especie iónica; luego, después de 1 minuto, la energía de colisión se incrementó durante los siguientes 3 minutos para observar los iones fragmentos de cada compuesto fenólico.

Se observó una ruta de fragmentación común basada en la pérdida del grupo COOH y OH para todos los ácidos fenólicos identificados en las muestras. Se identificaron los ácidos hidroxibenzoico (ácido gálico, protocatecúico y *p*-hidroxibenzoico) y los ácidos hidroxicinámico (caféico, *p*-coumárico y ferúlico). Los ácidos fenólicos comparten una ruta de fragmentación común basada en la pérdida del grupo CO₂ que resulta en [M-CO₂], m/z 44.

A continuación se presentan algunos fragmentos característicos para los compuestos fenólicos analizados.

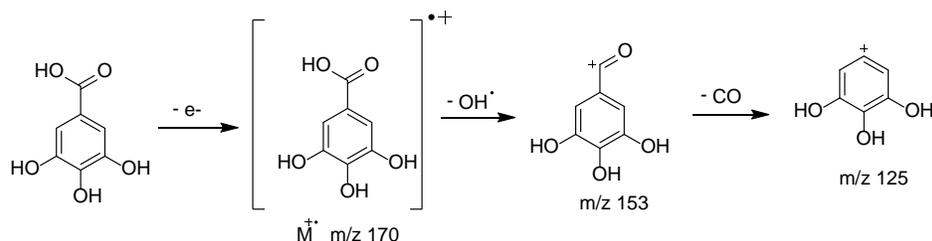


Figura 9. Fragmentación del ácido gálico.

El ácido gálico produjo fragmentos característicos a m/z 153 y 125

correspondientes a la pérdida de OH y COOH respectivamente. En el ácido *p*-hidroxibenzoico (anexos 10.3, figura 18), se produjeron dos fragmentos característicos en *m/z* 93 y *m/z* 121 por eliminación de los grupos COOH y OH de la molécula. Además, el ácido protocatecúico (anexos 10.3, figura 17), produjo fragmentos a *m/z* 137 y 109 debidos a la pérdida de OH y COOH respectivamente.

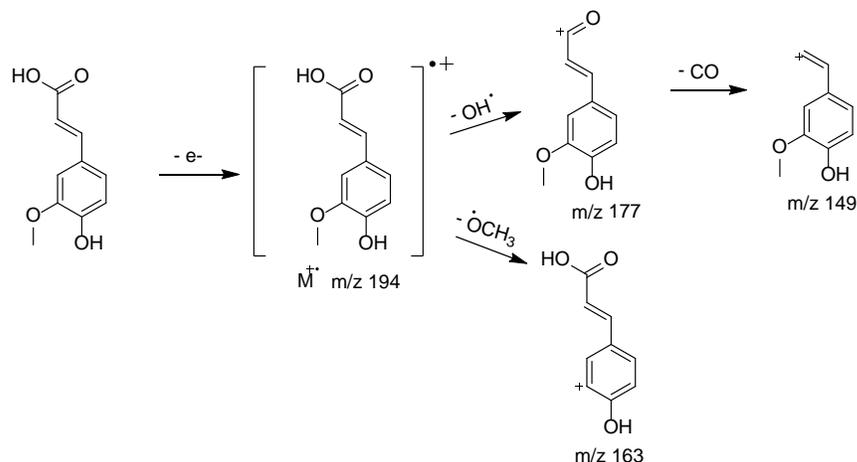


Figura 10. Fragmentación del ácido ferúlico.

El ácido ferúlico se identificó provisionalmente con una pérdida de fragmentación específica de COOH y OCH₃. El ácido caféico (anexos 10.3, figura 15), mostró fragmentos característicos a *m/z* 163 y 135. Además, el ácido *p*-coumárico (anexos 10.3, figura 16), produce iones a *m/z* 163 y 119, correspondientes a los fragmentos H y COOH respectivamente.

Se detectaron dos subclases de flavonoides en las muestras: flavonoles (Isoharmnetina, quercetina y kaempferol) y flavonas (Apigenina, crisina y luteolina). La pérdida de grupos como H₂O (M-18), CO (M-28), CHO (M-29) y CO₂ (M-44) son comunes para los flavonoides y estos fragmentos característicos fueron encontrados. Los compuestos fenólicos metilados o metoxilados se caracterizaron por la pérdida de CH₃ (M-15). Aparte de estos, los fragmentos estructuralmente más informativos son los que se producen en la reacción retro-Diels-Alder (RDA), como es el caso de algunos fragmentos presentes en

apigenina, quercetina y kaempferol. La reacción RDA es la reacción de fragmentación principal para los flavonoides, particularmente importante para la caracterización estructural de las agliconas y la parte de aglicona de los conjugados de flavonoides⁴⁰.

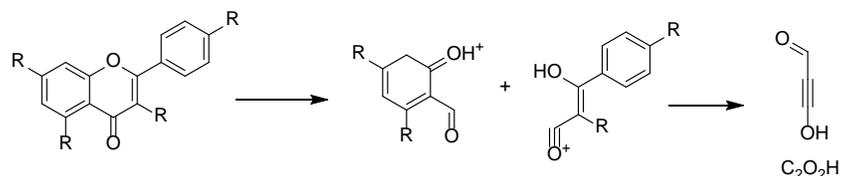


Figura 11. Reacción general retro Diels-Alder para flavonoides⁴⁰.

La luteolina y el kaempferol son isómeros estructurales debido a que presentan la misma masa molar y la mayoría de patrones de fragmentación idénticos, resultando en el análisis de iones producto idénticos. A continuación se muestra la fragmentación de estos flavonoides.

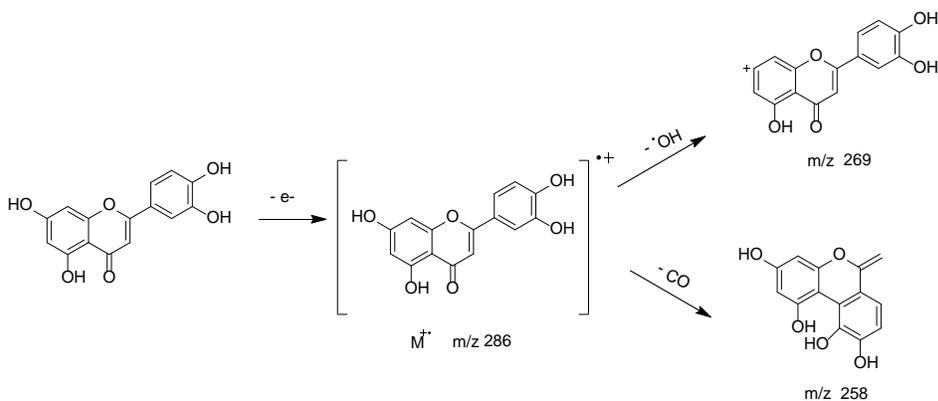


Figura 12. Fragmentación de la luteolina.

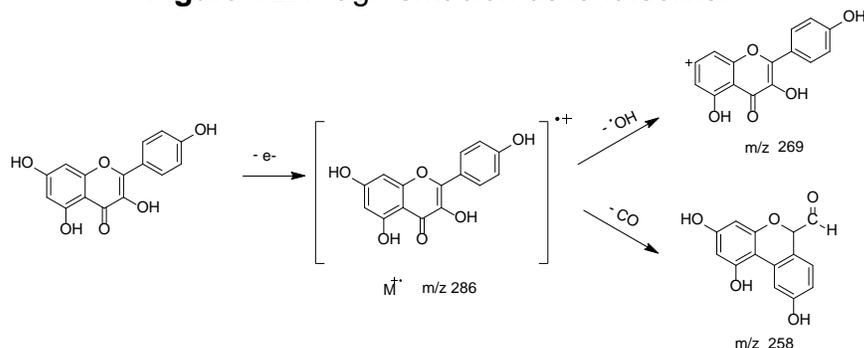


Figura 13. Fragmentación del kaempferol.

Por su parte, la apigenina (anexos 10.3, figura 24), presentó fragmentos característicos a m/z 253 y 242 generados por la pérdida de OH y CO respectivamente, además, presentó fragmentos característicos de la RDA a m/z de 213, 135 y 108 respectivamente. La isoharmnetina (anexos 10.3, figura 25), presentó fragmentaciones a m/z 299, 285 y 288 producidos por la pérdida de OH, OCH₃ y CO respectivamente.

A continuación se presenta la tabla con los resultados obtenidos de la presencia de compuestos fenólicos para cada muestra, analizados por espectrometría de masas (los espectros obtenidos se encuentran en la sesión de anexos, 10.3).

Tabla 7. Resultados de compuestos fenólicos presentes en las muestras.

Compuestos fenólicos	MT- ELL	MS- ELL	MPT- ELL	MPS- ELL	EEPT	EEPS
Ácido gálico	x	x	x	x	x	x
Ácido caféico	x	x	x	x	x	x
Ácido <i>p</i> - coumárico	x	x	x	x	x	x
Ácido protocatecúico				x		x
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	x	x	x	x		x
Ácido ferúlico	x	x	x	x		x
Luteolina	x		x	x		x
Kaempferol	x		x	x		x
Quercetina						x
Vanilina	x	x	x	x	x	x
Apigenina	x	x	x	x		x
Isoharmnetina			x	x		x
Catequina						
Crisina						

En la tabla 7 se observa que todas las muestras presentaron en común, los compuestos: Ácido gálico, ácido caféico, ácido coumárico y vanilina, mientras que

ácido protocatecúico, luteolina, kaempferol, apigenina e isoharmnetina se encontraron en algunas muestras; catequina y crisina reportadas en otros estudios, no se observaron en las muestras analizadas. Los flavonoides fueron los menos encontrados mediante espectrometría de masas, según la tabla 7, esto se relaciona con el contenido de fenoles y flavonoides totales, ya que el contenido de fenoles fue relativamente alto en las muestras respecto al contenido de flavonoides.

La quercetina se encontró únicamente en el extracto de propóleo de Santander pero no en la miel propolizada de Santander, presumiblemente por la concentración.

La composición de la miel propolizada en la mayoría de los casos refleja el resultado de la suma de compuestos de los materiales de partida, lo que le daría a este producto una amplia gama de usos terapéuticos.

7. CONCLUSIONES

La miel de Tunía presentó mayor contenido de sólidos insolubles en agua, humedad, contenido aparente de sacarosa, conductividad eléctrica e índice de diastasa, mientras que la miel de Santander presentó mayor contenido de azúcares reductores, acidez libre, lactónica y total, además, el contenido de cenizas fue similar para ambas mieles. Todos los parámetros fisicoquímicos analizados para las muestras de miel cumplieron con la normativa exigida por el INVIMA.

Las diferencias presentadas en los parámetros fisicoquímicos por las mieles y mieles propolizadas se pueden explicar entre otras razones por el clima, región y flora presente alrededor de las colmenas, dichas diferencias se pueden establecer de la misma manera para mieles propolizadas y extractos de propóleo, al analizar la actividad biológica.

El extracto etanólico de propóleo de Santander presentó un mayor contenido de fenoles, flavonoides totales y actividad antioxidante por DPPH y ABTS, demostrando que este producto podría utilizarse como materia prima en la industria farmacéutica y/o alimentaria debido a la amplia gama de beneficios para la salud que aportaría.

La miel de Tunía presentó los menores valores en el contenido de fenoles, flavonoides totales y actividad antioxidante por DPPH y ABTS, sin embargo, respecto a comparaciones con resultados reportados en la literatura, este tipo de miel presenta un buen contenido fenólico.

Respecto a la miel, las mieles propolizadas presentan un considerable aumento en su contenido fenólico y propiedades antioxidantes debido al aporte de propóleo añadido en los productos, resultando así, en un nuevo producto recomendable para consumo humano.

Las extracciones realizadas a las muestras de miel propolizada resultaron favorables, debido a un considerable aumento en los resultados de las pruebas antioxidantes y en la eliminación de interferentes de la matriz, de acuerdo con los resultados.

Los valores de CI_{50} más bajos y por ende actividades antioxidantes más altas indican que la extracción líquido-líquido de las mieles propolizadas resultó ser mejor que la extracción en fase sólida.

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que todas las pruebas llevadas a cabo presentaron una distribución normal y por ende se le aplicaron pruebas paramétricas para el análisis de los resultados, obteniendo que por lo menos una de las muestras en los diferentes ensayos fue significativamente diferente.

Las concentraciones de flavonoides en todas las muestras fueron menores que las concentraciones de los ácidos fenólicos encontradas, lo que corrobora su bajo aporte al análisis de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS establecido mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Es importante analizar la calidad, determinar la composición fenólica y el origen botánico de la miel, el propóleo, y las preparaciones derivadas de las mismas, ya que conocer la composición exacta, tendría un impacto directo en las reales aplicaciones de los mismos.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar productos de colmena de otras regiones del departamento del Cauca para conocer y comparar el potencial terapéutico que puedan presentar.

Realizar el análisis melisopalínológico para conocer con certeza el origen botánico de las mieles y propóleo con el fin de relacionar el poder antioxidante de las muestras con las plantas de origen.

Como estrategia de continuidad del presente trabajo se recomienda llevar a cabo la optimización de las extracciones de compuestos fenólicos en productos de la colmena para observar cual presenta mayor actividad antioxidante y su cuantificación.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Gül, A. & Pehlivan, T. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1056–1065 (2018).
2. Nascimento, K. S. do *et al.* Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. *LWT - Food Sci. Technol.* **91**, 85–94 (2018).
3. Vásquez, Efrén., Camargo, Rocio., Ortega, Nelly., Maldonado, W. *Implementación de buenas prácticas apícolas y mejoramiento genético para la producción de miel y polen.* (2015).
4. Ulloa, J. A., Mondragón, P. M., Rodríguez, R., Reséndiz, J. A. & Rosas, P. R. La miel de abeja y su importancia. *Rev. Fuente Año* **2**, 11–18 (2010).
5. Escriche, I. & Juan-Borrás, M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Res. Int.* **106**, 834–841 (2018).
6. Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M. A., López-Díaz, T. M. & Sancho, M. T. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem.* **196**, 1215–1223 (2016).
7. Losada-Barreiro, S. & Bravo-díaz, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **133**, 379–402 (2017).
8. Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. & Bravo, J. A. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Boliv. J. Chem.* **31**, 68–81 (2014).
9. Fuentes, E. Extracción y preconcentración en preparación de muestras. *Univ. Chile* 1–34 (2003).
10. Fernandez Segovia, I., García Martínez, E. & Fuentes Lopez, A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Univ. Politécnica Val.*
11. Amaya Rodriguez, M. & Portillo Membreño, C. DETERMINACIÓN DE FENOLES, FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MELAZA, AZUCAR BLANCO Y MORENO EN EL INGENIO CHAPARRASTIQUE POR EL METODO DE ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE. *Univ. El Salvador* (2013).

12. Sánchez, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2**, (2017).
13. Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S. & Tamendjari, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Ind. Crops Prod.* **88**, 85–90 (2016).
14. Patrignani, M., Fagúndez, G. A., Tananaki, C., Thrasyvoulou, A. & Lupano, C. E. Volatile compounds of Argentinean honeys: Correlation with floral and geographical origin. *Food Chem.* **246**, 32–40 (2018).
15. Palomino, L., Martínez, J., García, C., Gíl, J. & Durango, D. Physicochemical Characterization and Antimicrobial Activity of Propolis from Municipality of La Union (Antioquia, Colombia). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellí* **63**, 5373–5383 (2010).
16. Urrego, J. F. Carecterizacion de Mieles de Abeja Apis mellifera, Colectadas De Diferentes Regiones de Antioquia, de acuerdo con los parámetros establecidos por la legislacion colombiana y demás criterios que contribuyen a la calidad. *Universidad N* (2017).
17. Benítez, R., Tandioy, A. & Astaiza, P. COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES ENTRE LA MIEL NATURAL Y LA MIEL EXPRESS LECHE DE SOYA (Glycine max). *Fac. Ciencias Agropecu. - Univ. del Cauca.* 1–4 (2005).
18. Lenis, Luis Ruales, C. & Benitez, R. DETERMINACIÓN DE GLÍCOSIDOS , EN MIEL EXPRESS DE ESTEVIA (Stevia rebaudiana) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSÍDEOS , NO MEL EXPRESSO DAS ESTÉVIA (Stevia reba. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* **2**, 85–92 (2013).
19. International, A. *AOAC: Official Methods of Analysis, 2016.* (2016).
20. Lachman, J. *et al.* Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chem.* **101**, 973–979 (2006).
21. Colombia. Ministerio de la protección social. Resolucion 1057. Reglamento técnico sobre requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para consumo humano. 9 (2010).
22. Tahir, H. E. *et al.* Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant

- activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chem.* **226**, 202–211 (2017).
23. Biluca, F. C. *et al.* Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). *J. Food Compos. Anal.* **63**, 89–97 (2017).
 24. Alvarez-Suarez, J. M. *et al.* Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color , polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2490–2499 (2010).
 25. Correa, A. Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas. *Univ. Nac. Colomb.* 140 (2015).
 26. Feás, X., Pires, J., Iglesias, A. & Estevinho, M. L. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3462–3470 (2010).
 27. Molano, J. & Batista, J. M. Calendario climatológico aeronáutico colombiano. *Soc. Geográfica Colomb.* **25**, 1–9 (2007).
 28. Souza, E. A., Inoue, H. T., Gomes, S. M. A., Funari, S. R. C. & Orsi, R. O. Propriedade Físico-Química Da Própolis em Funcao Da Sazonalidade e Método de Producao. *Arch. Zootec.* **59**, 571–576 (2010).
 29. Tagliacollo, V. A. & Orsi, R. de O. Quality of propolis commercialized in the informal market. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **31**, 752–757 (2011).
 30. Cavia, M. M., Fernández-Muiño, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F. & Sancho, M. T. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chem.* **100**, 1728–1733 (2007).
 31. AccuWeather. El tiempo en Santander de Quilichao - Pronóstico de AccuWeather para Cauca Colombia (ES). Disponible en: <https://www.accuweather.com/es/co/santander-de-quilichao/107886/weather-forecast/107886>. (Consultado: 19a noviembre 2018)
 32. AccuWeather. El tiempo cada hora para Piendamó - Pronóstico de AccuWeather para Cauca Colombia (ES). Disponible en:

<https://www.accuweather.com/es/co/piendam/107942/hourly-weather-forecast/107942>. (Consultado: 19a noviembre 2018)

33. Ranneh, Y. *et al.* Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* **89**, 1–9 (2018).
34. Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M. & Estevinho, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* **114**, 1438–1443 (2009).
35. Choi, Y. M. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 756–761 (2006).
36. Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S. & Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* **52**, 7286–7292 (2004).
37. Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* **27**, 76–89 (2012).
38. Padilla, R. D. and R. B. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites* **44**, 107–111 (1993).
39. Navarro González, I., Periago, M. J. & García Alonso, F. J. Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Rev. Española Nutr. Humana y Dietética* **21**, 320 (2017).
40. Keckes S, Gasic U, Cirkovic T, Milojkovic, D. & Kec, S. *et al.* The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography / high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem.* **138**, 32–40 (2013).

10. ANEXOS

10.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

10.1.1 Reactivos

En la tabla 8 se resumen los reactivos y solventes empleados en el desarrollo del trabajo.

Tabla 8. Reactivos y solventes.

Reactivos y solventes	Especificaciones
Sílice C18, cloruro de sodio, nitrito de sodio, ácido gálico, ABTS (sal diamónica del ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), Trolox, α -tocoferol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Sacarosa, almidón, acetato de etilo, alcohol etílico absoluto, metanol (HPLC)	Mallinckrodt CHEMICALS
Azul de metileno, alcohol reactivo grado HPLC	Fisher Scientific
Sulfato de sodio anhidro, ácido ascórbico, sulfato de cobre pentahidratado	Carlo Erba Reagents
Hidróxido de sodio, cloruro de aluminio, persulfato de potasio, yodo, carbonato de sodio, ácido clorhídrico, yoduro de potasio, metanol	Merck
Tartrato de sodio y potasio	Baker's Analyzed
Reactivo Folin-Ciocalteu	Panreac

10.1.2 Equipos

En la tabla 9 se presentan los equipos usados en el desarrollo del trabajo.

Tabla 9. Equipos.

Equipos	Marca	Especificaciones
Potenciómetro	Fisher Scientific	AB 15
Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible	Thermo Scientific	Génesis 6
Balanza analítica ($\pm 0,0000$)	Ohaus	Adventure (EE.UU.)
Espectrofotómetro Vis	Cole Parmer	1100RS SPECTROPHOTOMETER
Conductímetro	Orión	Models 105
Termostato	Fisher Scientific	Isotemp 120
Evaporador Rotatorio	Heidolph	LABOROTA 4001
Mufla	Terrígeno	Modelo F2PGA
Desecador	Duran	
Estufa	Fisher Scientific	Isotemp 737 F Oven
Espectrómetro de masas	Thermo Scientific	LCQ FLEET
Refractómetro	Abbe Mark II	Modelo 10480
Polarímetro	ATAGO	AP-300
Ultrasonido	Branson	1510
Vortex	Thermolyne Sybron	37600 Mixer
Equipo para extracción en fase sólida	SUPELCO	VISIPREP DL™

10.2 ESTADÍSTICA

10.2.1 Sólidos insolubles

Tabla 10. Pruebas estadísticas para el contenido de sólidos insolubles en miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,926	3	0,473		
MS	0,858	3	0,262		
MPT	0,987	3	0,783		
MPS	0,910	3	0,418		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0,015	3	0,005	32,739	0,000
Dentro de grupos	0,001	8	0,000		
Total	0,017	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	
MS	3	0,214			
MT	3		0,248		
MPS	3		0,276		
MPT	3			0,312	
Sig.		1,000	0,108	1,000	

10.2.2 Humedad

Tabla 11. Pruebas estadísticas para el contenido de humedad en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	1,000	3	1,000		
MS	0,964	3	0,637		
MPT	1,000	3	1,000		
MPS	1,000	3	1,000		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	20,520	3	6,840	513,000	0,000
Dentro de grupos	0,107	8	0,013		
Total	20,627	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	d
MS	3	17,533			
MT	3		19,000		
MPS	3			20,200	
MPT	3				21,000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

10.2.3 Contenido aparente de azúcar reductor

Tabla 12. Pruebas estadísticas para el contenido de azúcares reductores en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,861	3	0,269		
MS	0,951	3	0,573		
MPT	0,964	3	0,637		
MPS	0,969	3	0,664		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1973,944	3	657,981	292,436	0,000
Dentro de grupos	18,000	8	2,250		
Total	1991,944	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	d
MT	3	53,933			
MS	3		63,517		
MPT	3			77,633	
MPS	3				87,350
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

10.2.4 Cenizas

Tabla 13. Pruebas estadísticas para el contenido de cenizas en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,991	3	0,817		
MS	0,980	3	0,726		
MPT	0,787	3	0,085		
MPS	0,885	3	0,339		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0,028	3	0,009	29,805	0,000
Dentro de grupos	0,003	8	0,000		
Total	0,031	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b		
MT	3	0,538			
MS	3	0,540			
MPT	3	0,576			
MPS	3		0,658		
Sig.		0,122	1,000		

10.2.5 Conductividad eléctrica

Tabla 14. Pruebas estadísticas para el contenido de conductividad eléctrica en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,855	3	0,253		
MS	0,980	3	0,726		
MPT	0,893	3	0,363		
MPS	0,987	3	0,780		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0,190	3	0,063	5759,152	0,000
Dentro de grupos	0,000	8	0,000		
Total	0,190	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	d
MS	3	0,254	0,434	0,486	0,603
MPS	3				
MT	3				
MPT	3				
Sig.		1,000	1,000	1,000	

10.2.6 pH

Tabla 15. Pruebas estadísticas para el análisis de pH en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,964	3	0,637		
MS	0,964	3	0,637		
MPT	1,000	3	0,637		
MPS	1,000	3	0,637		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,908	3	0,366	237,382	0,000
Dentro de grupos	0,012	8	0,002		
Total	1,110	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	d
MS	3	3,68	3,91	4,05	4,51
MT					
MPS					
MPT					
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

10.2.7 Acidez libre, láctica y total

Acidez libre

Tabla 16. Pruebas estadísticas para el análisis de acidez libre en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,956	3	0,595		
MS	0,984	3	0,754		
MPT	0,967	3	0,653		
MPS	0,767	3	0,038		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	276,467	3	92,156	42,299	0,000
Dentro de grupos	17,430	8	2,179		
Total	293,896	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	
MPT	3	28,339			
MPS	3	29,936	29,936		
MT	3		33,436		
MS	3			40,805	
Sig.		0,574	0,076	1,000	

Acidez láctónica

Tabla 17. Pruebas estadísticas para el análisis de acidez láctónica en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,924	3	0,468		
MS	0,937	3	0,515		
MPT	0,967	3	0,649		
MPS	0,830	3	0,188		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	221,355	3	73,785	36,287	0,000
Dentro de grupos	16,267	8	2,033		
Total	237,622	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	
MPT	3	27,470			
MPS	3	28,855	28,855		
MT	3		31,713		
MS	3			38,614	
Sig.		0,649	0,143	1,000	

Acidez total

Tabla 18. Pruebas estadísticas para el análisis de acidez total en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,941	3	0,533		
MS	0,964	3	0,634		
MPT	0,982	3	0,741		
MPS	0,794	3	0,100		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	992,343	3	330,781	39,432	0,000
Dentro de grupos	67,108	8	8,389		
Total	1059,452	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	
MPT	3	55,808			
MPS	3	58,791	58,791		
MT	3		65,149		
MS	3			79,419	
Sig.		0,609	0,103	1,000	

10.2.8 Contenido aparente de sacarosa

Tabla 19. Pruebas estadísticas para el contenido aparente de sacarosa en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,923	3	0,463		
MS	0,987	3	0,780		
MPT	1,000	3	1,000		
MPS	0,949	3	0,567		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0,002	3	0,001	64,515	0,000
Dentro de grupos	0,000	8	0,000		
Total	0,002	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel		N	Subconjunto para alfa=0,05		
			a	b	c
MPT	3	0,016			
MPS	3		0,0293		
MS	3		0,0333		
MT	3				0,0507
Sig.		1,000	0,435		1,000

10.2.9 Índice de la diastasa

Tabla 20. Pruebas estadísticas para la actividad de diastasa en muestras de miel y miel propolizada.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,838	3	0,208		
MS	1,000	3	0,996		
MPT	0,924	3	0,467		
MPS	0,998	3	0,907		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	897,372	3	299,124	1244,655	0,000
Dentro de grupos	1,923	8	0,240		
Total	899,295	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	d
MPT	3	22,184			
MPS	3		24,858		
MS	3			26,432	
MT	3				44,152
Sig.	3	1,000	1,000	1,000	1,000

10.2.10 Extracción líquido - líquido

Tabla 21. Pruebas estadísticas para la extracción líquido - líquido en muestras de miel y miel propolizada, expresadas como mg/mL.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,987	3	0,780		
MS	0,964	3	0,637		
MPT	0,993	3	0,843		
MPS	1,000	3	1,000		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	110,640	3	36,880	115,250	0,000
Dentro de grupos	2,560	8	0,320		
Total	113,200	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	
Miel Tunía	3	8,267			
Miel Santander	3	8,467			
Miel propolizada Tunía	3		10,667		
Miel propolizada Santander	3			15,800	
Sig.		0,971	1,000	1,000	

Tabla 22. Pruebas estadísticas para la extracción líquido - líquido en muestras de miel y miel propolizada, expresadas como %m/m.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
MT	0,986	3	0,773		
MS	0,963	3	0,632		
MPT	0,994	3	0,849		
MPS	1,000	3	0,984		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,102	3	0,367	118,623	0,000
Dentro de grupos	0,025	8	0,003		
Total	1,127	11			
HSD Tukey					
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05			
		a	b	c	
Miel Tunía	3	0,826			
Miel Santander	3	0,846			
Miel propolizada Tunía	3		1,066		
Miel propolizada Santander	3			1,578	
Sig.		0,970	1,000	1,000	

10.2.11 Extracción en fase sólida

Tabla 23. Pruebas estadísticas para las extracciones en muestras de miel propolizada expresadas como mg/mL.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk			
Muestra	Estadístico	gl	Sig.
MPT	1,000	3	1,000
MPS	0,987	3	0,780
Prueba de muestras independientes			
Prueba de igualdad de varianzas (Levene)			
P valor= 0,676	>		$\alpha=0,05$

Conclusión: Se acepta la hipótesis nula, las varianzas son iguales.

Valor de la prueba o significancia=0,005		
P valor (t student)=0,005	<	$\alpha=0,05$

Se rechaza la hipótesis nula: Existe diferencias significativas entre las medias.

Tabla 24. Pruebas estadísticas para las extracciones en muestras de miel propolizada expresadas como %m/m.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk			
Muestra	Estadístico	gl	Sig.
MPT	1,000	3	0,997
MPS	0,988	3	0,787
Prueba de muestras independientes			
Prueba de igualdad de varianzas (Levene)			
P valor= 0,641		>	$\alpha=0,05$

Conclusión: Se acepta la hipótesis nula, las varianzas son iguales.

Valor de la prueba o significancia=0,005		
P valor (t student)=0,004	<	$\alpha=0,05$

Se rechaza la hipótesis nula: Existe diferencias significativas entre las medias.

10.2.12 Fenoles totales

Tabla 25. Pruebas estadísticas para el contenido de fenoles totales en muestras y extractos.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk			
Muestra	Estadístico	gl	Sig.
MT	0,930	3	0,490
MS	0,919	3	0,450
MPT	0,984	3	0,762
MPS	0,904	3	0,398
MPT-EFS	0,987	3	0,783
MPT-ELL	0,964	3	0,637
MPS-EFS	1,000	3	1,000
MPS-ELL	0,964	3	0,637

EEPT	1,000	3	0,999			
EEPS	0,871	3	0,298			
ANOVA un factor						
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Entre grupos	2068031,664	9	229781,296	61085,609	0,000	
Dentro de grupos	75,233	20	3,762			
Total	2068106,897	29				
HSD Tukey						
Muestras	N	Subconjunto para alfa=0,05				
Miel		a	b	c	d	e
MT	3	0,775				
MS	3	0,996				
MPS	3	1,025				
MPT	3	2,215				
MPS-ELL	3	5,870				
MPT-ELL	3		25,167			
MPS-EFS	3		25,990			
MPT-EFS	3			53,279		
EEPT	3				186,474	
EEPS	3					890,206
Sig.		0,095	1,000	1,000	1,000	1,000

10.2.13 Flavonoides totales

Tabla 26. Pruebas estadísticas para el contenido de flavonoides totales en muestras y extractos.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk						
Muestra	Estadístico	gl	Sig.			
MT	0,871	3	0,298			
MS	0,987	3	0,780			
MPT	0,964	3	0,637			
MPS	0,893	3	0,363			
MPT-EFS	0,932	3	0,497			
MPT-ELL	0,996	3	0,878			
MPS-EFS	0,893	3	0,363			
MPS-ELL	0,965	3	0,642			
EEPT	0,902	3	0,391			
EEPS	0,965	3	0,640			
ANOVA un factor						
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Entre grupos	810,149	9	90,017	4016,773	0,000	
Dentro de grupos	0,448	20	0,022			
Total	810,597	29				
HSD Tukey						
Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05				
		a	b	c	d	e
MT	3	0,035				
MS	3	0,079				
MPT	3	0,097				
MPS	3	0,173				
MPT-EFS	3		5,189			
MPT-ELL	3		5,497			
EEPT	3			9,191		

MPS-EFS	3				10,172	
MPS-ELL	3				10,291	
EEPS	3					15,237
Sig.		0,975	0,314	1,000	0,991	1,000

10.2.14 Actividad antioxidante por DPPH

Tabla 27. Pruebas estadísticas la actividad antioxidante por DPPH en muestras y extractos.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk					
Muestra	Estadístico	gl	Sig.		
A.A	0,855	3	0,253		
α -T	0,934	3	0,502		
Trolox	0,964	3	0,637		
MT	0,871	3	0,298		
MS	0,873	3	0,305		
MPT	0,962	3	0,627		
MPS	0,999	3	0,939		
MPT-EFS	0,934	3	0,503		
MPT-ELL	0,976	3	0,706		
MPS-EFS	0,994	3	0,847		
MPS-ELL	0,978	3	0,717		
EEPT	1,000	3	1,000		
EEPS	0,899	3	0,382		
ANOVA un factor					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	114071,888	12	9505,991	49003,560	0,000
Dentro de grupos	5,044	26	0,194		
Total	114076,931	38			
HSD Tukey					
Muestras	N	Subconjunto para alfa=0,05			

Miel		a	b	c	d	e	f
Trolox	3	0,007					
A.A	3	0,008					
α -T	3	0,013					
EEPS	3	0,244					
MPS-ELL	3	0,619					
MPT-ELL	3	0,745					
MPS-EFS	3	0,842					
MPT-EFS	3	1,266					
EEPT	3		5,467				
MPS	3			7,887			
MPT	3				10,459		
MS	3					76,517	
MT	3						197,4
Sig.		0,067	1,000	1,000	1,000	1,000	00 1,000

10.2.15 Actividad antioxidante por ABTS

Tabla 28. Pruebas estadísticas la actividad antioxidante por ABTS en muestras y extractos.

Prueba de Normalidad Shapiro Wilk			
Muestra	Estadístico	gl	Sig.
A.A	1,000	3	1,000
α -T	0,972	3	0,679
Trolox	0,929	3	0,485
MT	0,969	3	0,663
MS	0,996	3	0,886
MPT	0,886	3	0,341
MPS	0,993	3	0,843
MPT-EFS	0,900	3	0,385
MPT-ELL	0,976	3	0,706

MPS-EFS	0,948	3	0,560
MPS-ELL	0,978	3	0,714
EEPT	0,998	3	0,921
EEPS	0,978	3	0,717

ANOVA un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	156156,671	12	13013,056	5582,069	0,000
Dentro de grupos	60,612	26	2,331		
Total	156217,282	38			

HSD Tukey

Muestras Miel	N	Subconjunto para alfa=0,05					
		a	b	c	d	e	f
α-T	3	0,059					
A.A	3	0,077					
Trolox	3	0,079					
EEPS	3	0,771					
MPT-ELL	3	0,839					
MPS-ELL	3	0,865					
MPS-EFS	3	1,588					
MPT-EFS	3	4,415					
EEPT	3		11,942				
MPS	3			19,052			
MPT	3				71,200		
MS	3					86,750	
MT	3						230,200
Sig.		0,068	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

10.2.16 Coeficiente de correlación de Pearson para pruebas antioxidantes

Tabla 29. Coeficiente de correlación de Pearson para el contenido de fenoles, flavonoides totales y actividades antioxidantes.

	ABTS	DPPH	FENOLES TOTALES	FLAVONOIDES TOTALES
ABTS				
Correlación de Pearson	1	0,968**	0,610**	0,260
Sig. (bilateral)		0,000	0,000	0,165
N	30	30	30	30
DPPH				
Correlación de Pearson	0,968**	1	0,511**	0,218
Sig. (bilateral)	0,000		0,004	0,247
N	30	30	30	30
FENOLES TOTALES				
Correlación de Pearson	0,610**	0,511**	1	0,685**
Sig. (bilateral)	0,000	0,004		0,000
N	30	30	30	30
FLAVONOIDES				
Correlación de Pearson	0,260	0,218	0,685**	1
Sig. (bilateral)	0,165	0,247	0,000	
N	30	30	30	30

10.3 ESPECTROS DE MASAS Y FRAGMENTACIONES

ÁCIDO GÁLICO

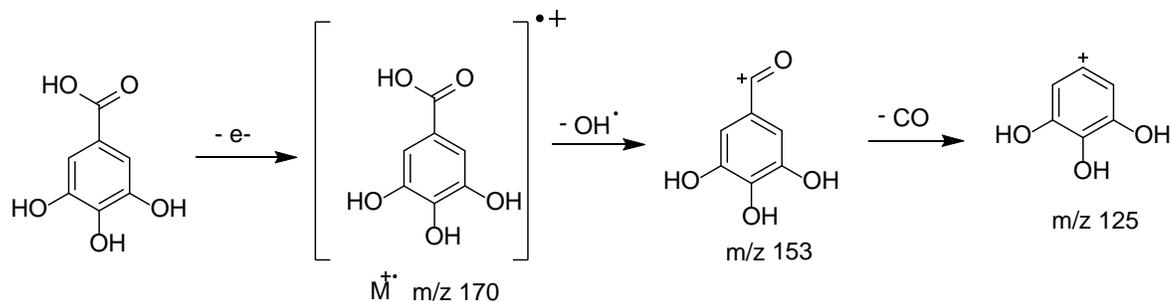
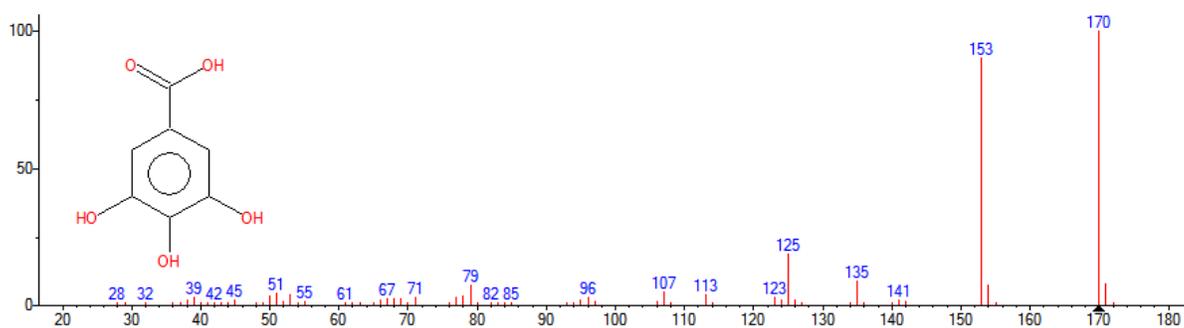


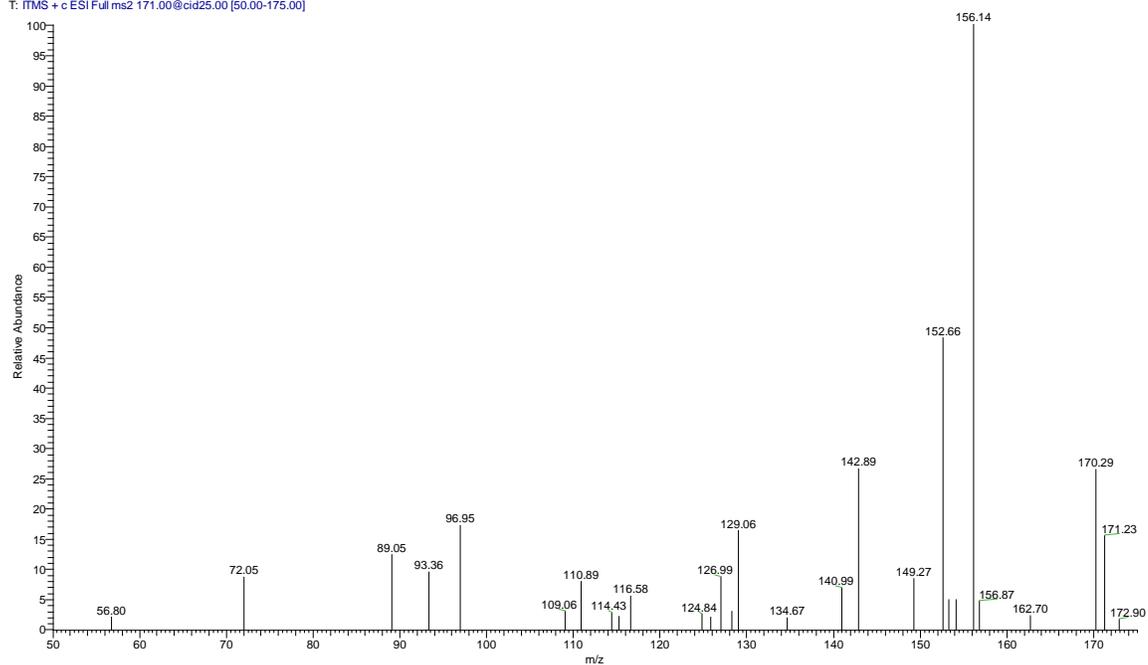
Figura 14. Fragmentos principales del ácido gálico.

- Espectro Teórico



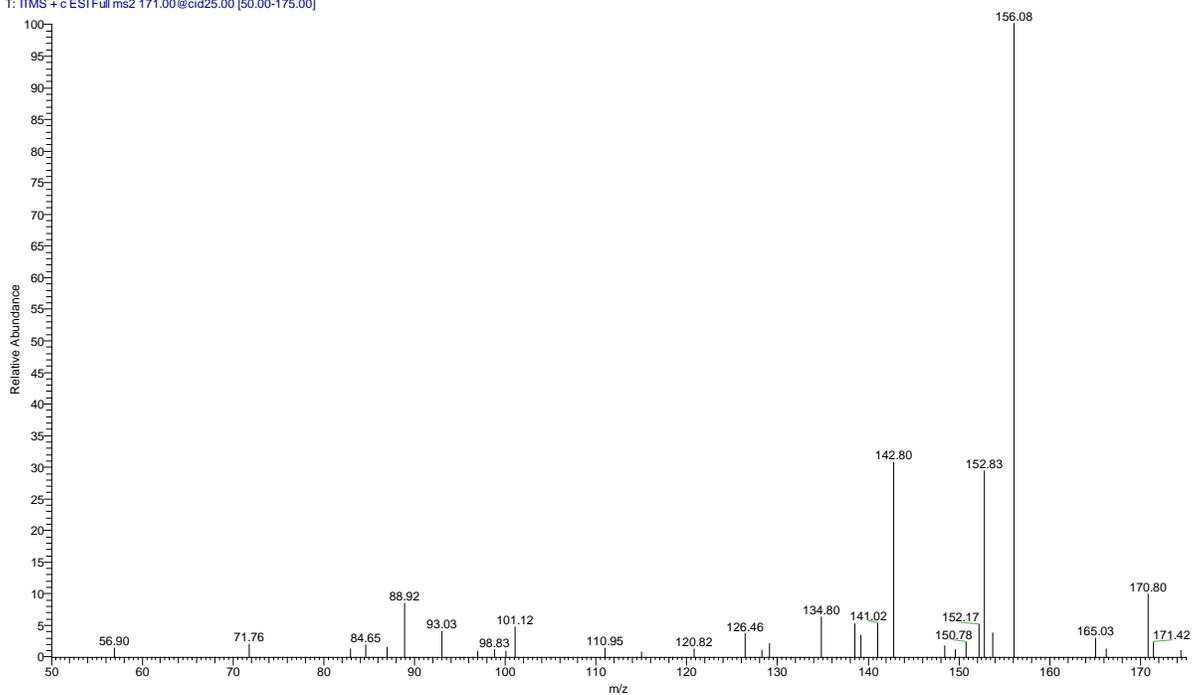
- Miel Santander

ACIDO GALICO - MIEL SDER_180925085707 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.78E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid25.00 [50.00-175.00]



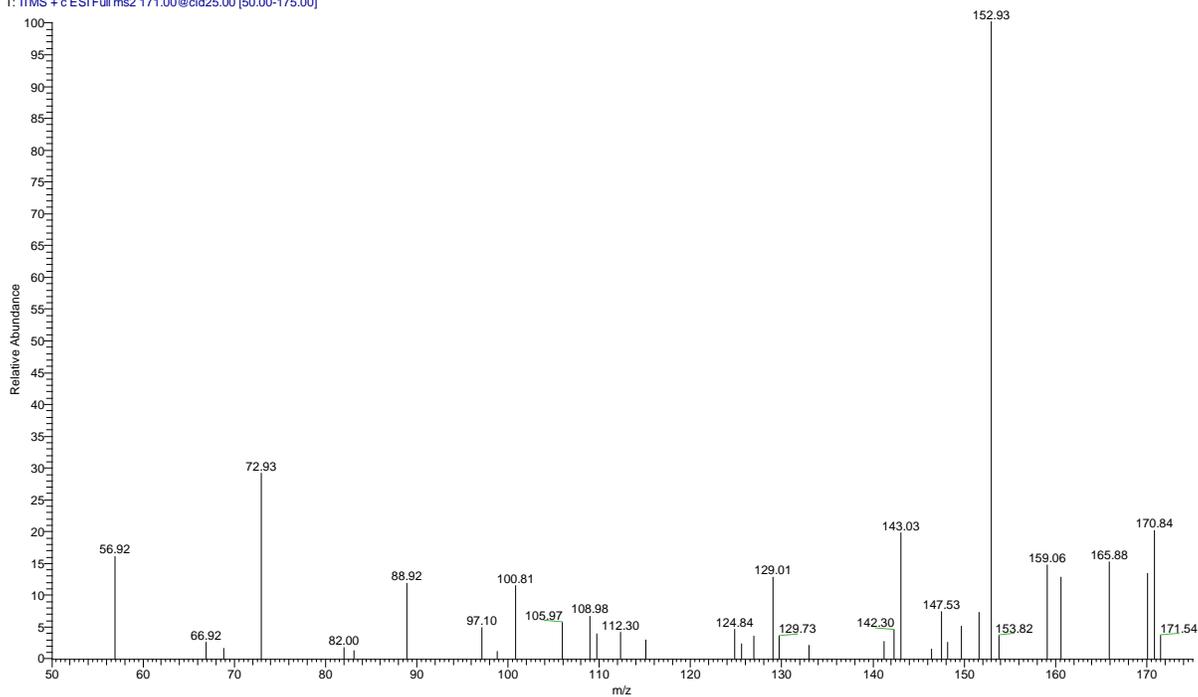
- Miel Tunía

ACIDO GALICO - MIEL TUNIA #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 3.98E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid25.00 [50.00-175.00]



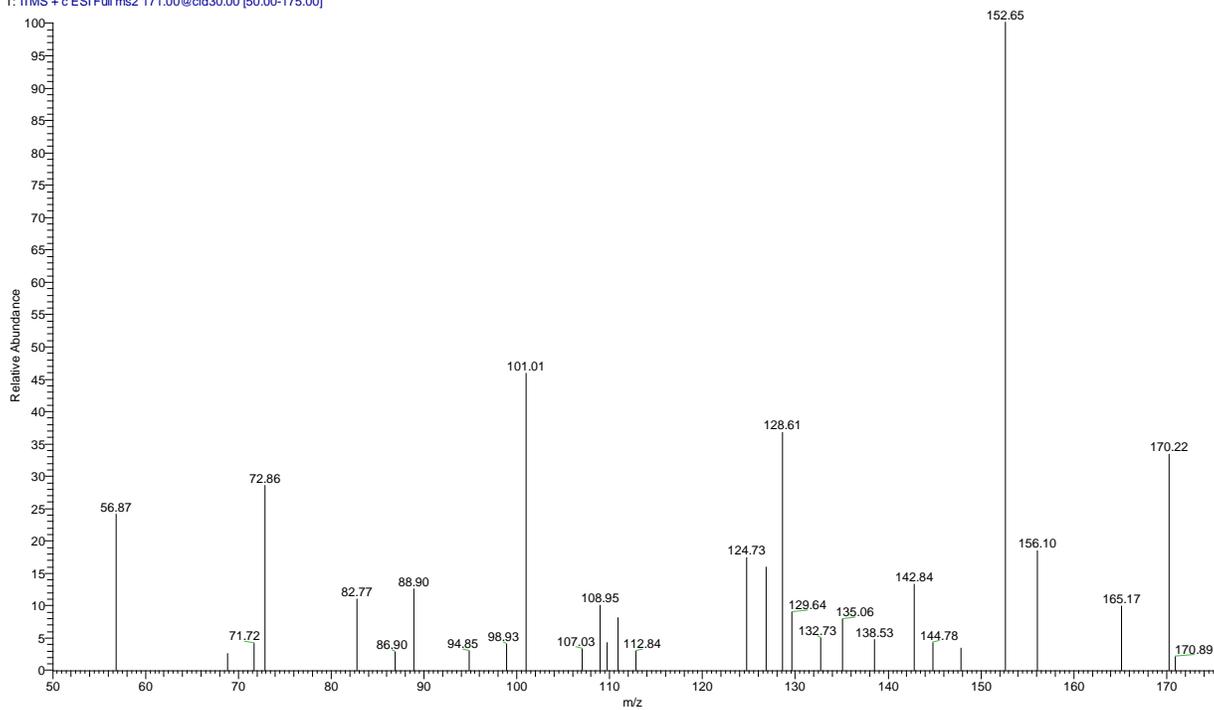
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ACIDO GALICO - PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.57E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid25.00 [50.00-175.00]



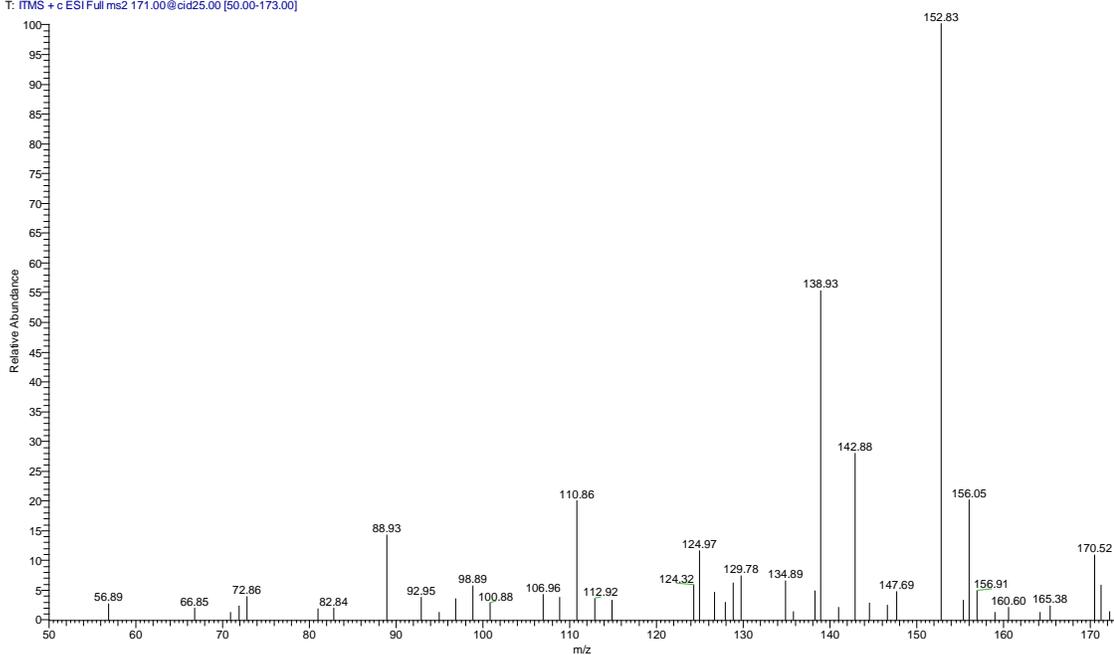
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ACIDO GALICO - PROP TUNIA_180925103639 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.27E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid30.00 [50.00-175.00]



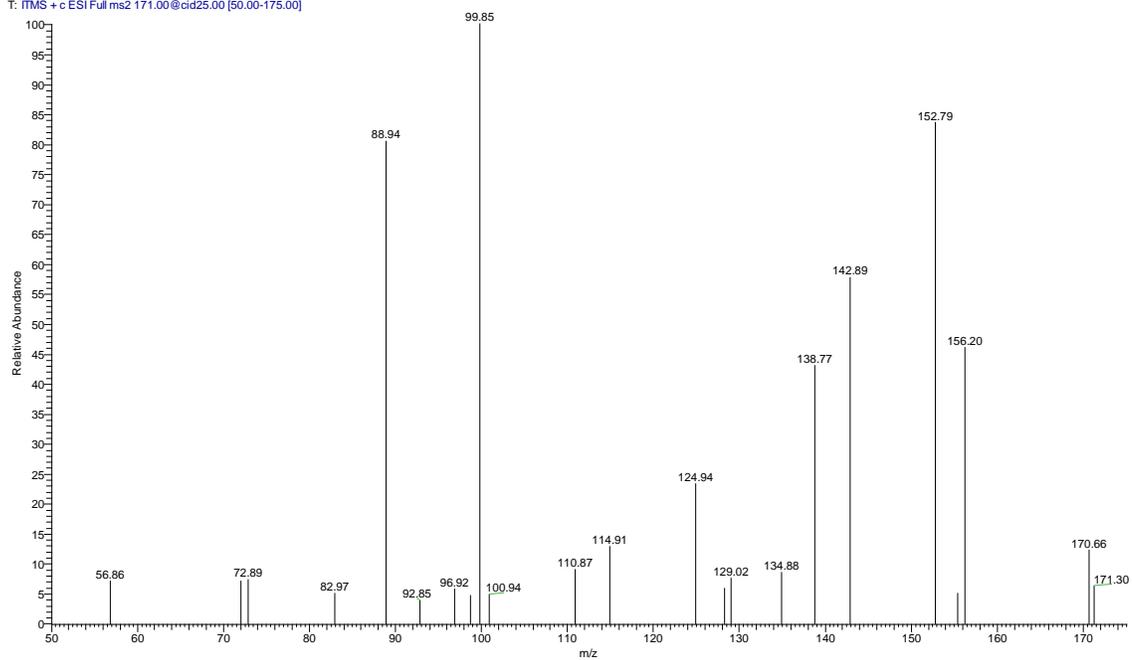
- Miel Propolizada Tunía

acido galico-mielproptunia #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.46E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid25.00 [50.00-173.00]



- Miel Propolizada Santander

ACIDO GALICO-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 7.66
T: ITMS + c ESI Full ms2 171.00@cid25.00 [50.00-175.00]



ÁCIDO CAFÉICO

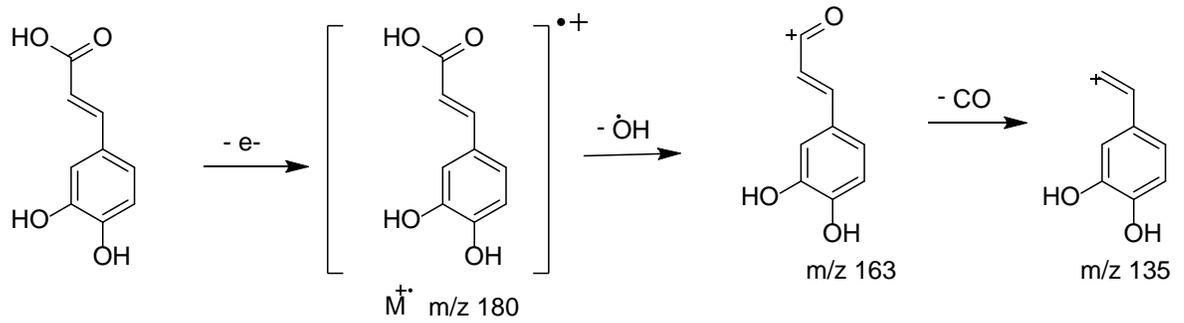
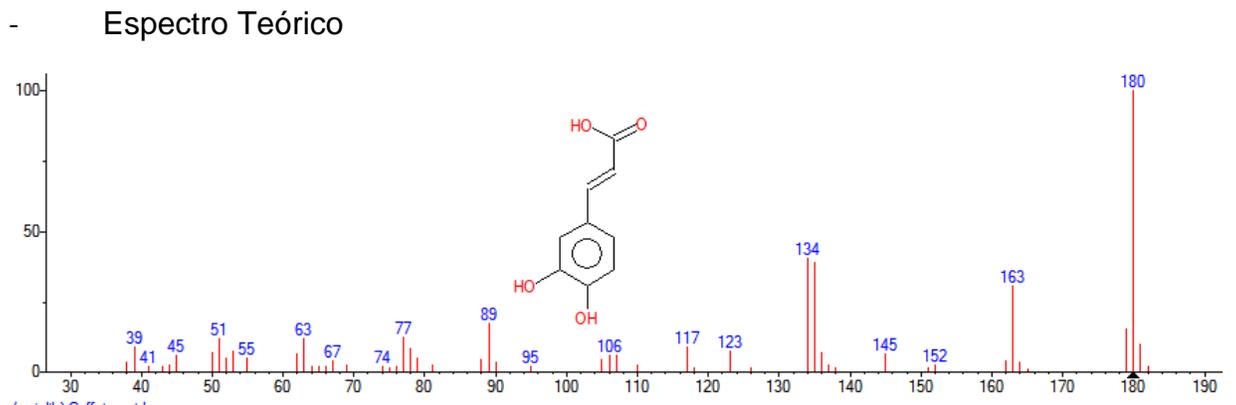
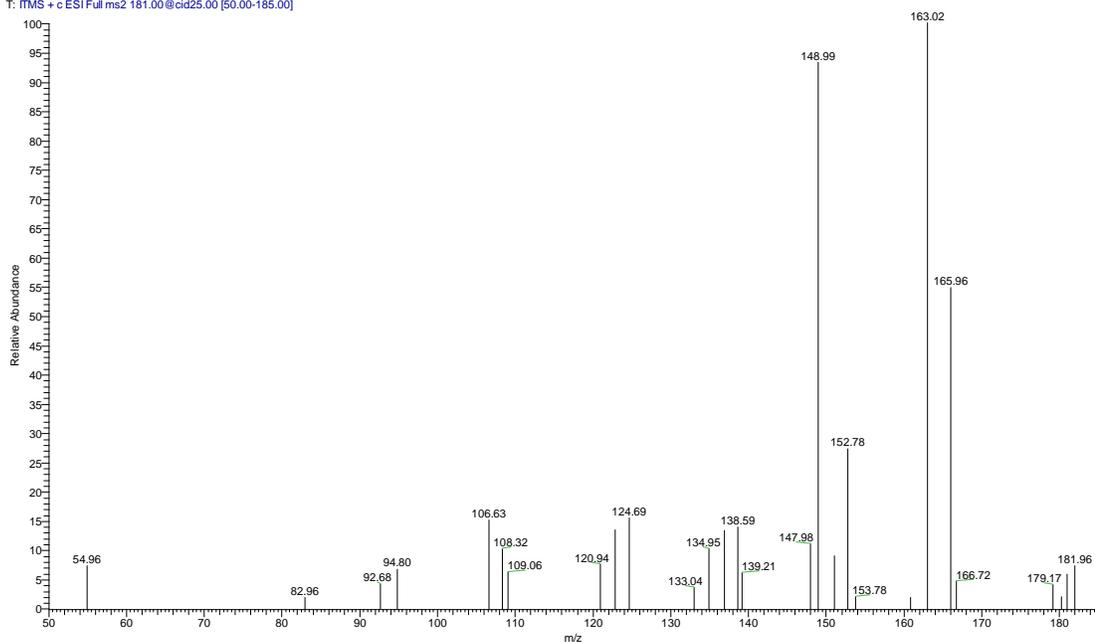


Figura 15. Fragmentos principales del ácido caféico.



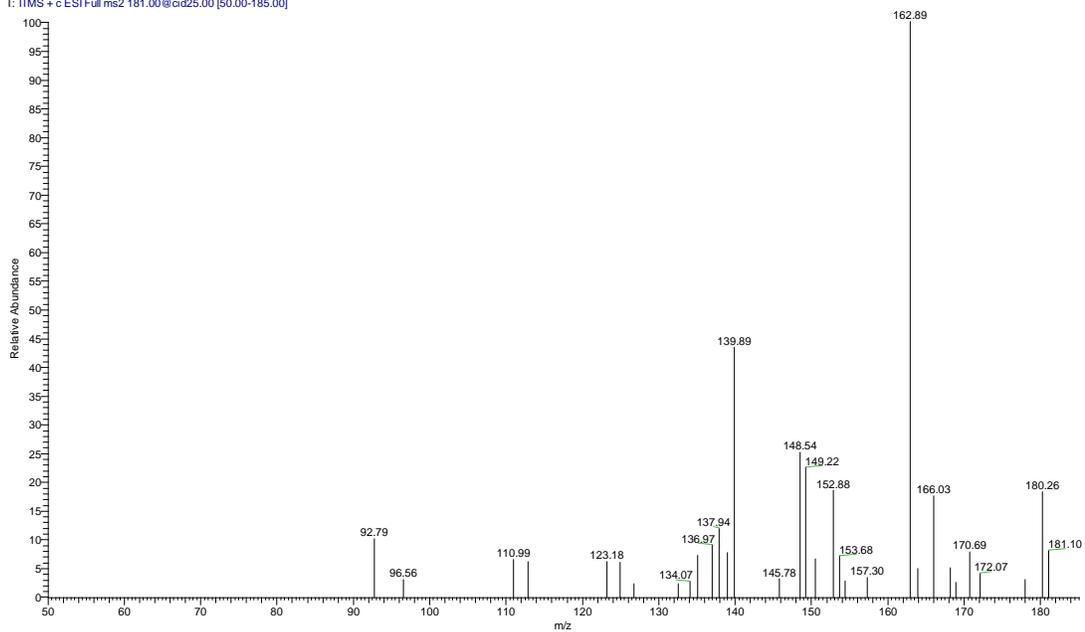
- Miel Tunia

ACIDO CAFEICO - MIEL TUNIA #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 1.52E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 181.00@cid25.00 [50.00-185.00]



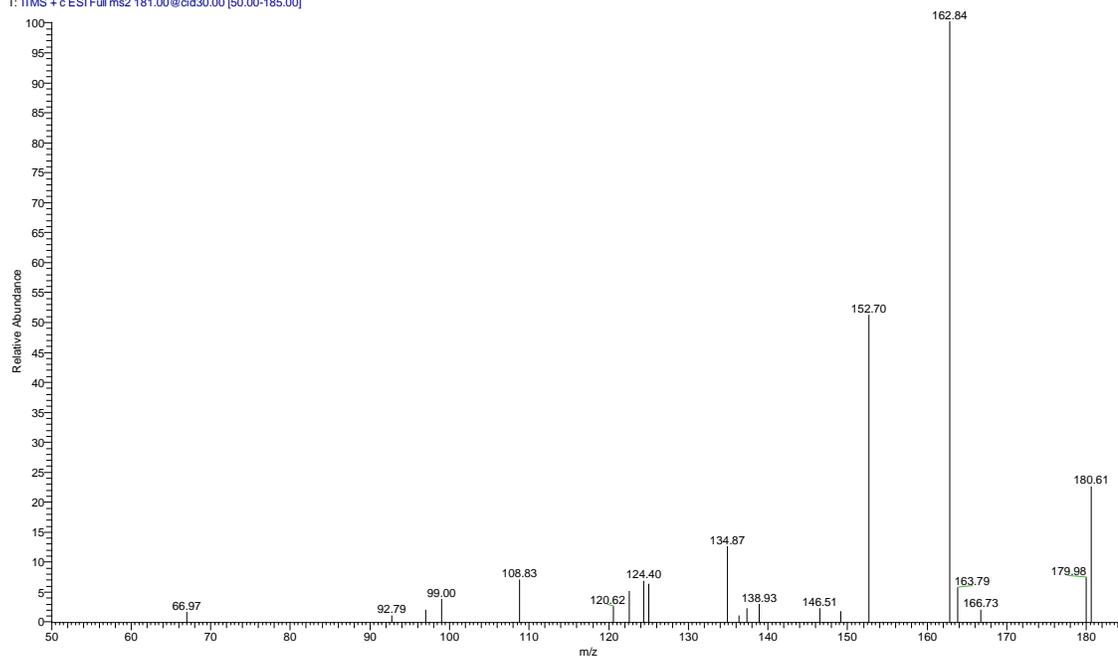
- Miel Santander

ACIDO CAFEICO - MIEL SDR 180925085707 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.19E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 181.00@cid25.00 [50.00-185.00]



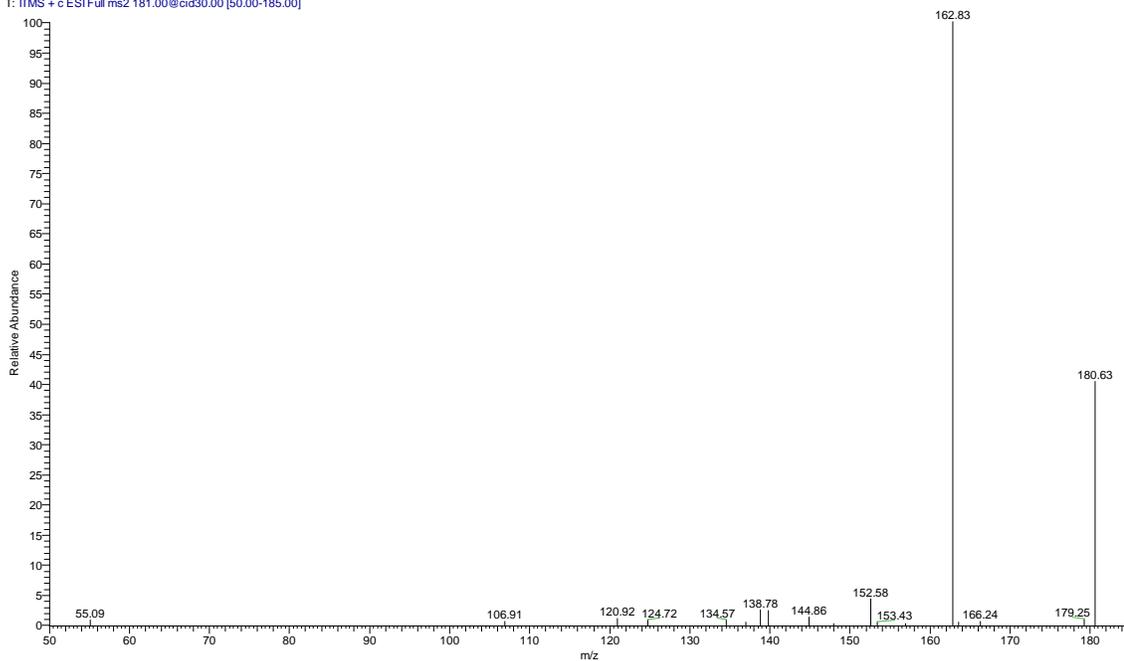
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ACIDO CAFEICO-PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 3.10E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 181.00@cid30.00 [50.00-185.00]



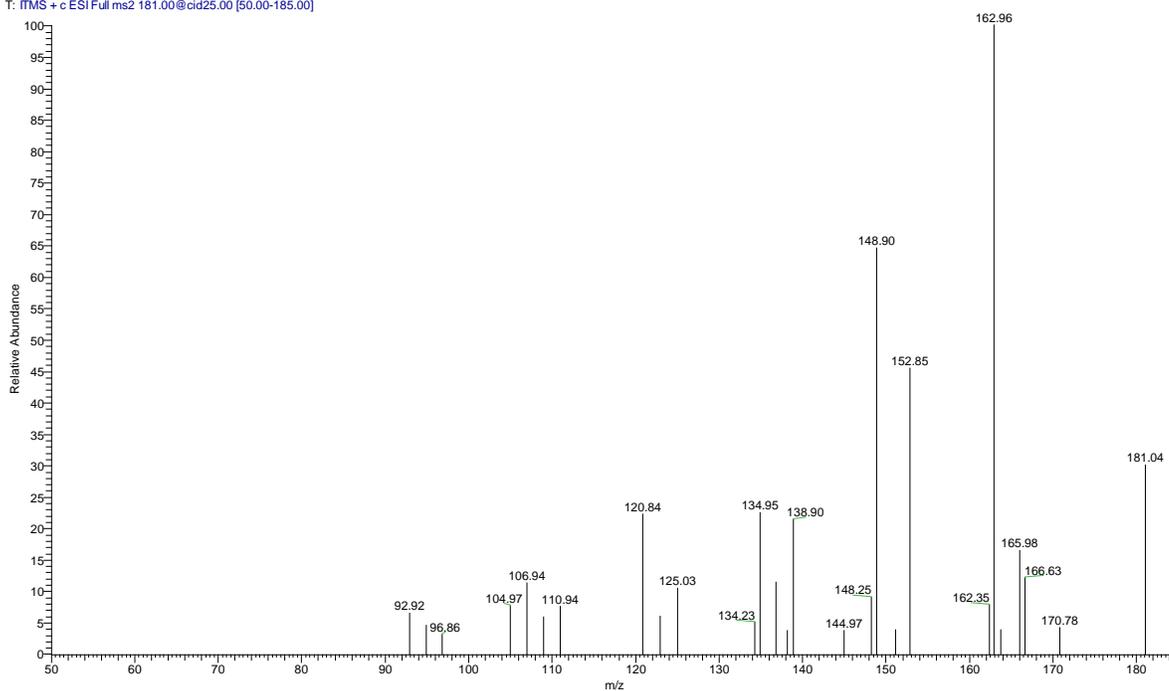
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ACIDO CAFEICO-PROP SDER_180925095408 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 3.12E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 181.00@cid30.00 [50.00-185.00]



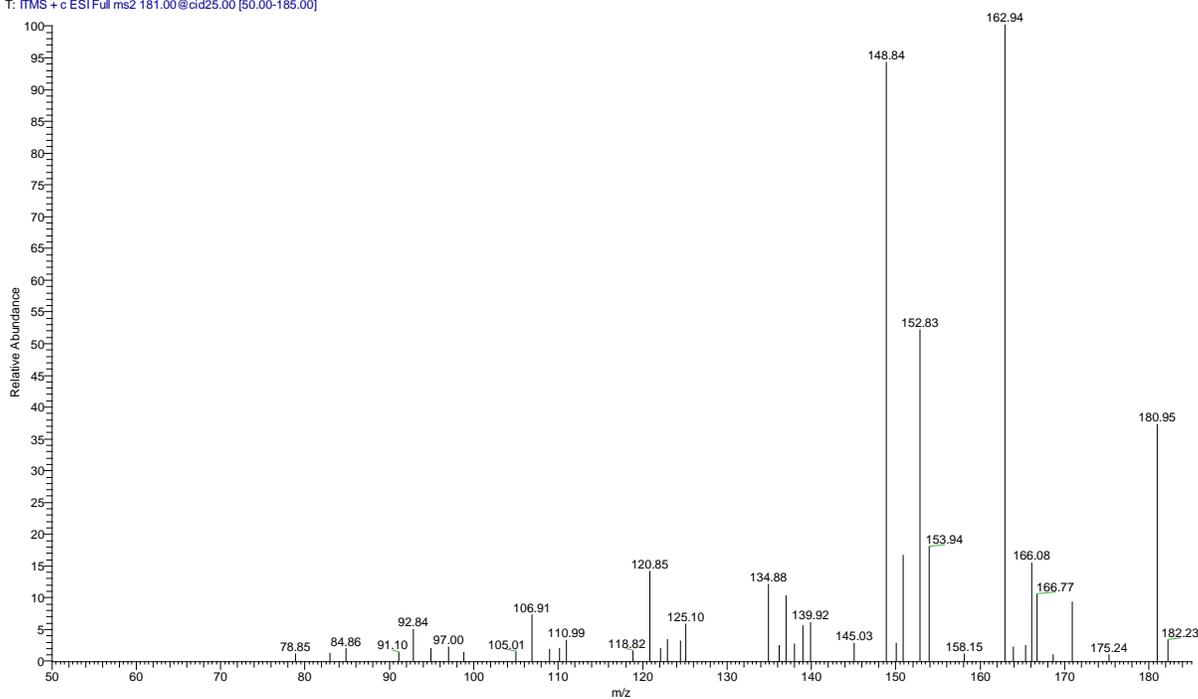
- Miel Propolizada Santander

ACIDO CAFEICO-MEL PROPSDER #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 8.65
T: ITMS + c ESI Full ms2 181.00@cid25.00 [50.00-185.00]



- Miel Propolizada Tunía

acidoCAFEICO -mielproptunia #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 2.78E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 181.00@cid25.00 [50.00-185.00]



ÁCIDO *P*-COUMÁRICO

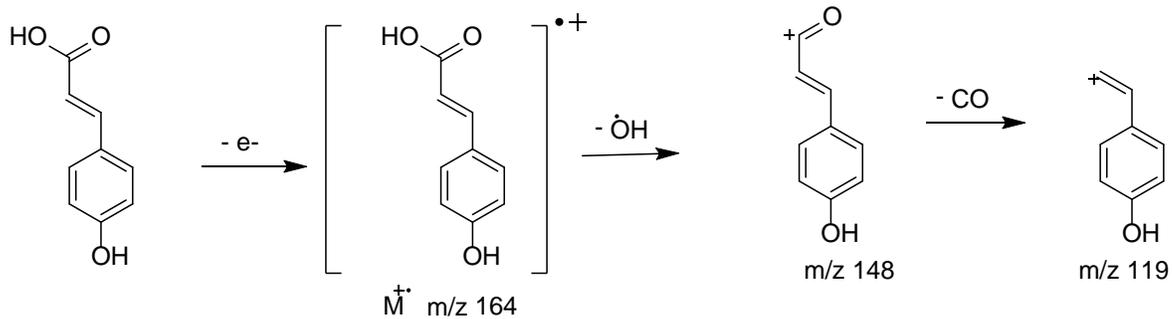
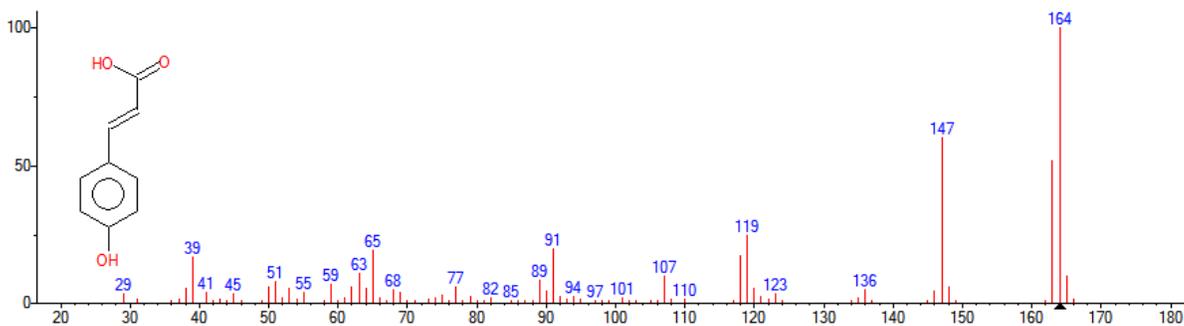


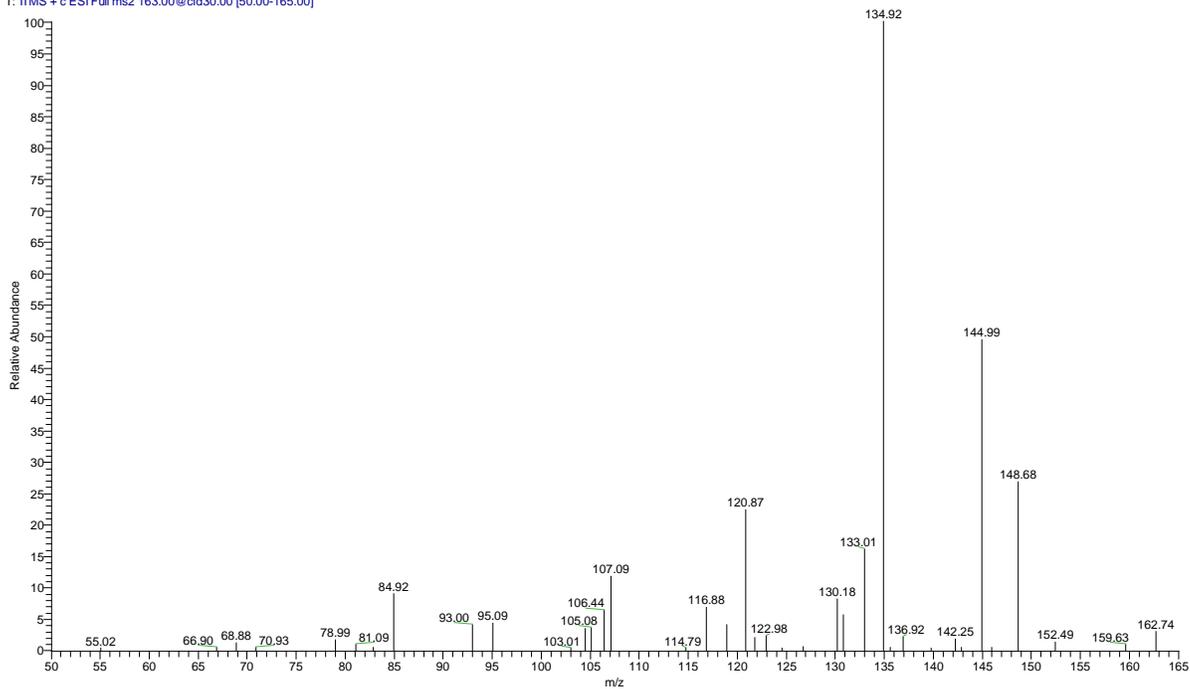
Figura 16. Fragmentos principales del ácido *p*-coumárico.

- Espectro Teórico



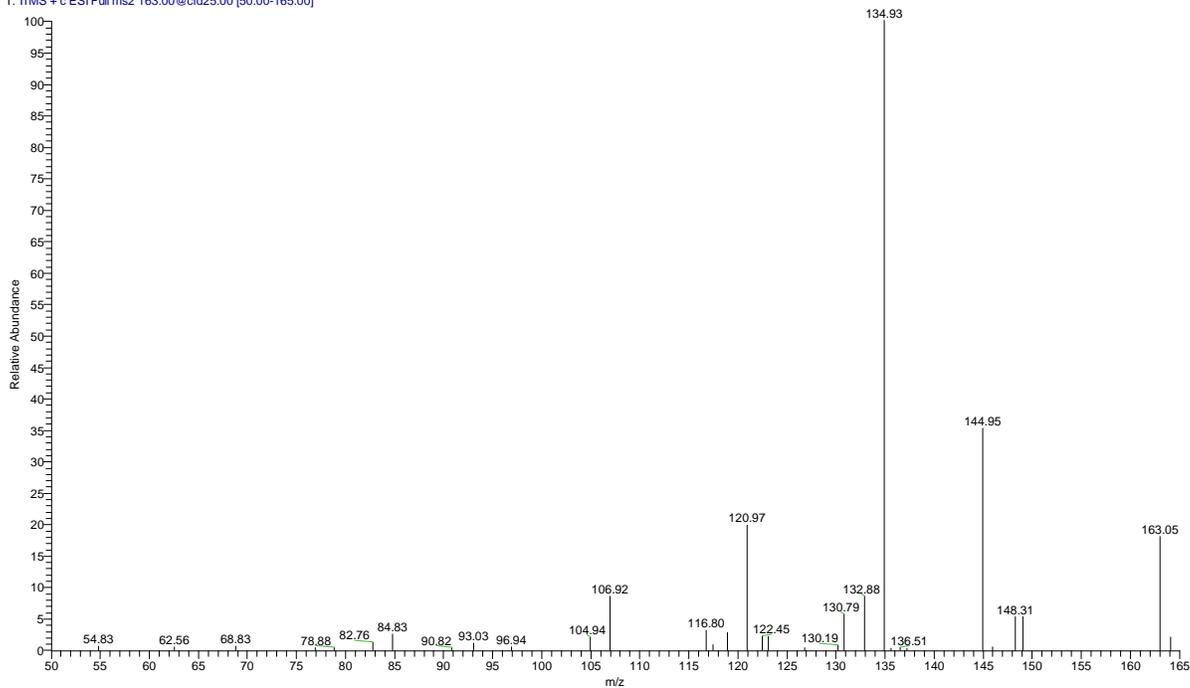
- Miel Santander

ACIDO COUMARICO - MIEL SDER_180925085707 #12 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.09E2
T: FTMS + c ESI Full ms2 163.00@cid30.00 [50.00-165.00]



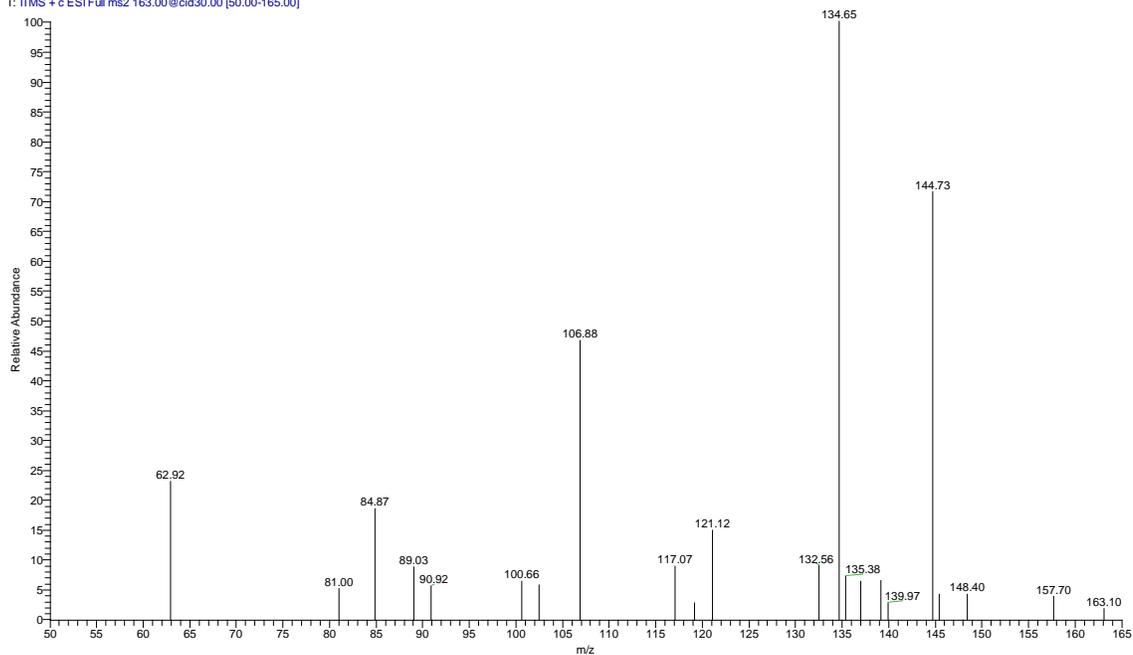
- Miel Tunía

ACIDO COUMARICO - MIEL TUNIA #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 1.63E2
T: FTMS + c ESI Full ms2 163.00@cid25.00 [50.00-165.00]



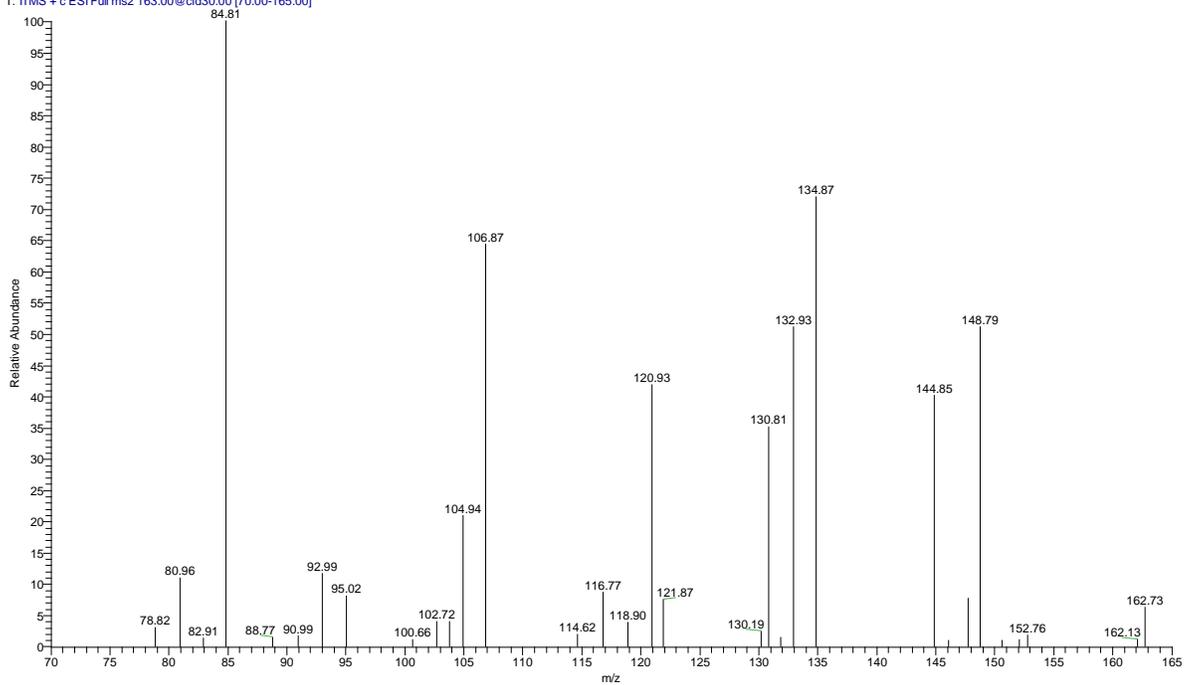
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ACIDO COUMARICO - PROP TUNIA 180925103639 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.47E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 163.00@cid30.00 [50.00-165.00]



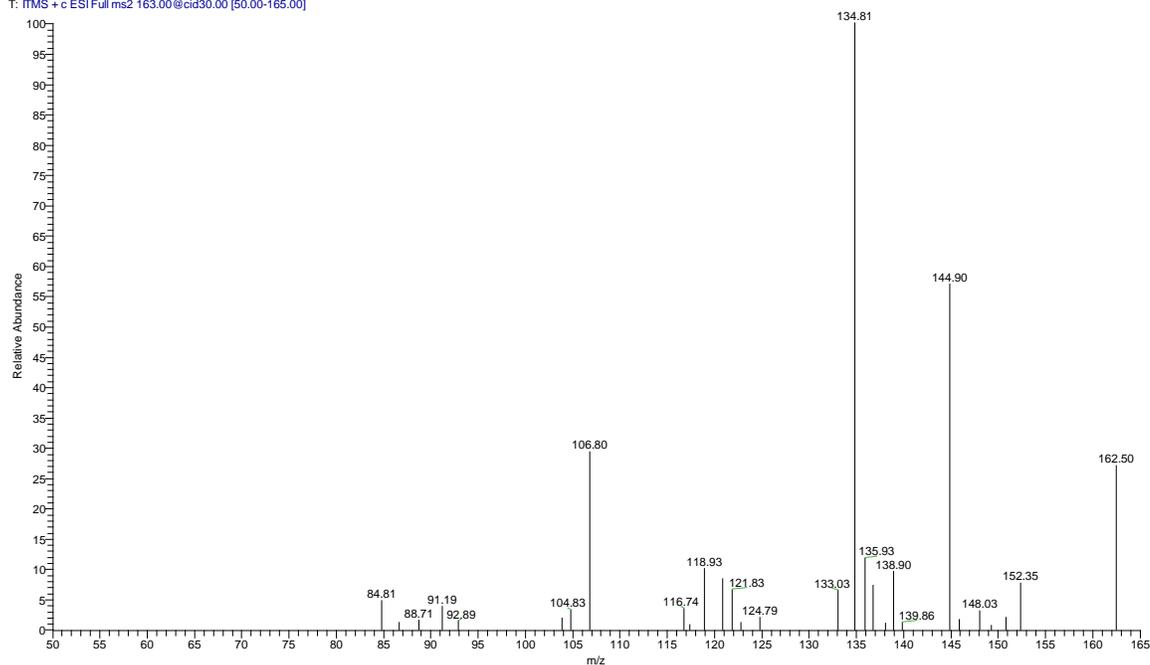
- Miel Propolizada Tunía

ACIDO COUMARICO - mielproptunia #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 3.57E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 163.00@cid30.00 [70.00-165.00]



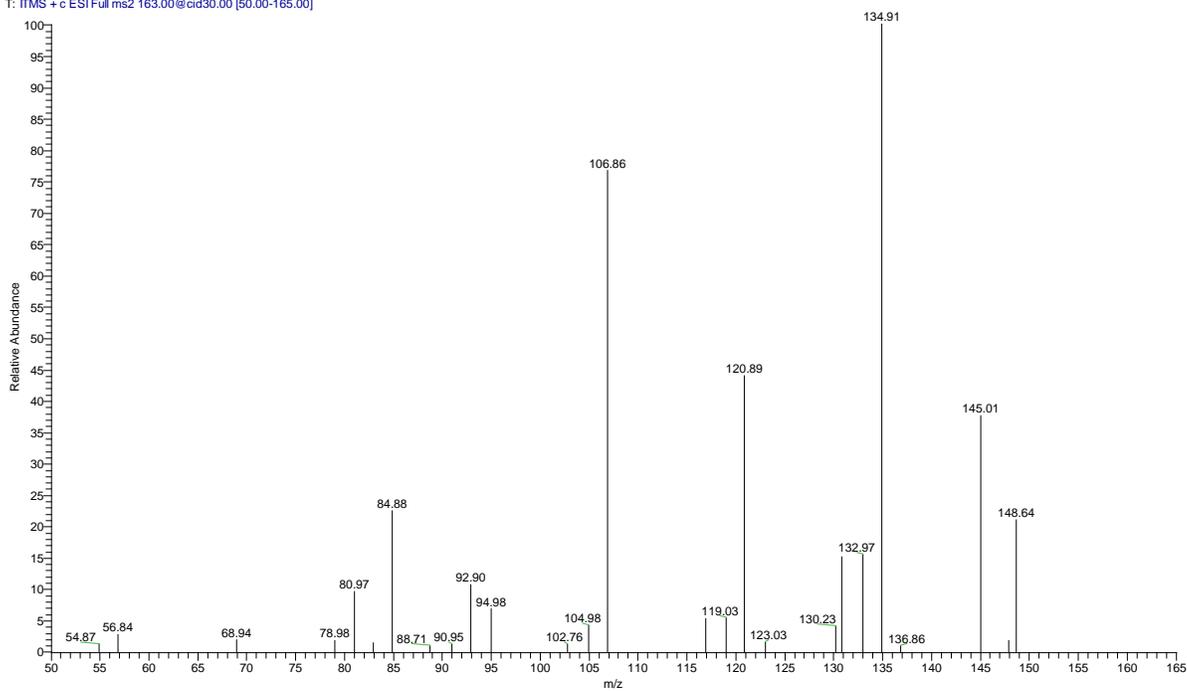
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ACIDO COUMARICO- PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 5.35E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 163.00@cid30.00 [50.00-165.00]



- Miel Propolizada Santander

ACIDO COUMARICO-MIEL PROPSDER #13 RT: 0.30 AV: 1 NL: 3.32E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 163.00@cid30.00 [50.00-165.00]



ÁCIDO PROTOCATECÚICO

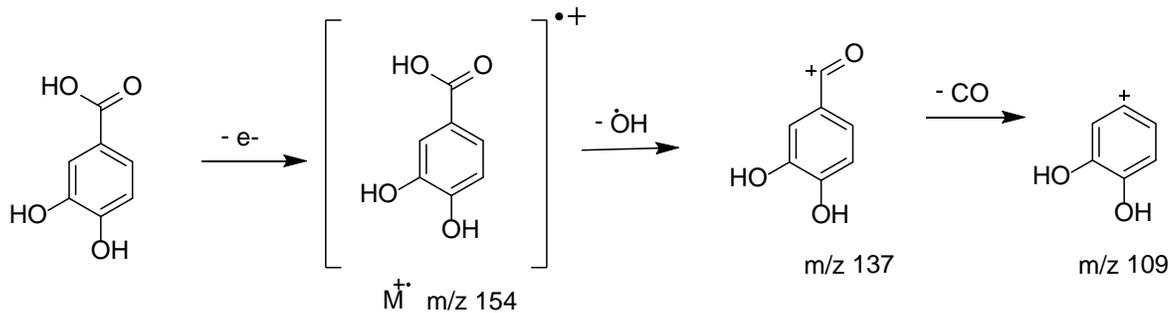
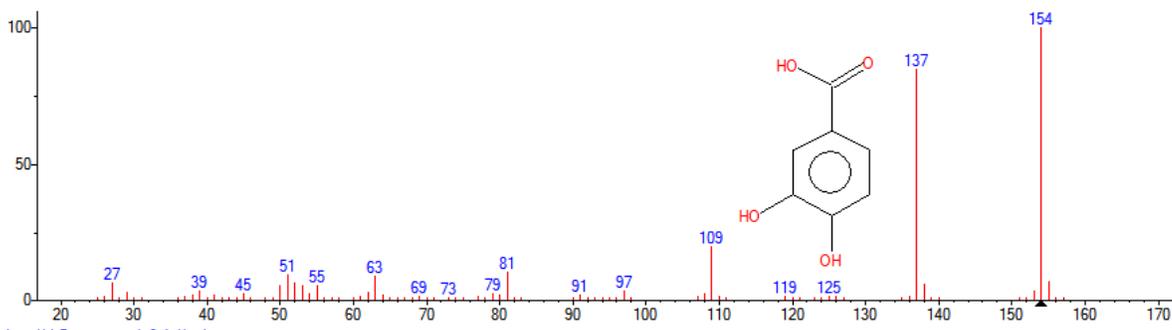


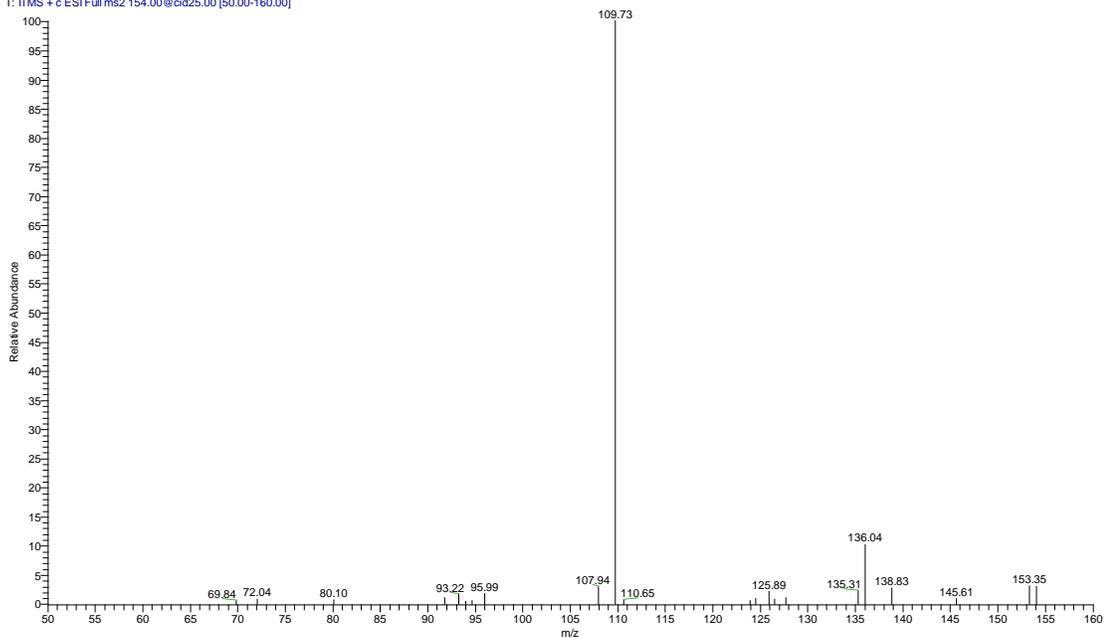
Figura 17. Fragmentos principales del ácido protocatecúico.

- Espectro Teórico



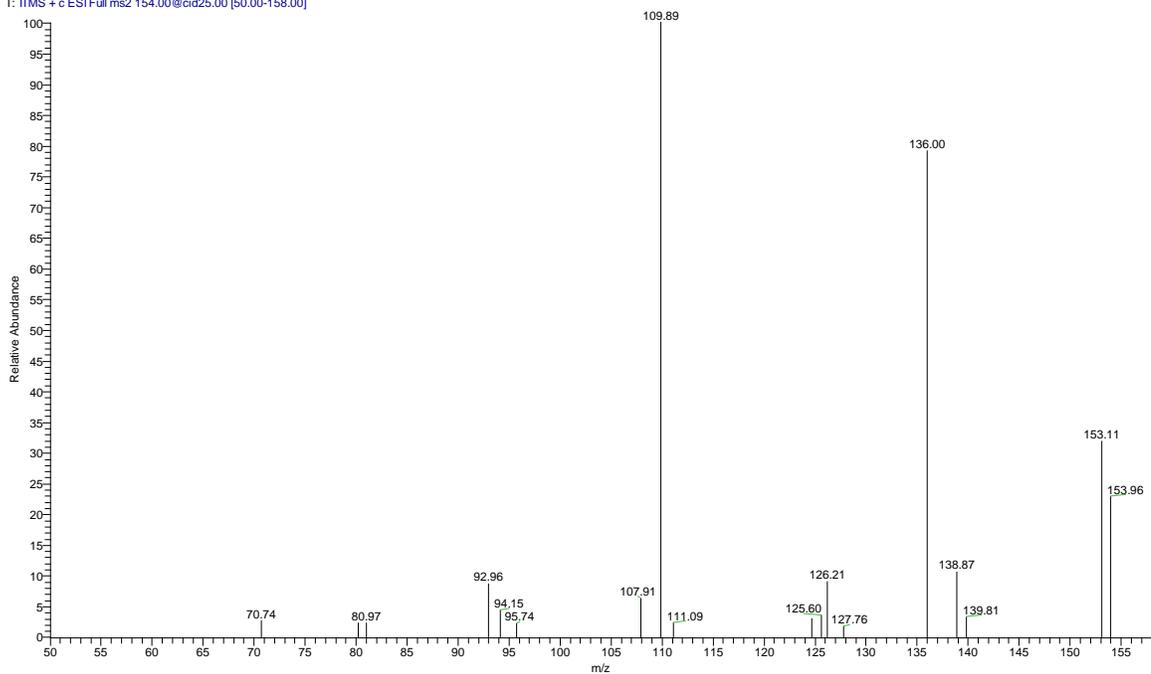
- Miel Santander

ACIDO PROTOCATECUICO - MIEL SDR_180925085707 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 6.16E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 154.00@cid25.00 [50.00-160.00]



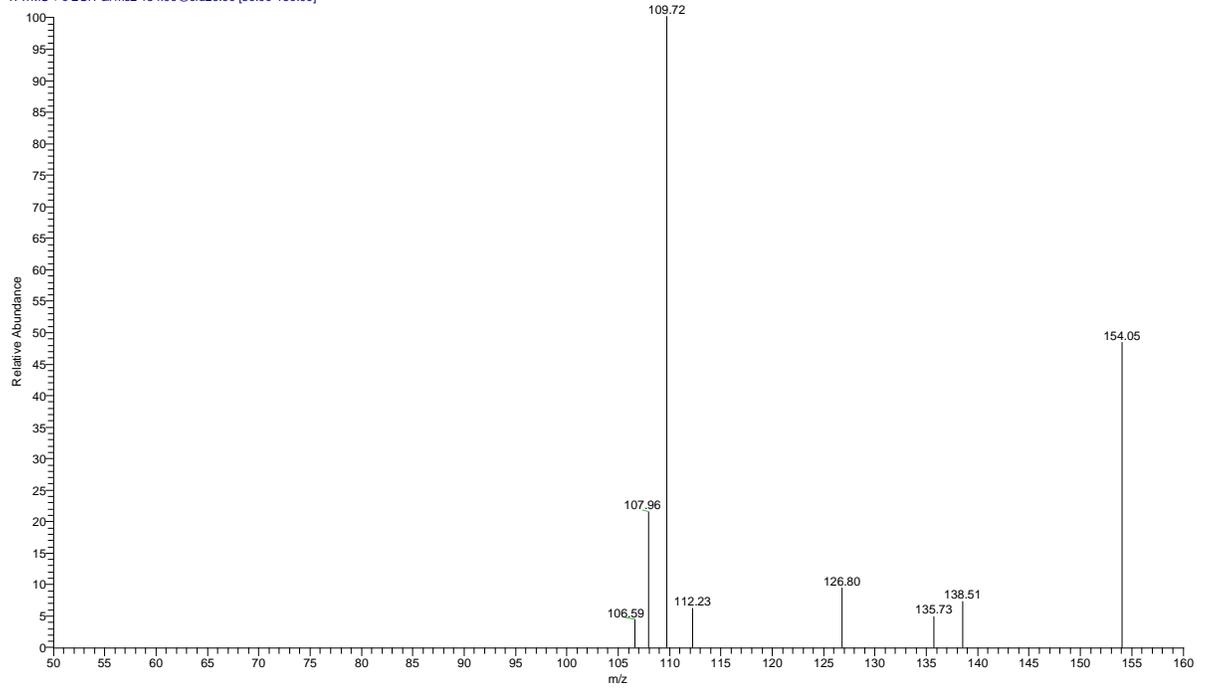
- Miel Tunía

ACIDO PROTOCATECUICO - MIEL TUNIA #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.56E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 154.00@cid25.00 [50.00-158.00]



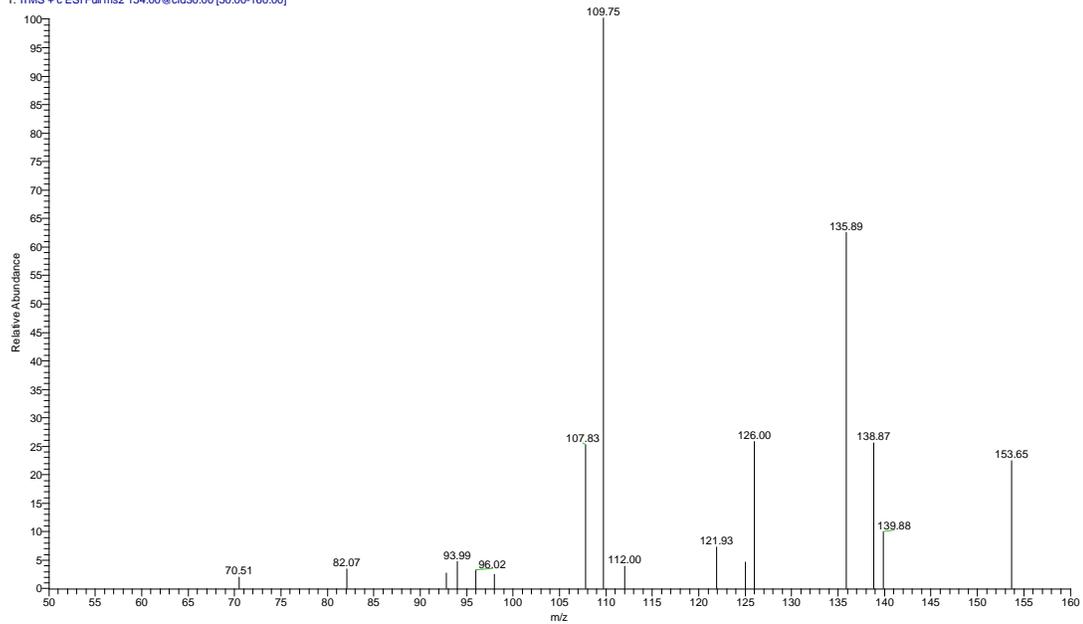
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ACIDO PROTOCATECUICO - PROP TUNIA_180925103639 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 9.10
T: ITMS + c ESI Full ms2 154.00@cid20.00 [50.00-160.00]



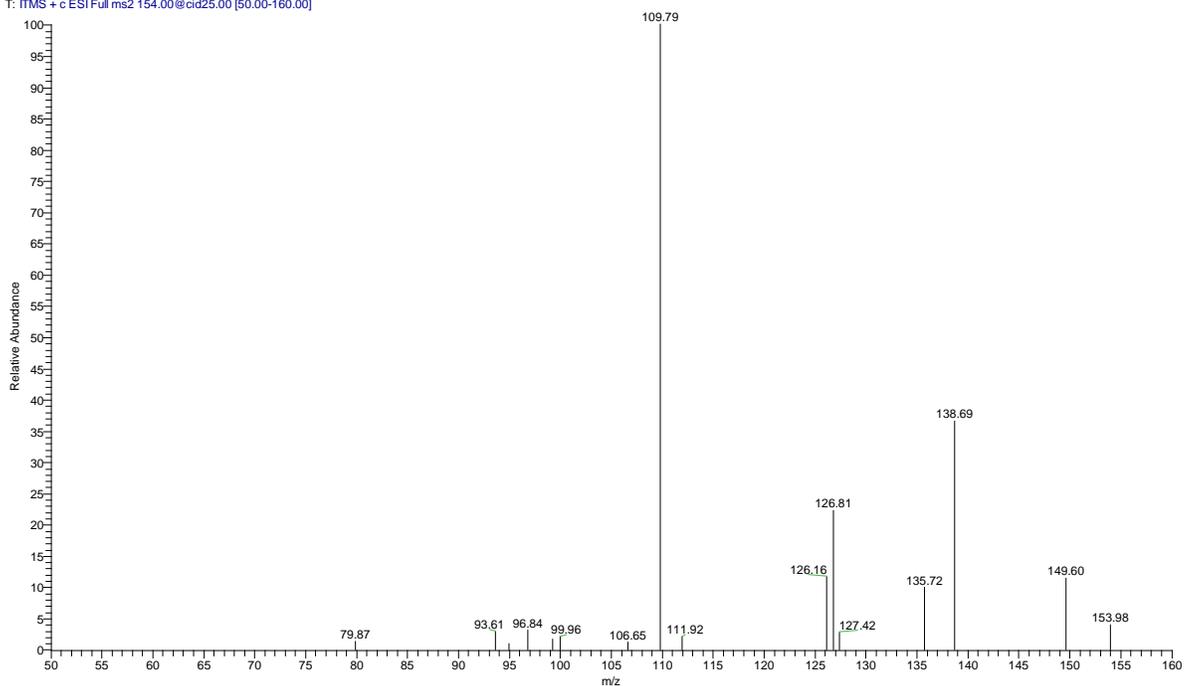
- Miel Propolizada Tunía

ACIDO PROTOCATECUICO - mielpropolizada #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.54E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 154.00@cid30.00 [50.00-160.00]



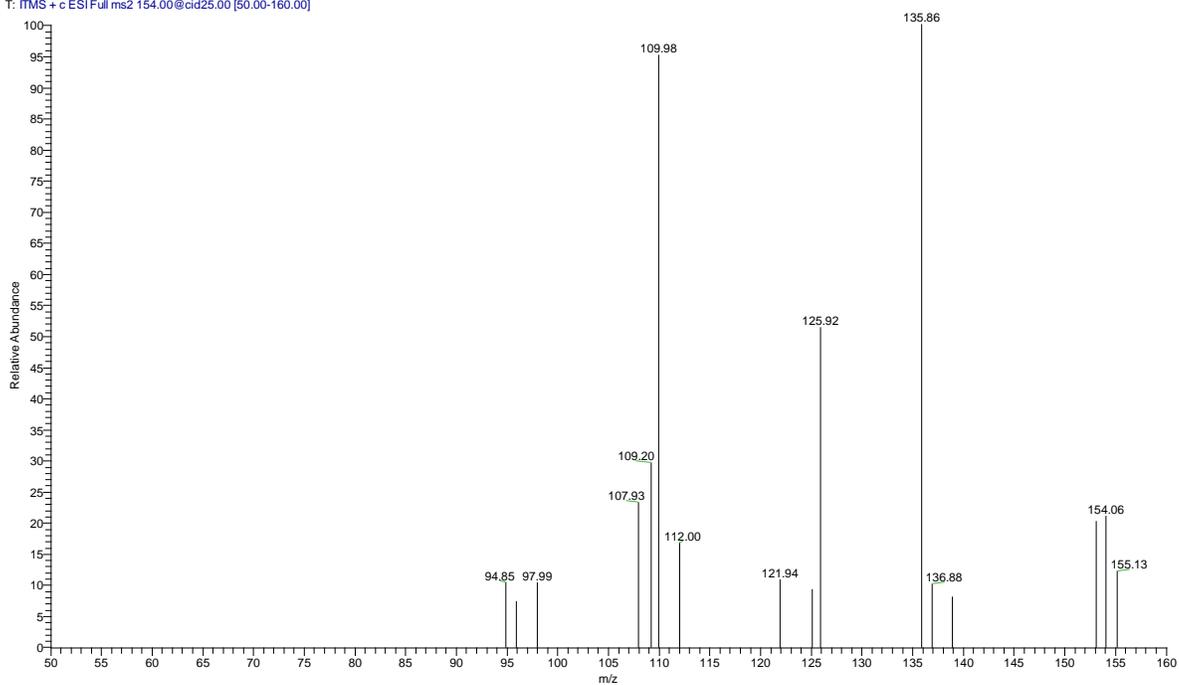
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ACIDO PROTOCATECUICO-PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 3.26E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 154.00@cid25.00 [50.00-160.00]



- Miel Propolizada Santander

ACIDO PROTOCATECUICO-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 4.07
T: ITMS + c ESI Full ms2 154.00@cid25.00 [50.00-160.00]



ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

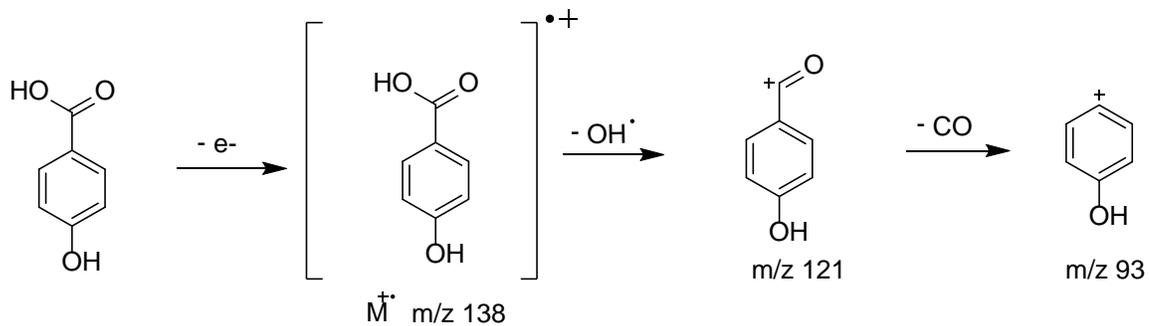
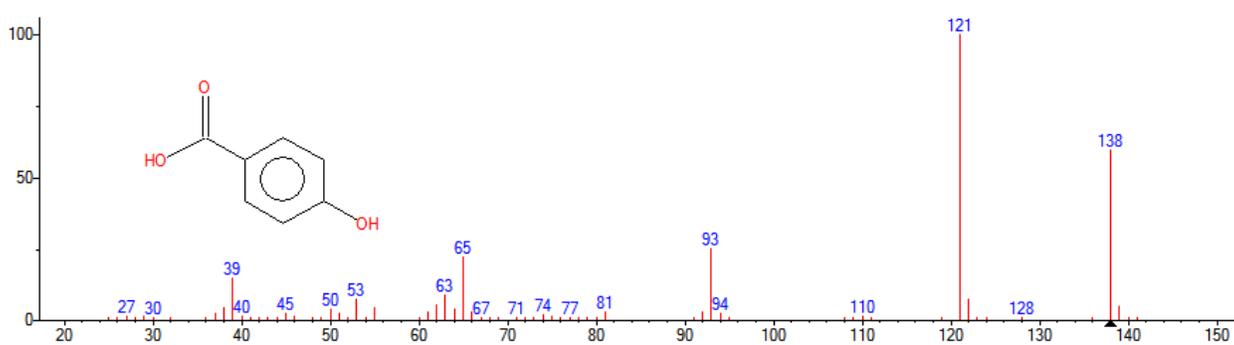


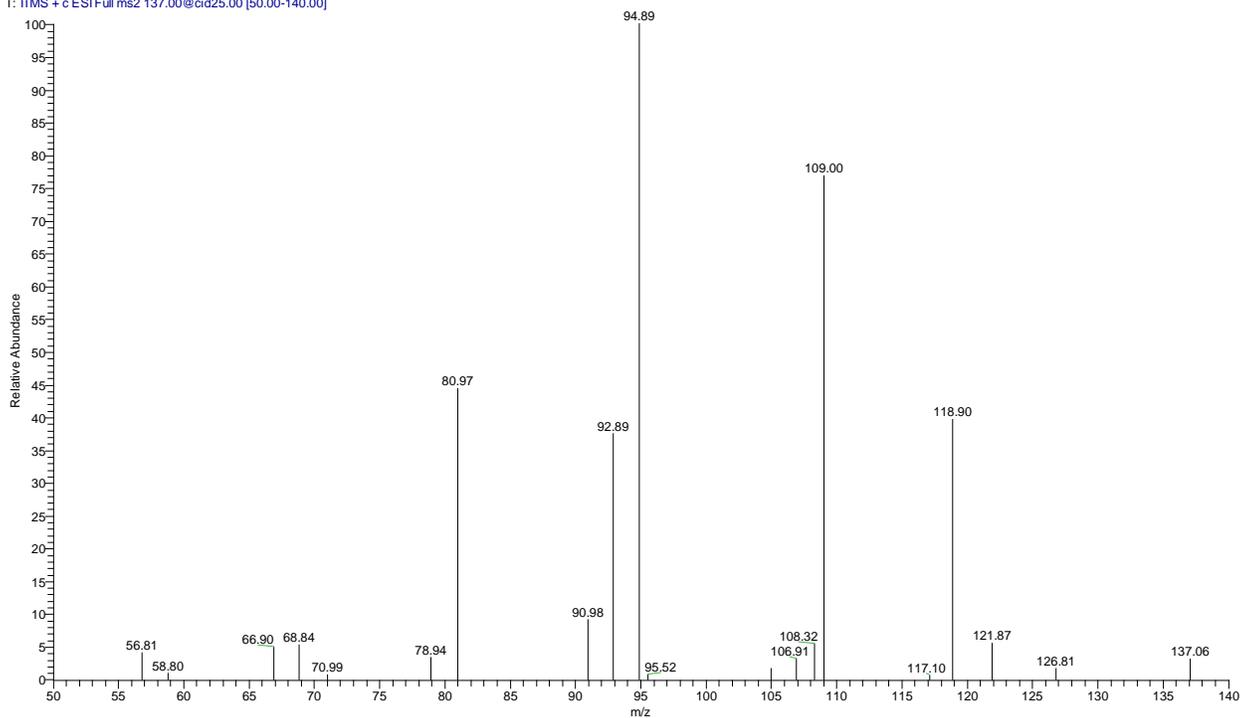
Figura 18. Fragmentaciones del ácido *p*-hidroxibenzoico.

- Espectro Teórico



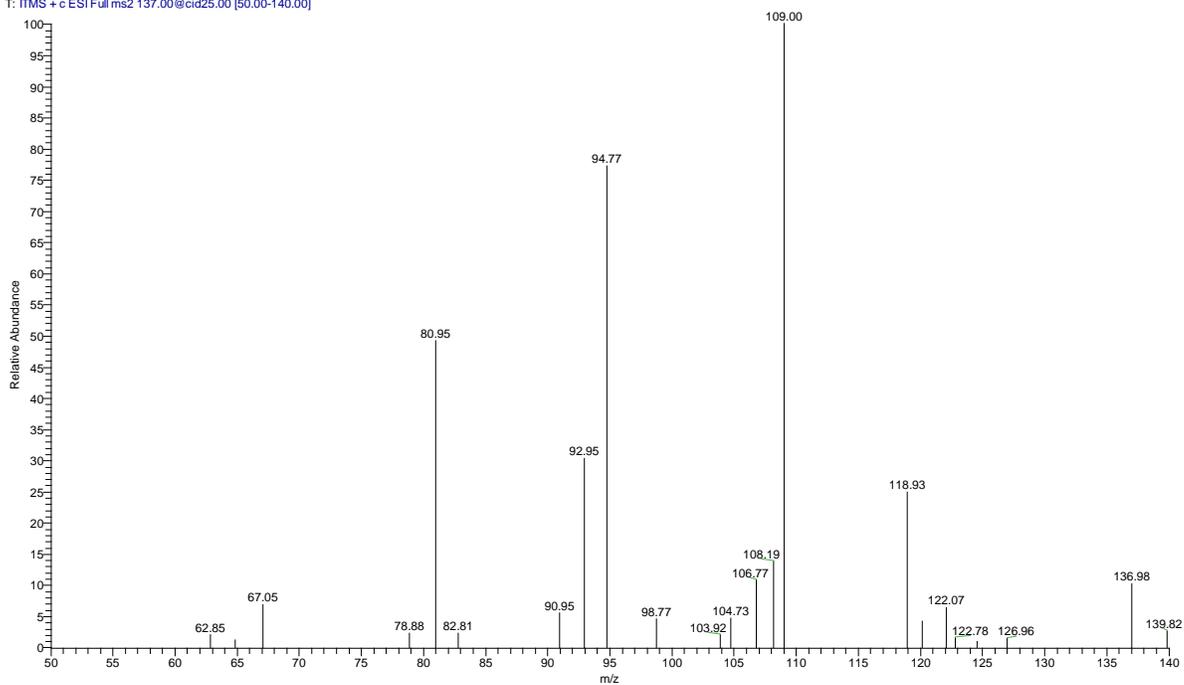
- Miel Propolizada Santander

ACIDO HIDROXIBENZOICO-MIEL PROPSDER #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 4.63E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 137.00@cid25.00 [50.00-140.00]



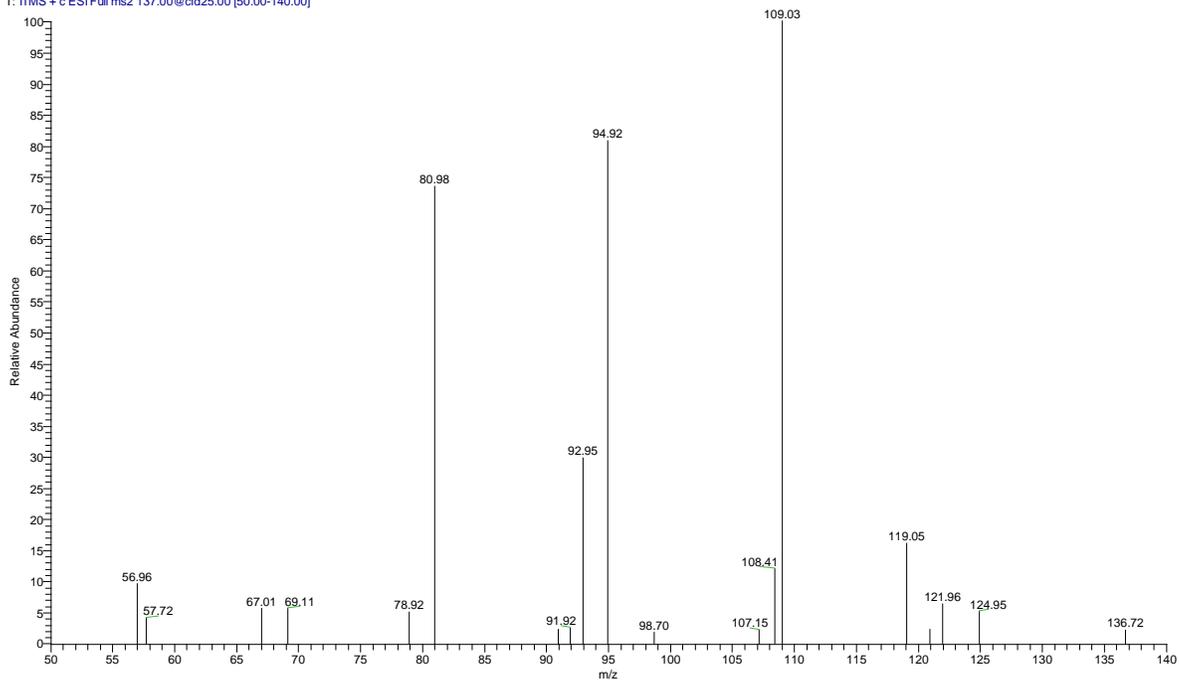
- Miel Santander

ACIDO P-HIDROXIBENZOICO - MIEL SDER_180925085707 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 3.30E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 137.00@cid25.00 [50.00-140.00]



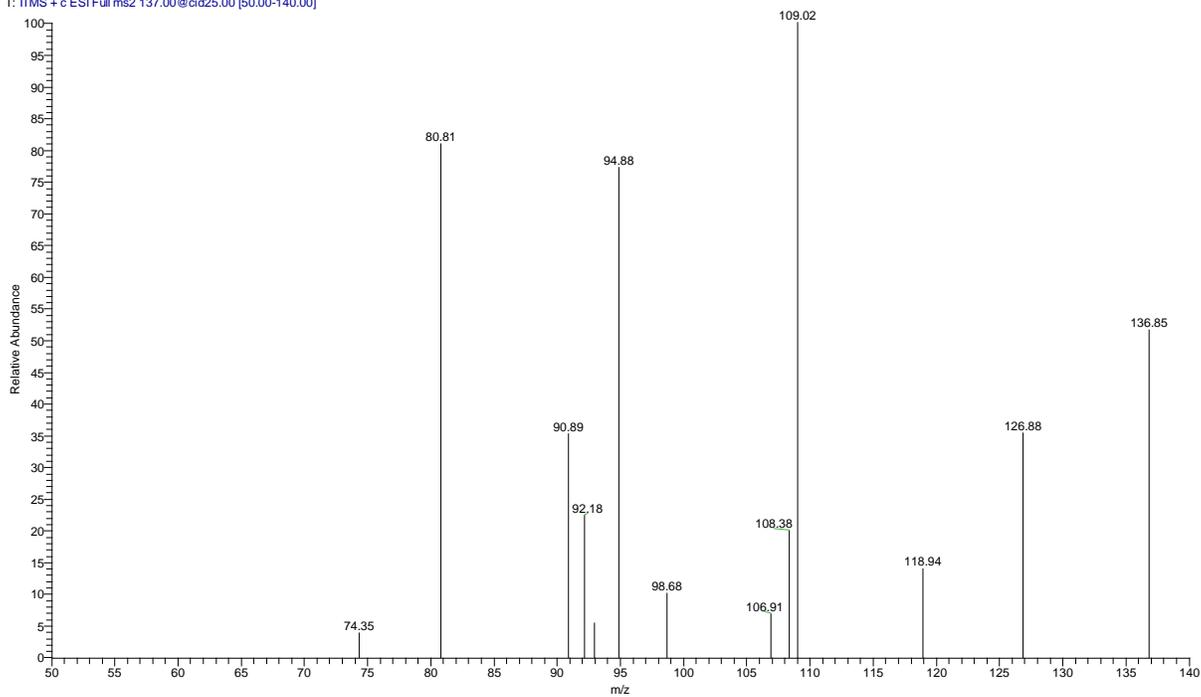
- Miel Tunía

ACIDO P-HIDROXIBENZOICO - MIEL TUNIA_180925085707 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 1.52E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 137.00@cid25.00 [50.00-140.00]



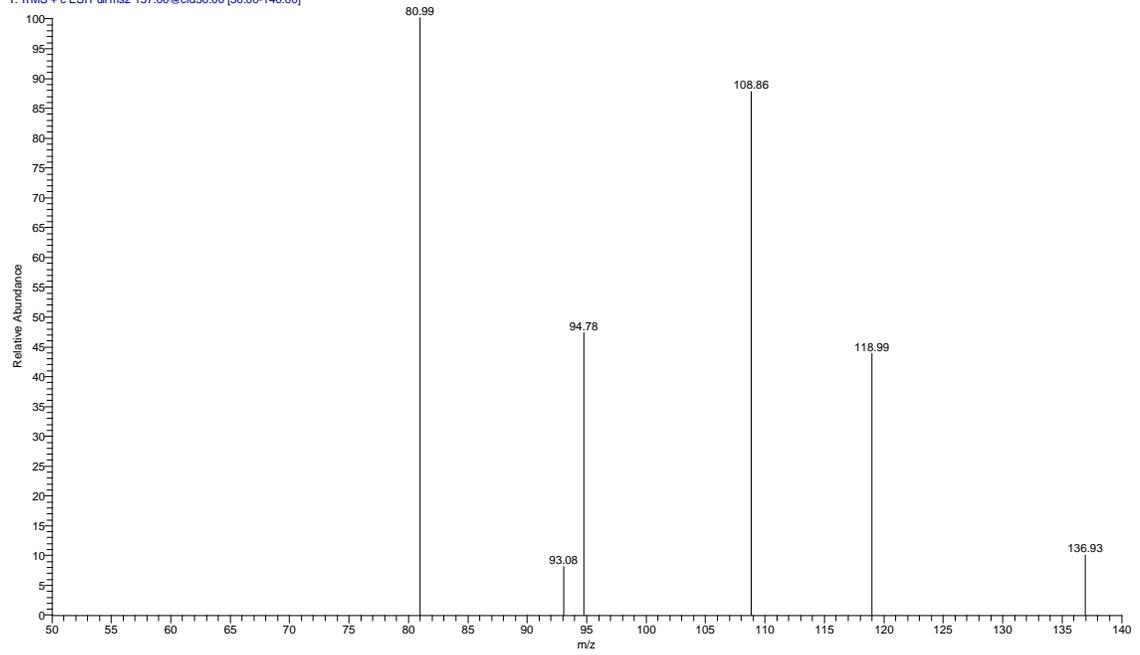
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ACIDO P-HIDROXIBENZOICO - PROP SDER_180925095408 #12 RT: 0.28 AV: 1 NL: 7.73
T: ITMS + c ESI Full ms2 137.00@cid25.00 [50.00-140.00]



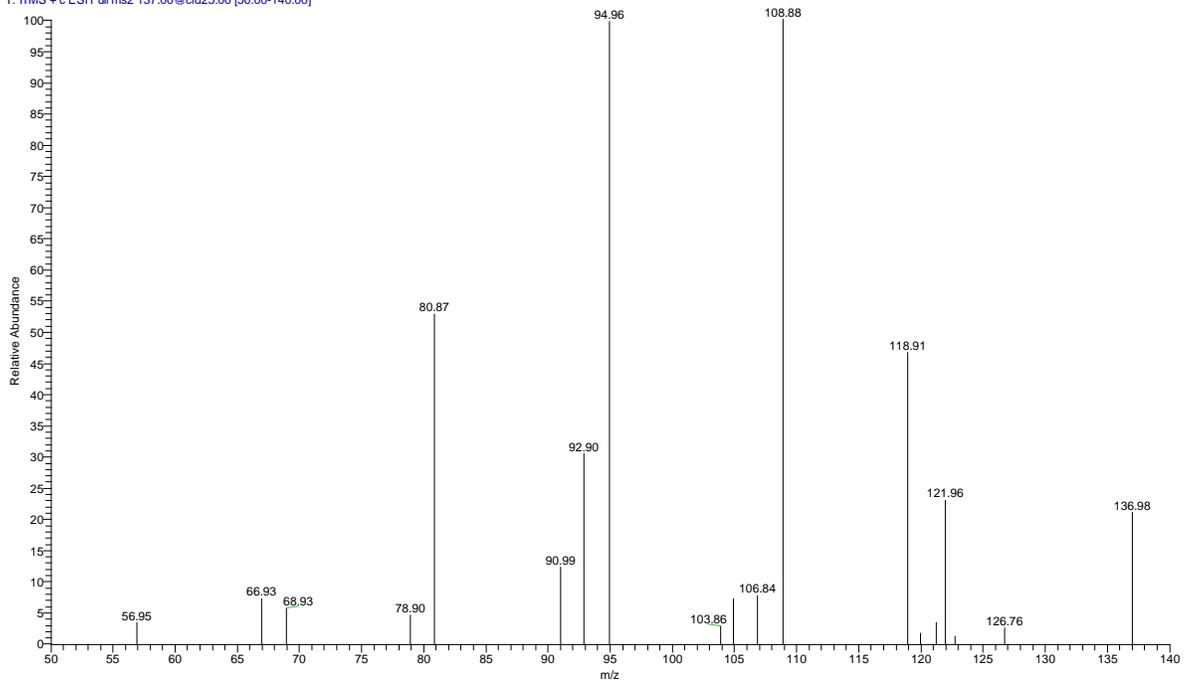
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ACIDO P-HIDROXIBENZOICO - PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 7.47
T: FTMS + c ESI Full ms2 137.00@cid30.00 [50.00-140.00]



- Miel Propolizada Tunía

ACIDO P-HIDROXIBENZOICO-mielproptunia #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.22E1
T: FTMS + c ESI Full ms2 137.00@cid25.00 [50.00-140.00]



ÁCIDO FERÚLICO

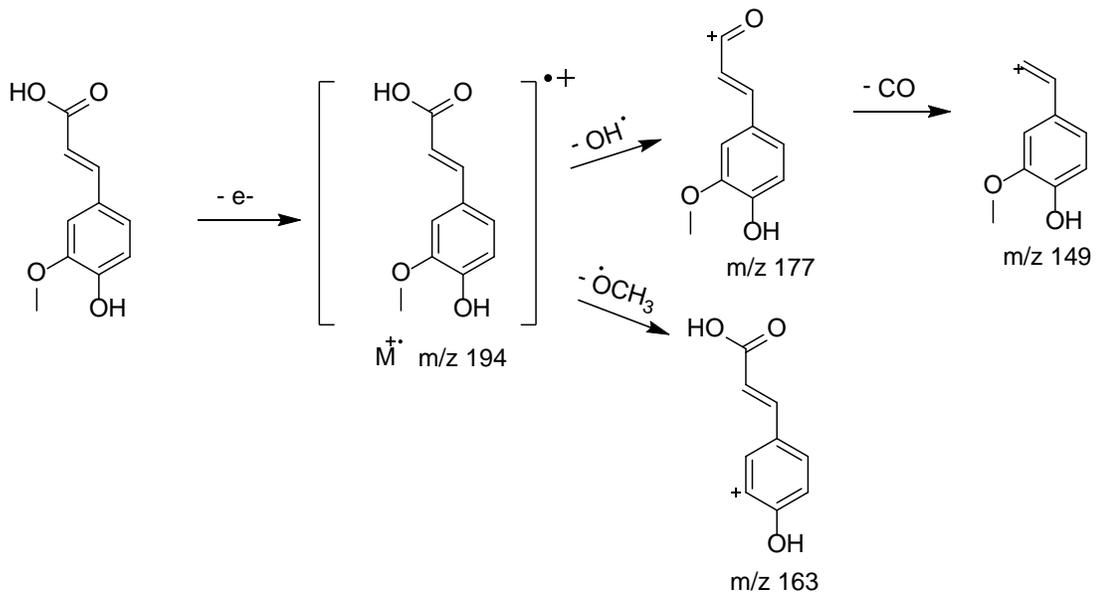
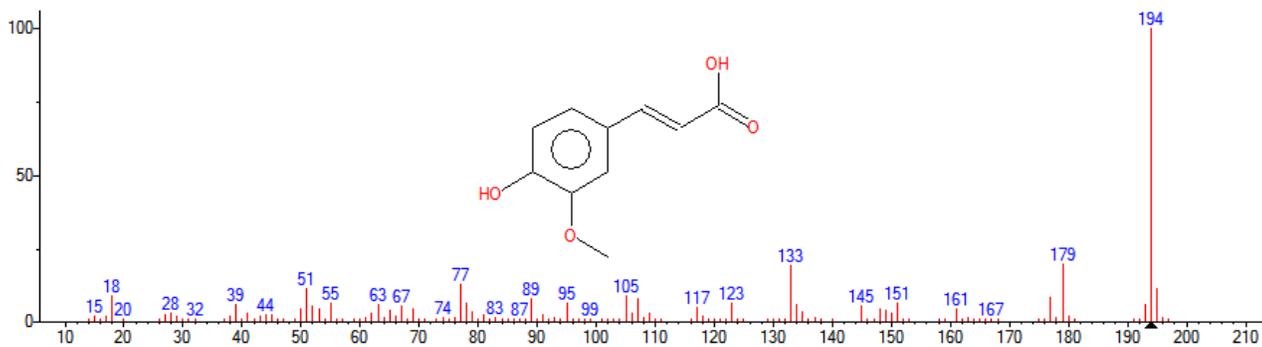


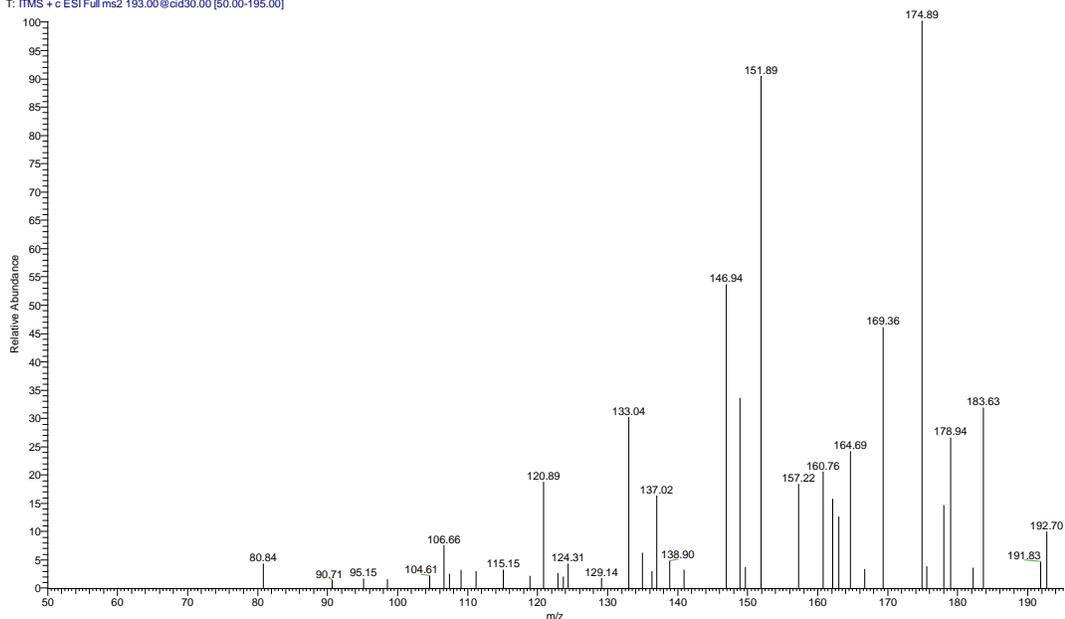
Figura 19. Fragmentos principales del ácido ferúlico.

- Espectro Teórico



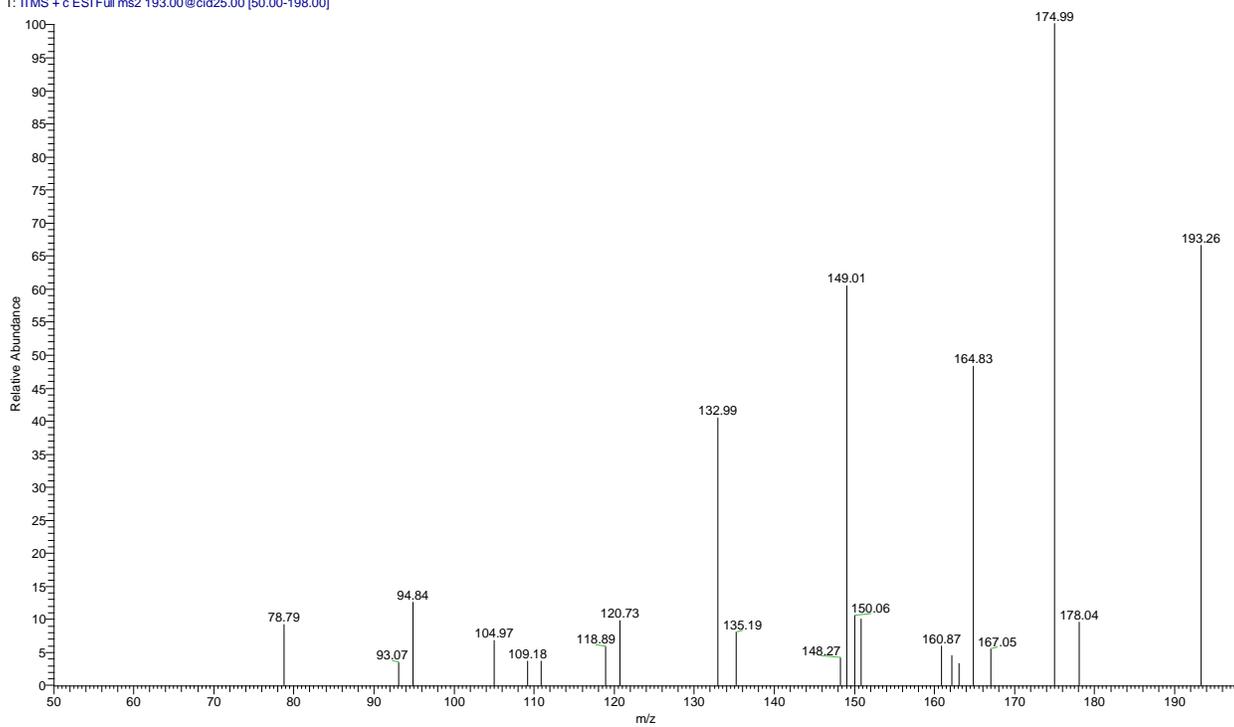
- Miel Santander

ACIDO FERULICO - MEL SDER_180925095408 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 2.04E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 193.00@cid30.00 [50.00-195.00]



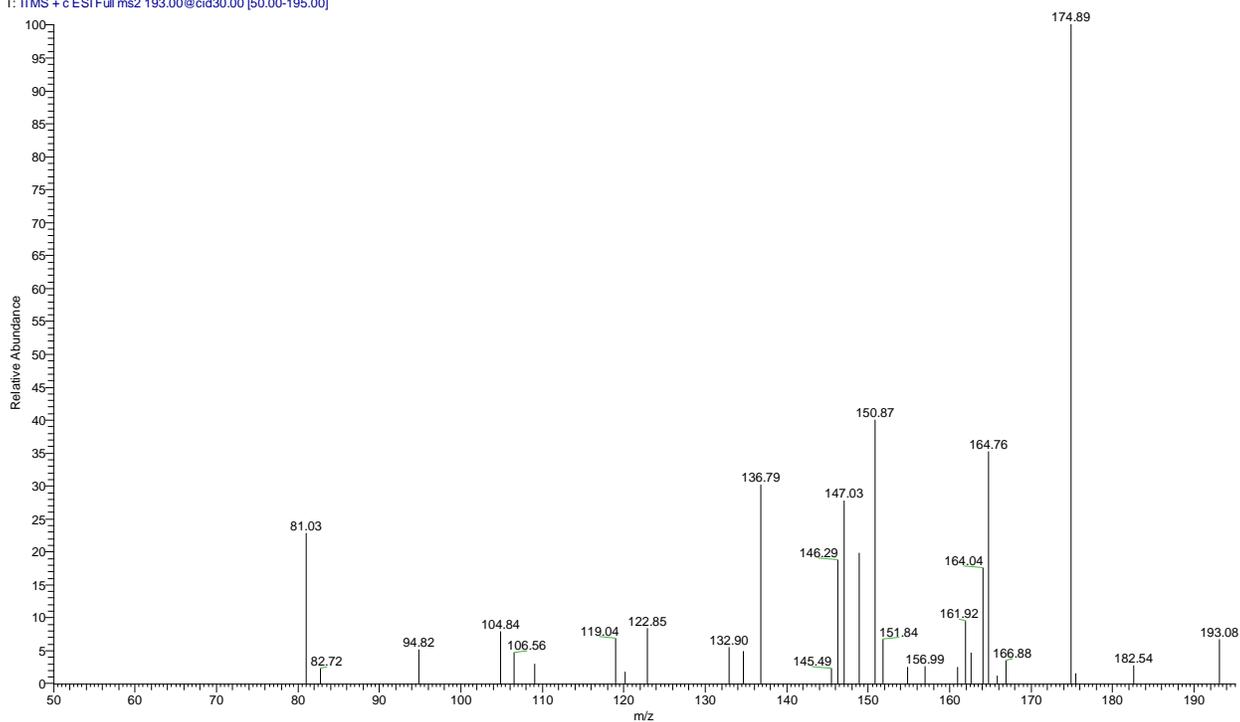
- Miel Tunía

ACIDO FERULICO - MEL TUNIA_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 8.02
T: ITMS + c ESI Full ms2 193.00@cid25.00 [50.00-198.00]



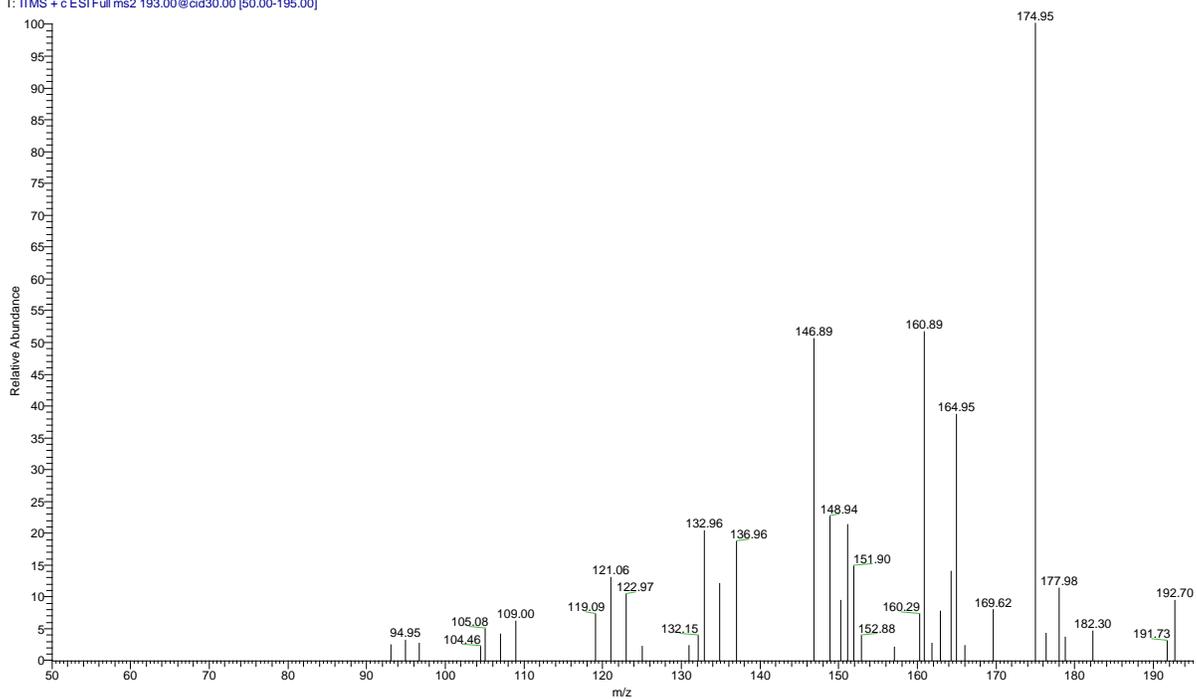
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ACIDO FERULICO - PROP SDER_180925103639 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.63E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 193.00@cid30.00 [50.00-195.00]



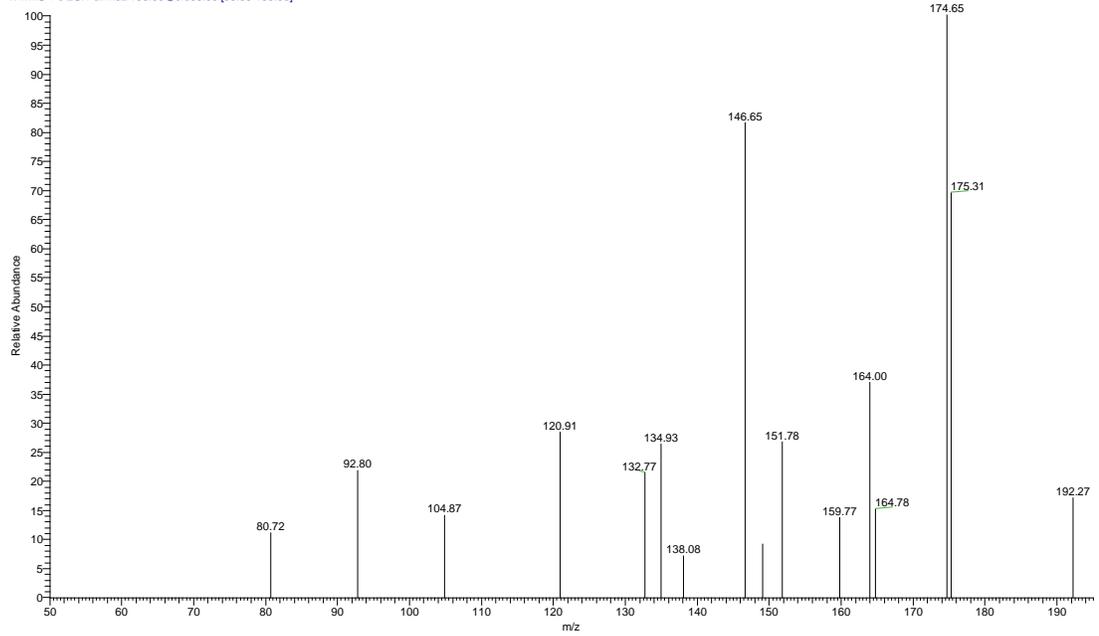
- Miel Propolizada Tunía

ACIDO FERULICO-mielproptunia #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 1.42E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 193.00@cid30.00 [50.00-195.00]



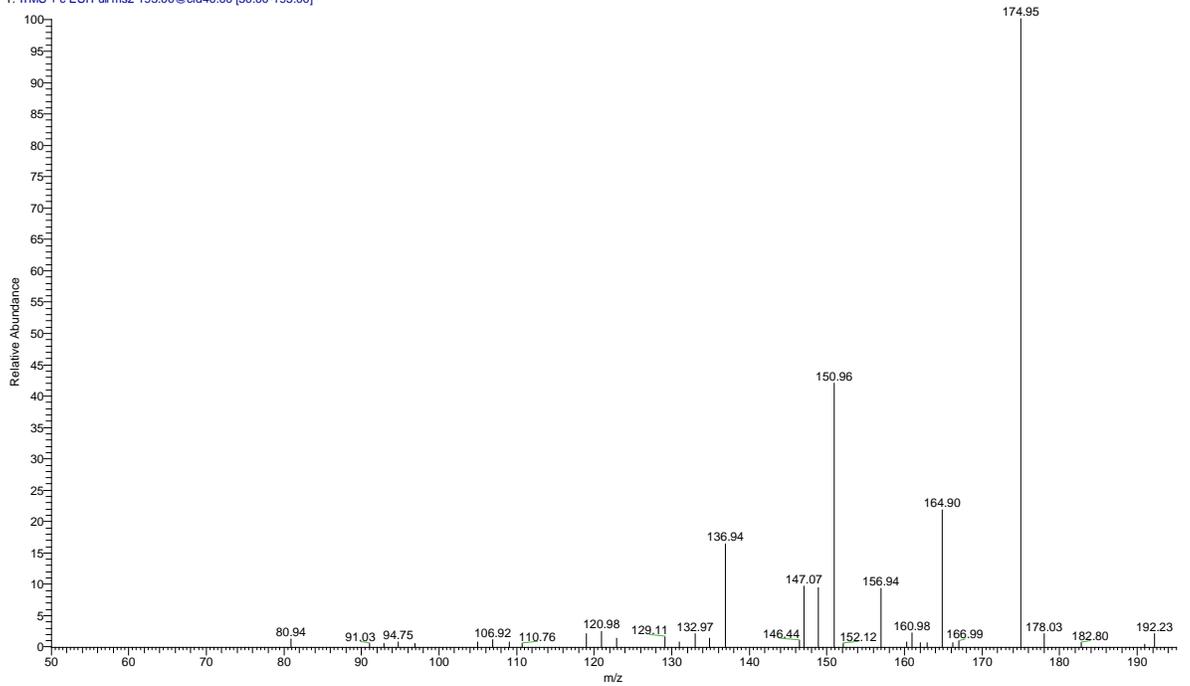
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ACIDO FERULICO-PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 4.84
T: ITMS + c ESI Full ms2 193.00@cid35.00 [50.00-195.00]



- Miel Propolizada Santander

ACIDO FERULICO-MIEL PROPSDER #16 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.77E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 193.00@cid40.00 [50.00-195.00]



LUTEOLINA

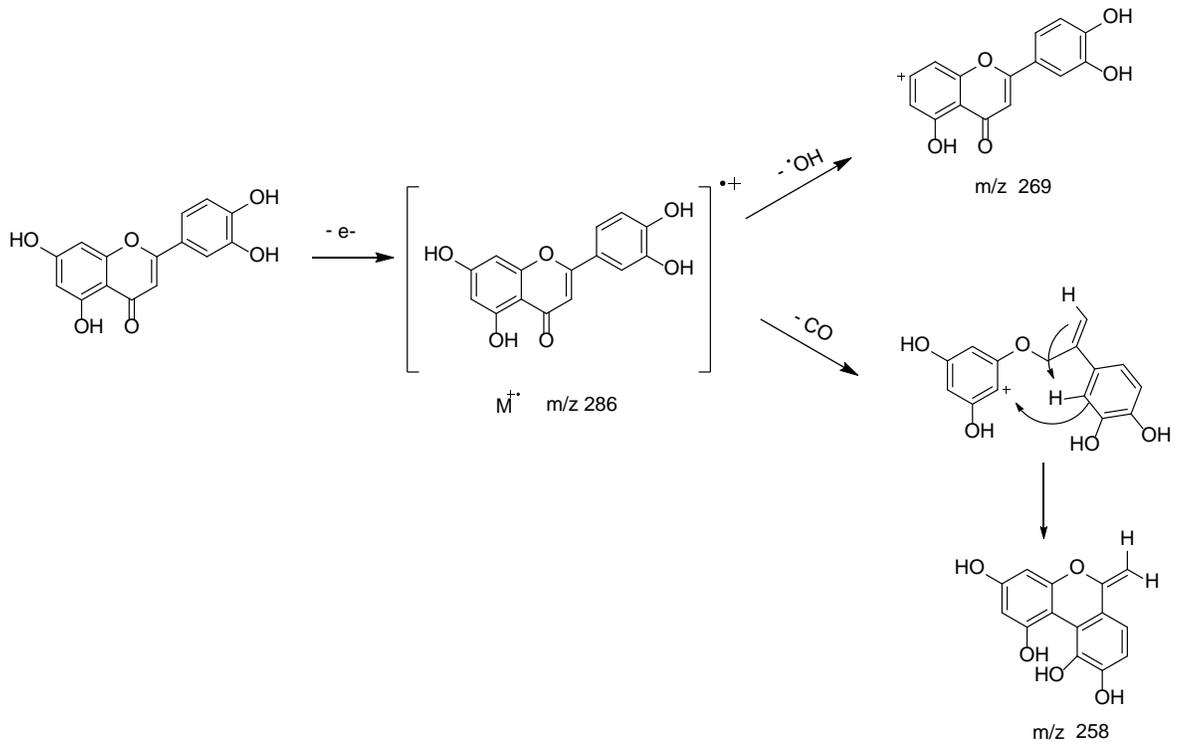
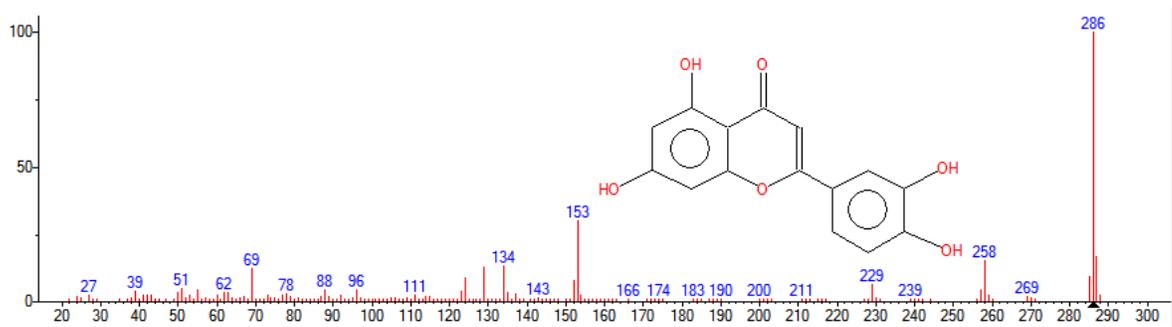


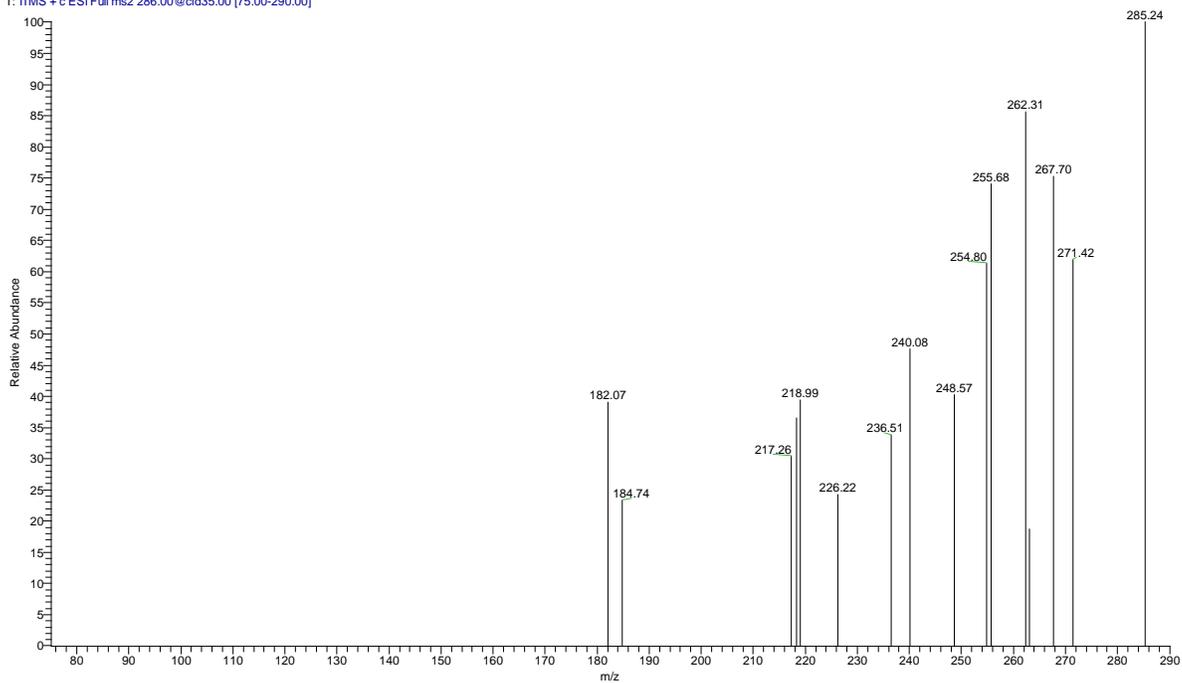
Figura 20. Fragmentos principales de la luteolina.

- Espectro Teórico



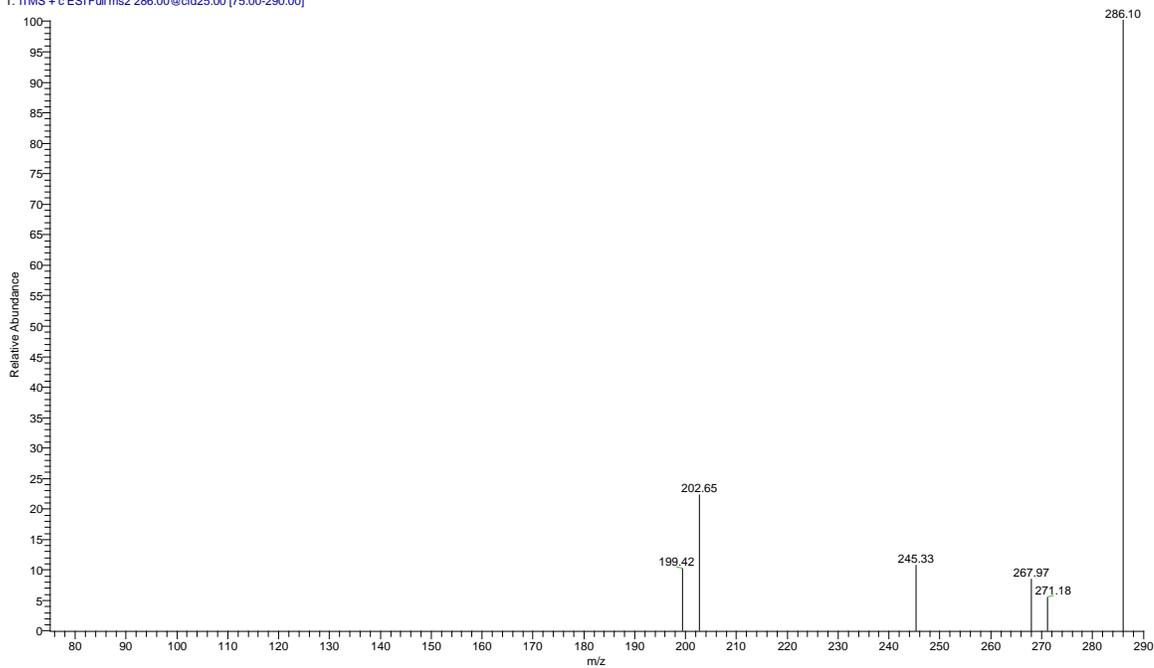
- Miel Santander

LUTEOLINA - MIEL SDER_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.56
T: ITMS + c ESI Full ms2 286.00@cid35.00 [75.00-290.00]



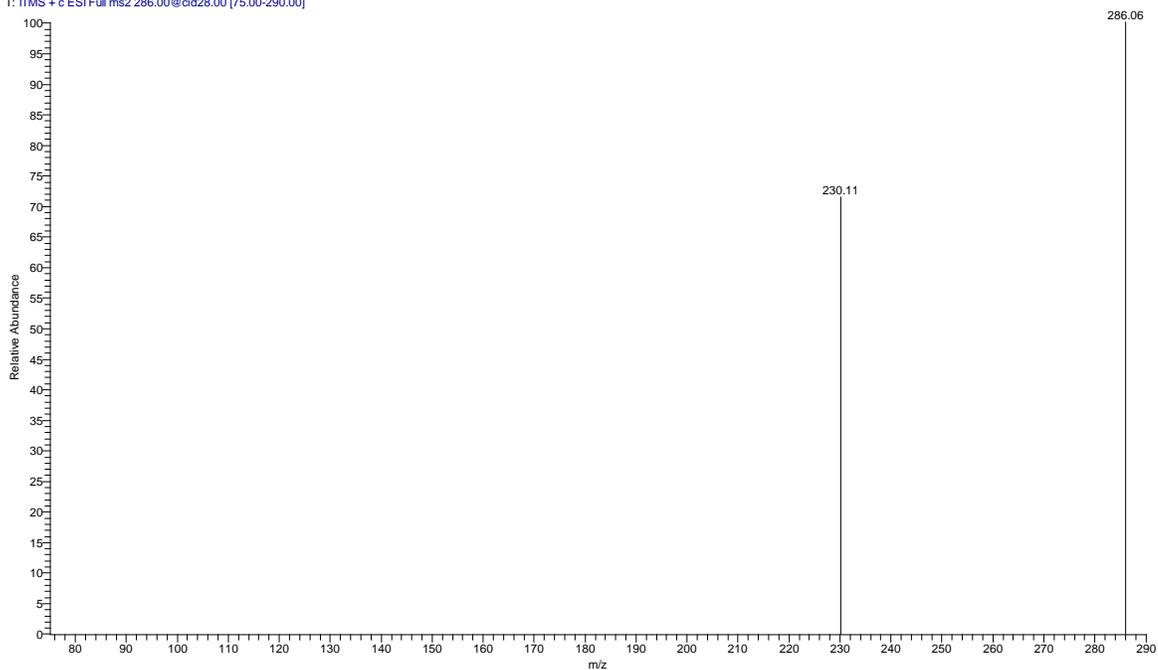
- Miel Tunía

LUTEOLINA - MIEL TUNIA_180925085707 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 6.86
T: ITMS + c ESI Full ms2 286.00@cid25.00 [75.00-290.00]



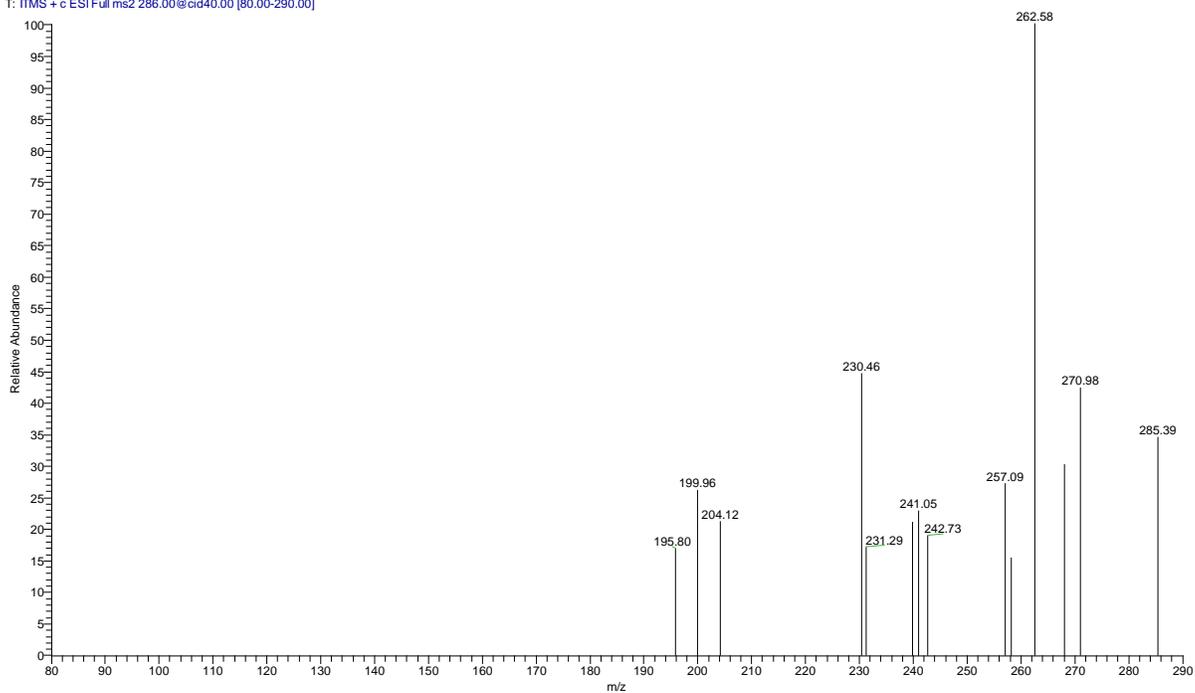
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

LUTEOLINA - PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 5.09E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 286.00@cid28.00 [75.00-290.00]



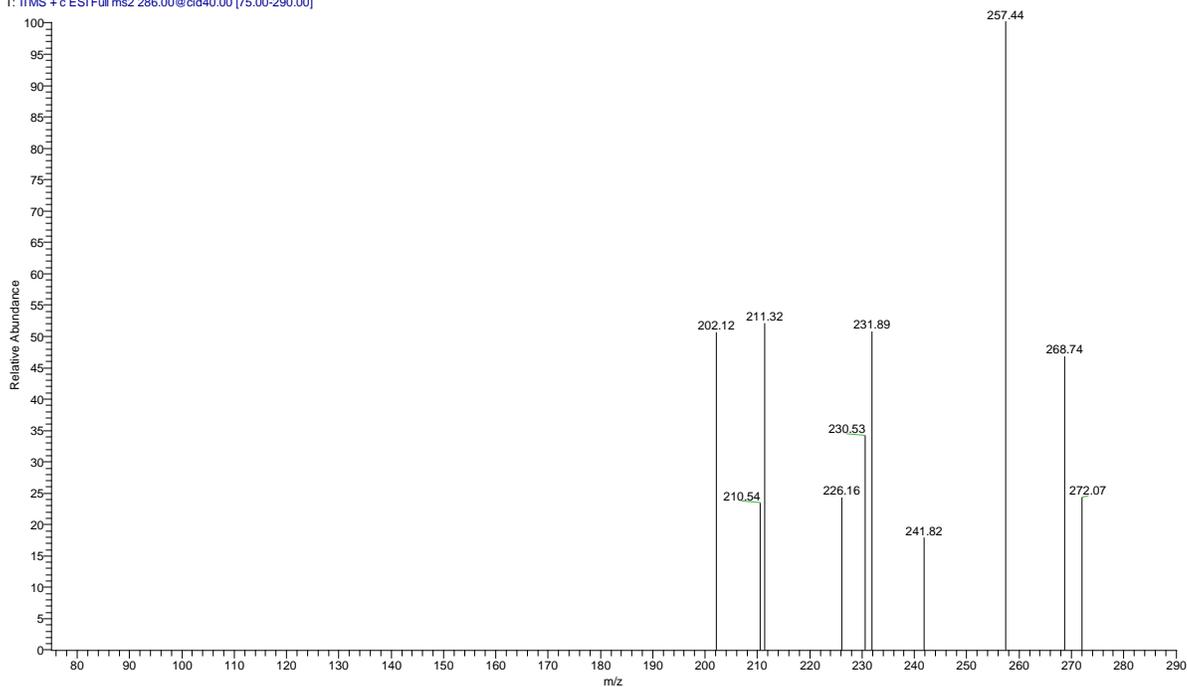
- Miel Propolizada Tunía

LUTEOLINA - mielproptunia #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 1.76
T: ITMS + c ESI Full ms2 286.00@cid40.00 [80.00-290.00]



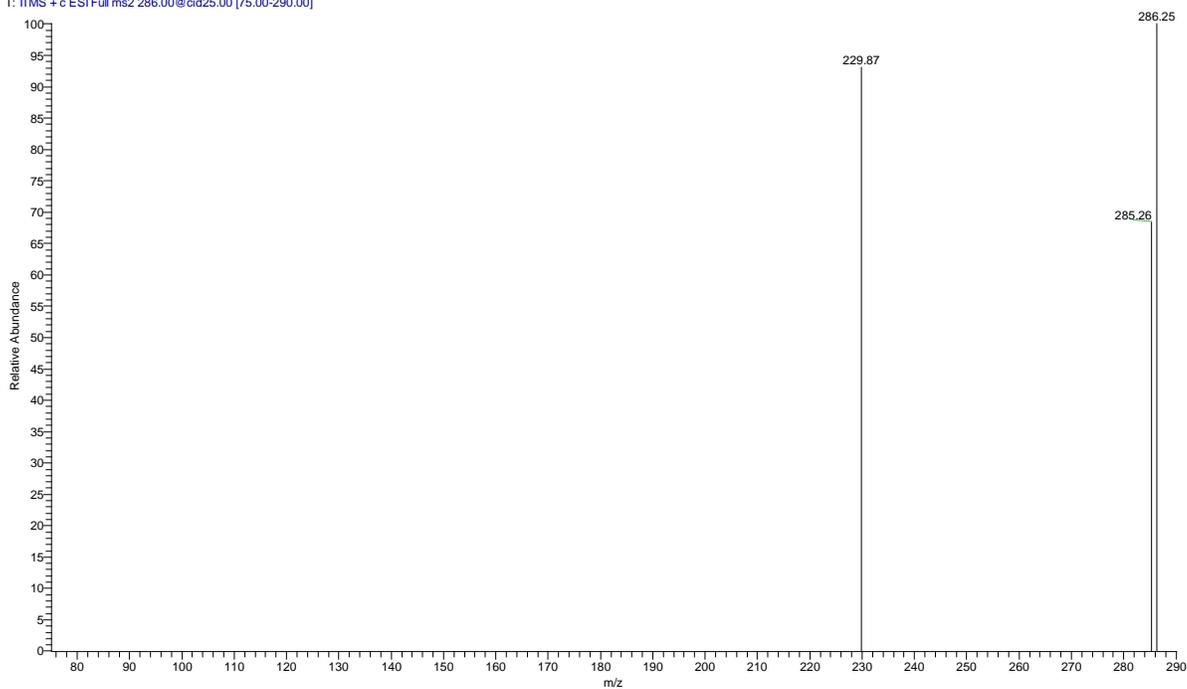
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

LUTEOLINA-PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.68
T: FTMS + c ESI Full ms2 286.00@cid40.00 [75.00-290.00]



- Miel Propolizada Santander

LUTEOLINA-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 4.13E-1
T: FTMS + c ESI Full ms2 286.00@cid25.00 [75.00-290.00]



KAEMPFEROL

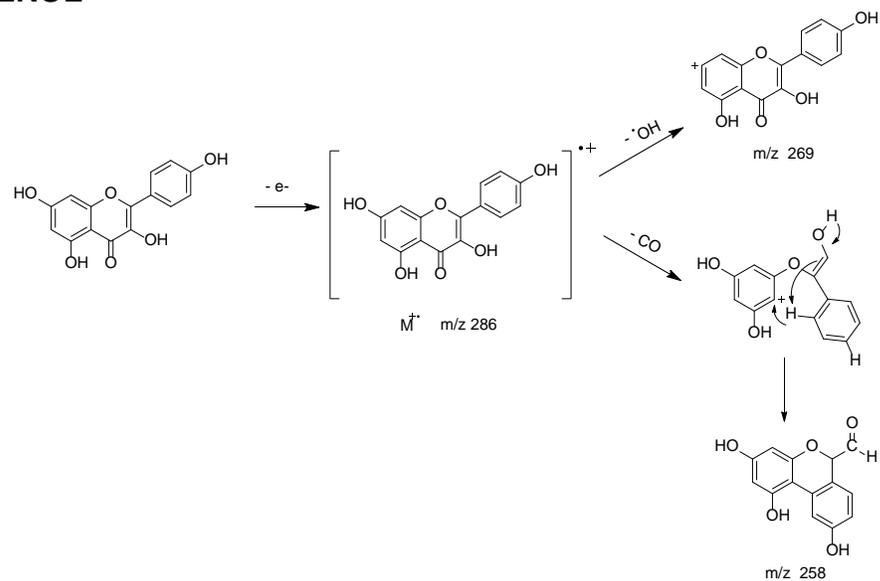
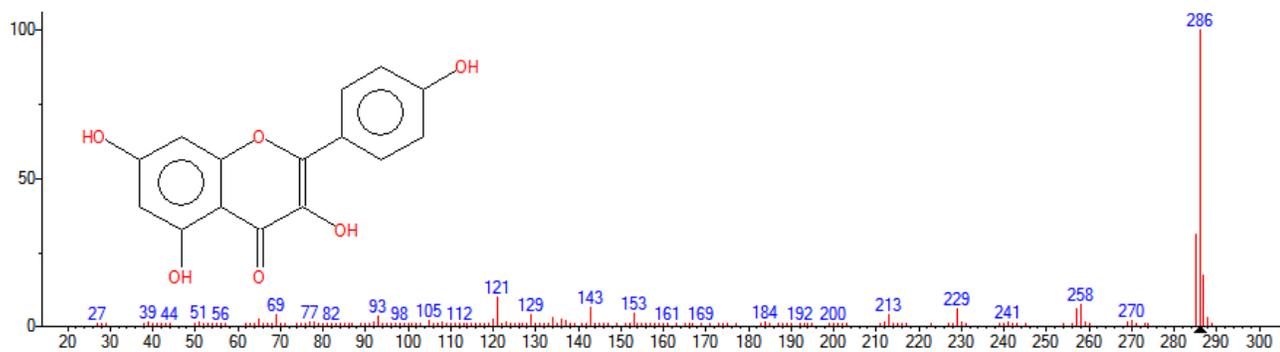


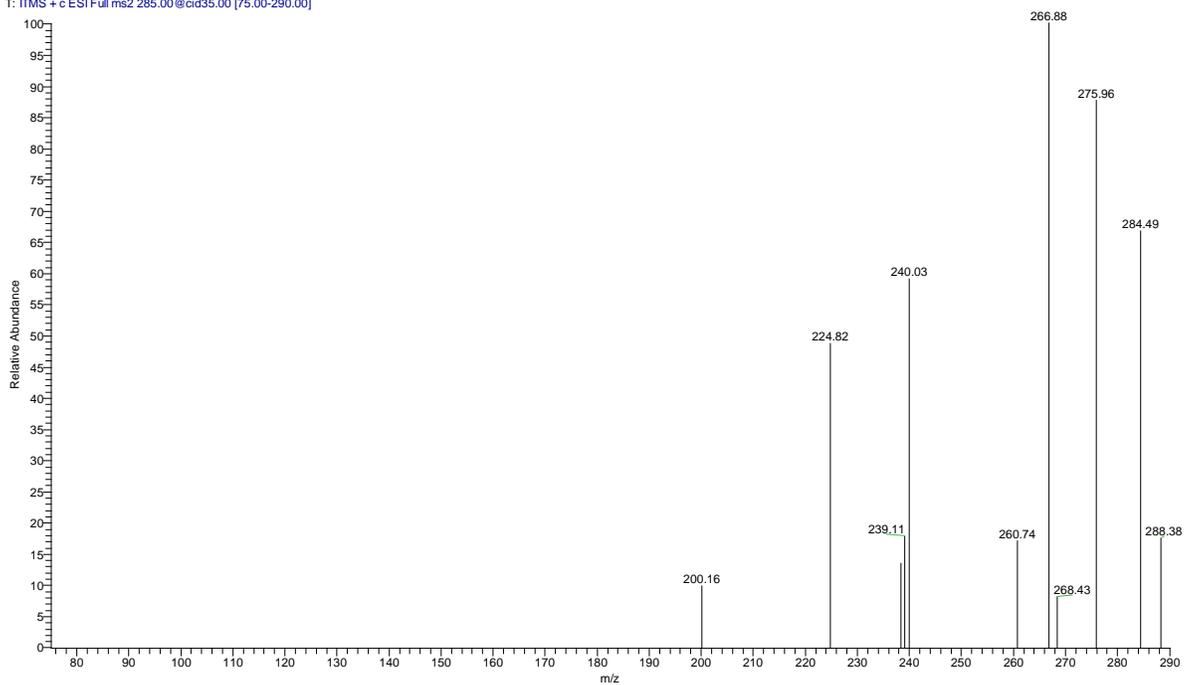
Figura 21. Fragmentos principales del kaempferol.

- Espectro Teórico



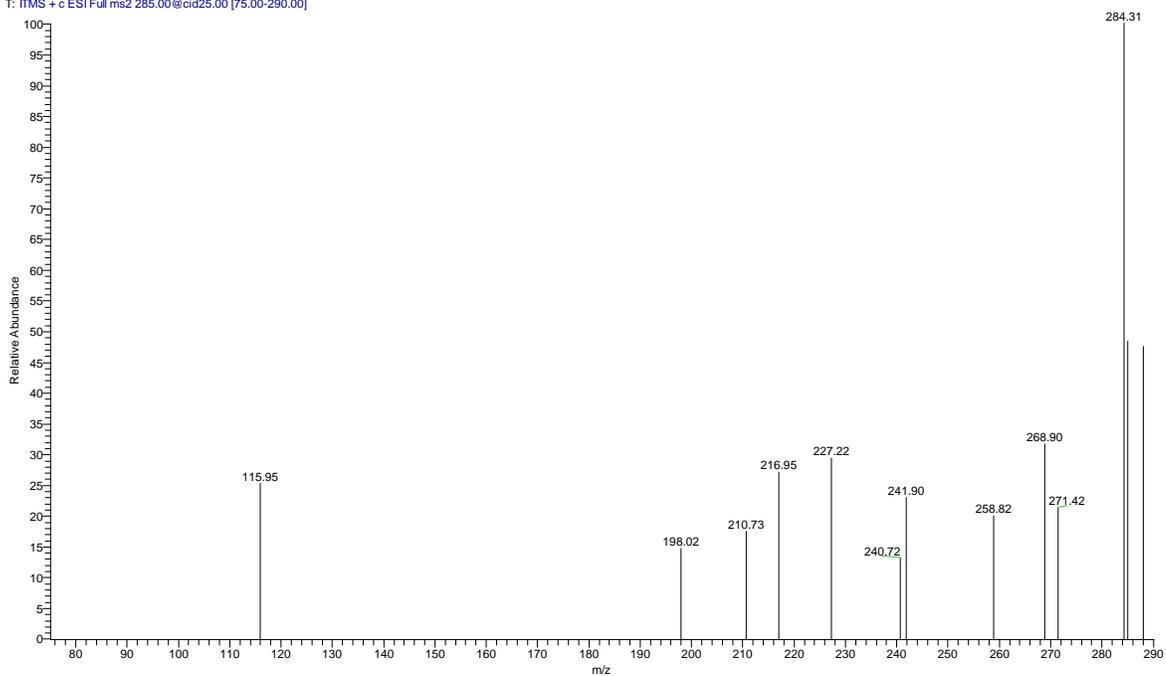
- Miel Santander

KAEMPFEROL - MIEL SDER_180925085707 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 3.51
T: ITMS + c ESI Full ms2 285.00@cid35.00 [75.00-290.00]



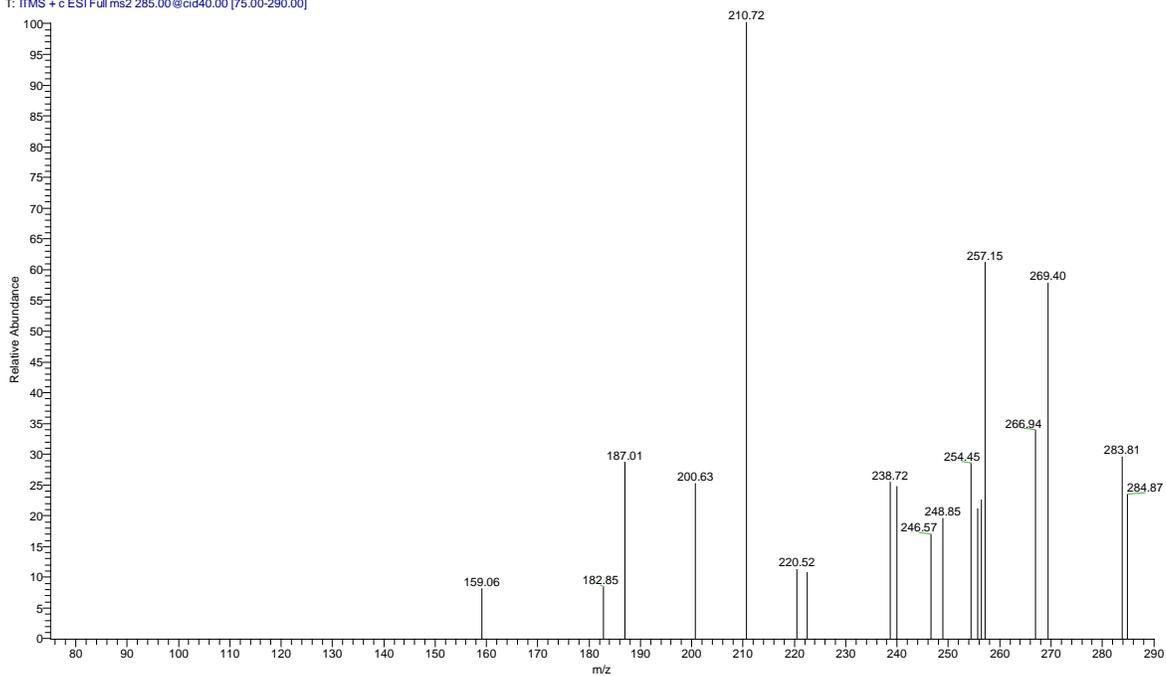
- Miel Tunía

KAEMPFEROL - MIEL TUNIA_180925085707 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 3.60
T: ITMS + c ESI Full ms2 285.00@cid25.00 [75.00-290.00]



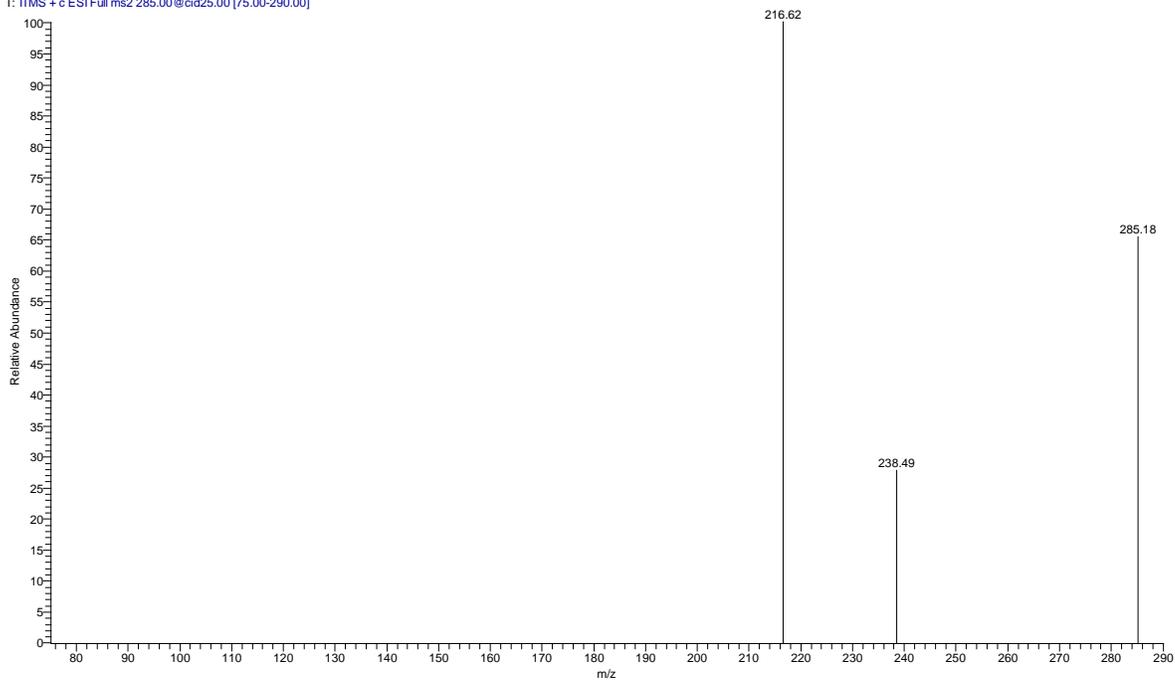
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

KAEMPFEROL - PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 3.26
T: ITMS + c ESI Full ms2 285.00@cid40.00 [75.00-290.00]



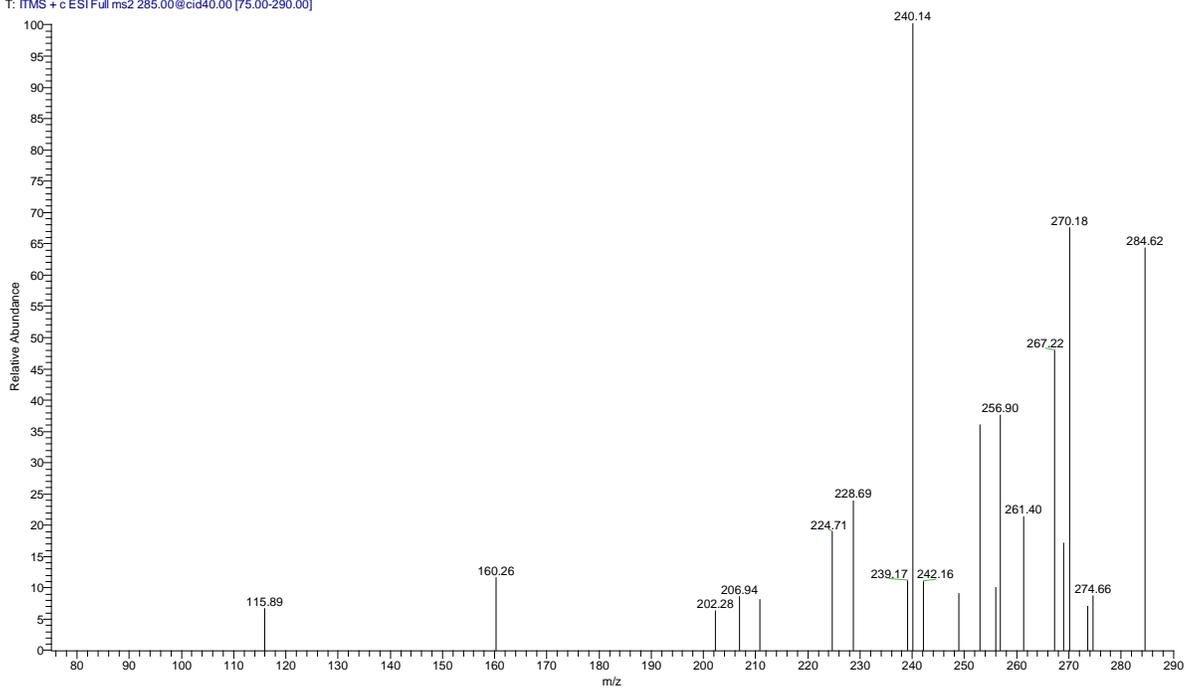
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

KAEMPFEROL - PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 2.43
T: ITMS + c ESI Full ms2 285.00@cid25.00 [75.00-290.00]



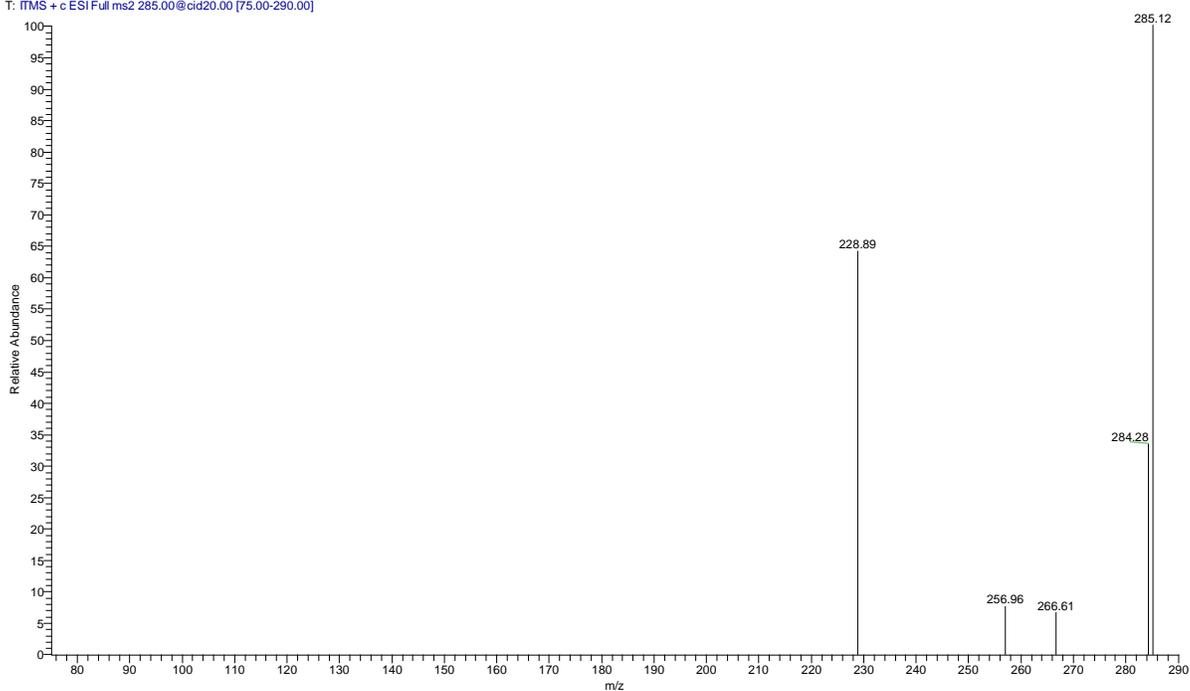
- Miel Propolizada Tunía

KAEMPFEROL-mielproptunia_180924162821 #12 RT: 0.29 AV: 1 NL: 5.06
T: ITMS + c ESI Full ms2 285.00@cid40.00 [75.00-290.00]



- Miel Propolizada Santander

KAEMPFEROL-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 3.99
T: ITMS + c ESI Full ms2 285.00@cid20.00 [75.00-290.00]



QUERCETINA

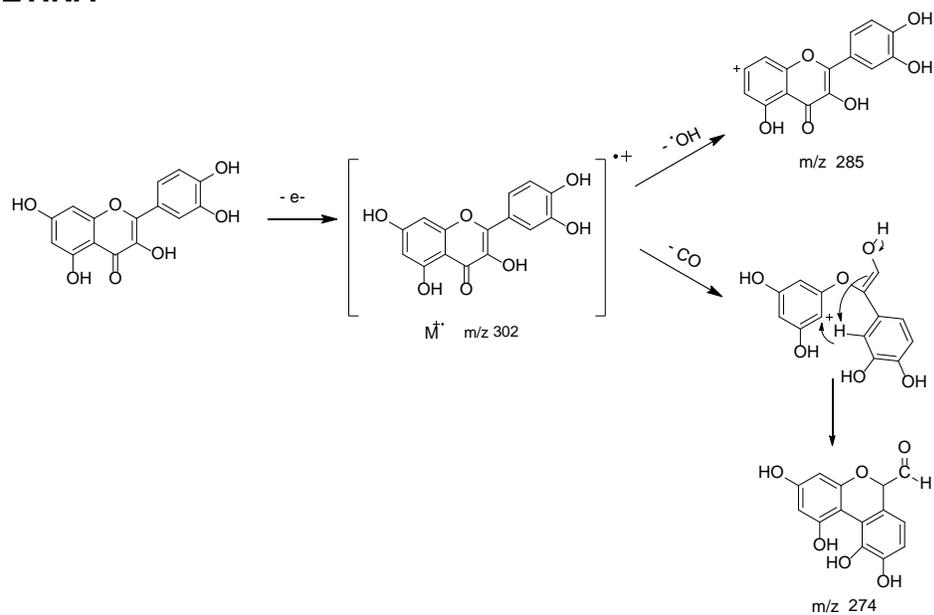
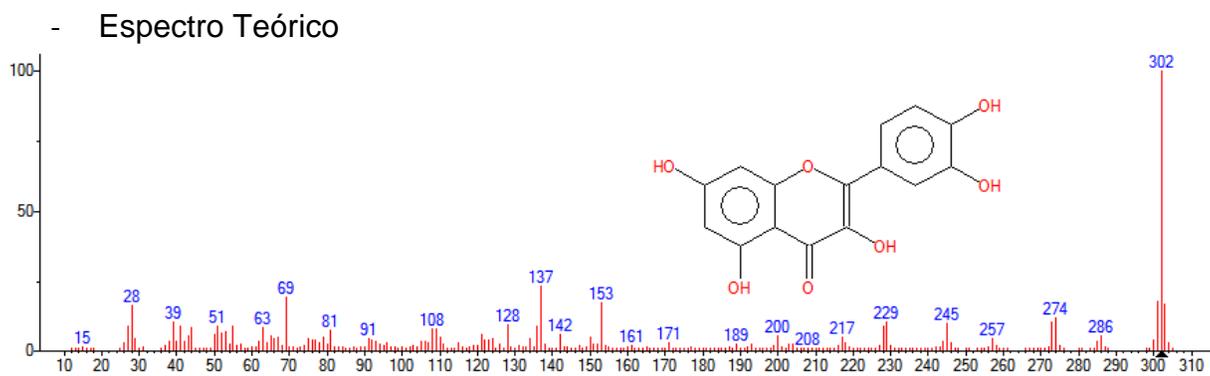
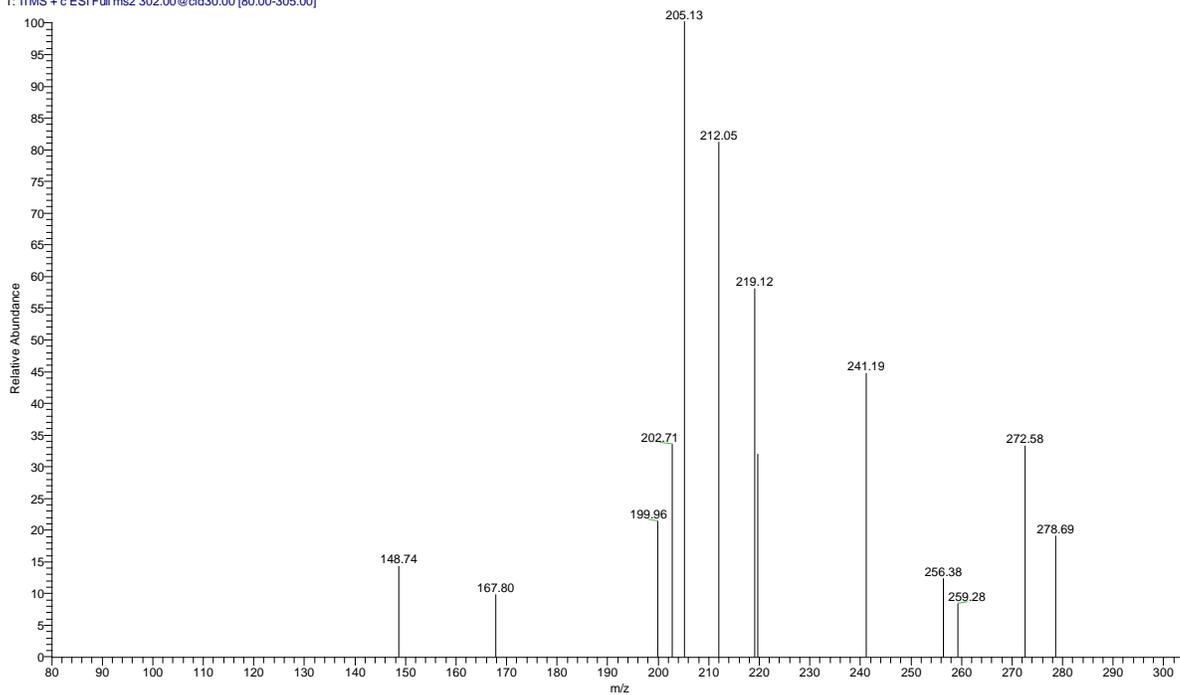


Figura 22. Fragmentos principales de la quercetina.



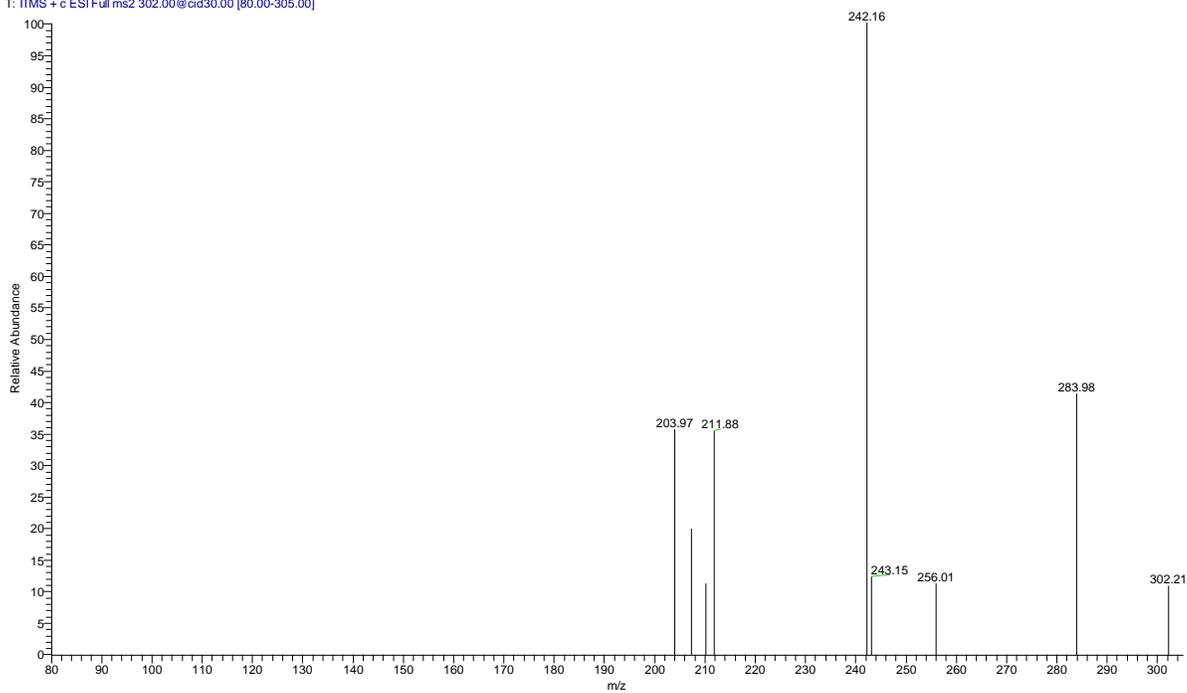
- Miel Santander

QUERCETINA - MIEL SDER_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 4.21
T: ITMS + c ESI Full ms2 302.00@cid30.00 [80.00-305.00]



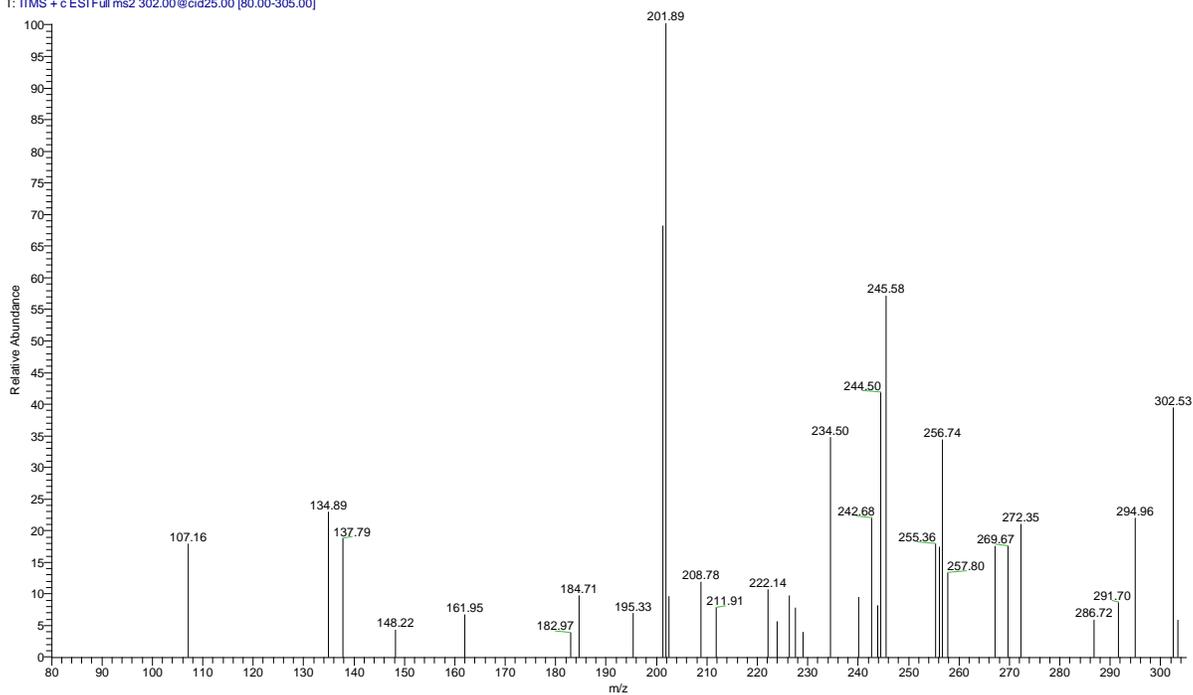
- Miel Tunía

QUERCETINA - MIEL TUNIA_180925085707 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 3.71
T: ITMS + c ESI Full ms2 302.00@cid30.00 [80.00-305.00]



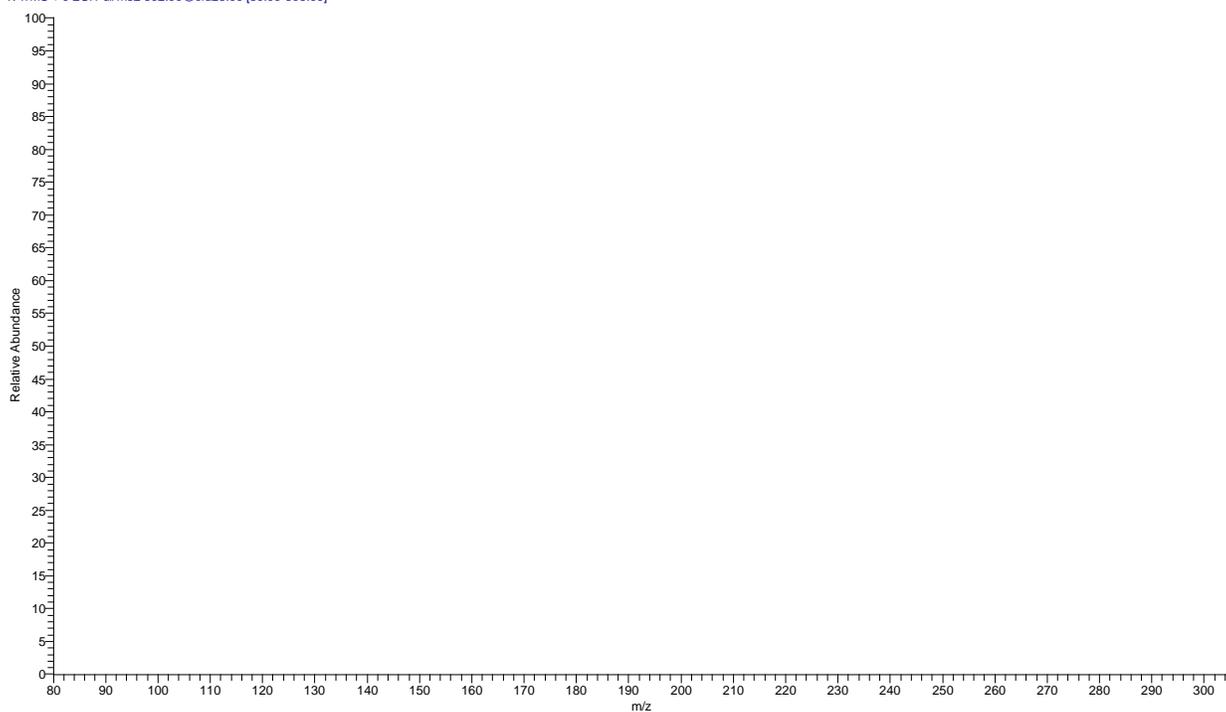
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

QUERCETINA - PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 7.01
T: ITMS + c ESI Full ms2 302.00@cid25.00 [80.00-305.00]



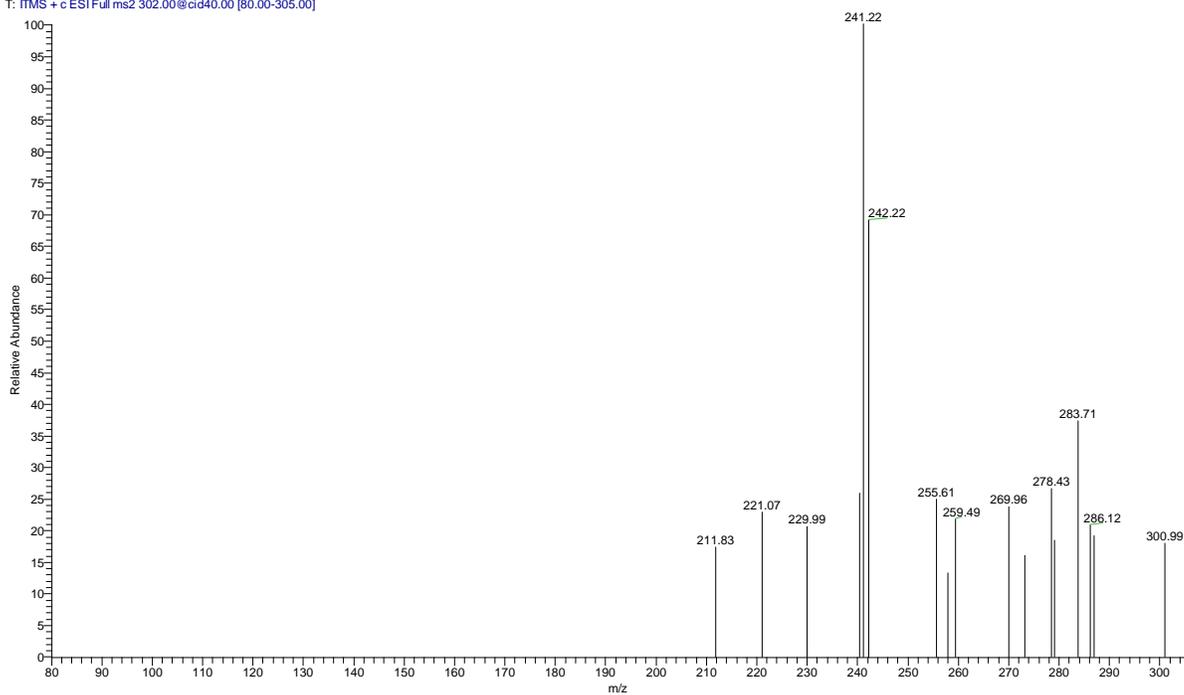
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

QUERCETINA - PROP TUNIA_180925103639 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 0
T: ITMS + c ESI Full ms2 302.00@cid25.00 [80.00-305.00]



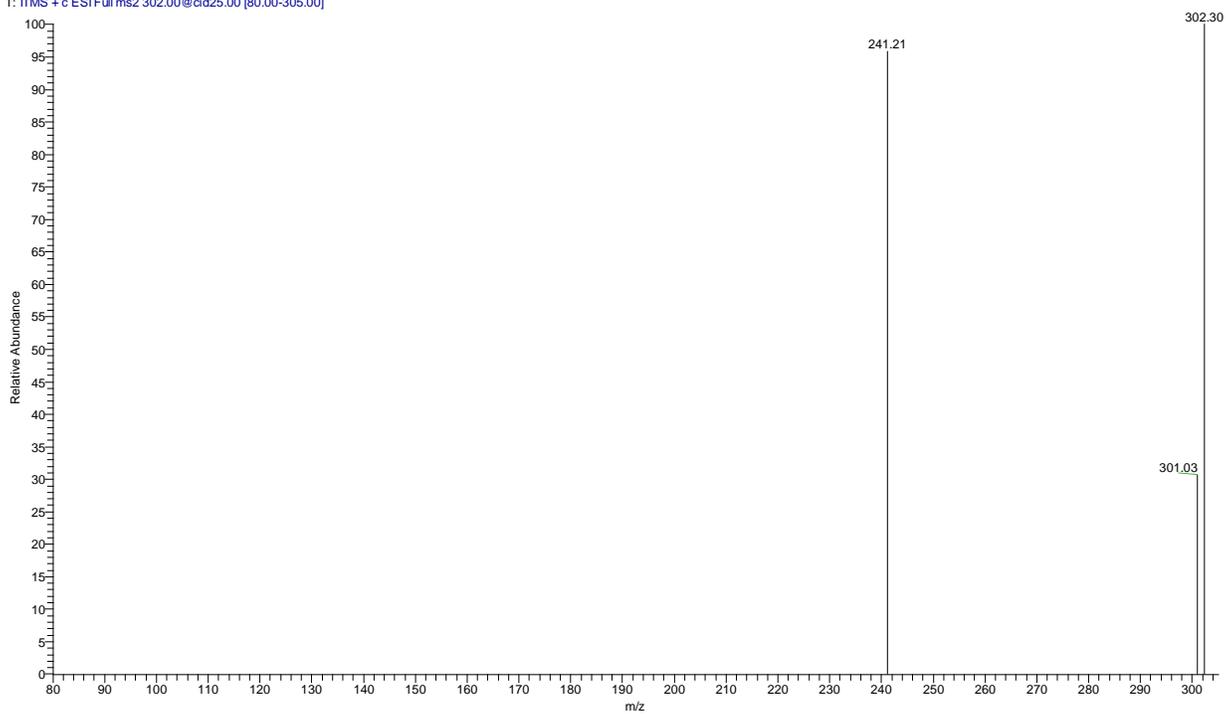
- Miel Propolizada Tunía

QUERCETINA -mielproplunia_180924162821 #12 RT: 0.29 AV: 1 NL: 2.52
T: ITMS + c ESI Full ms2 302.00@cid40.00 [80.00-305.00]



- Miel Propolizada Santander

QUERCETINA-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.28
T: ITMS + c ESI Full ms2 302.00@cid25.00 [80.00-305.00]



VANILINA

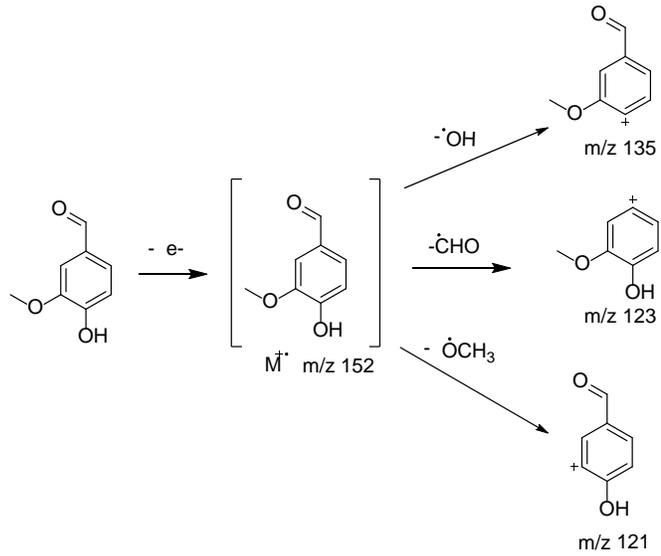
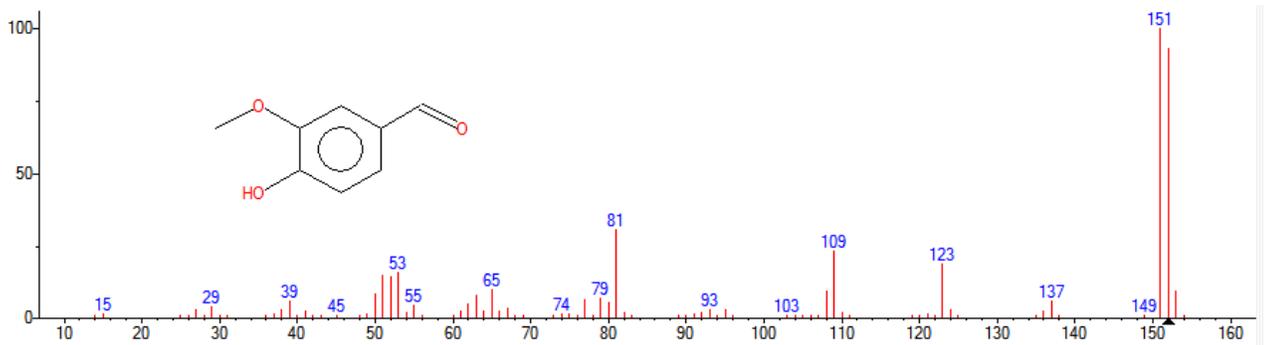


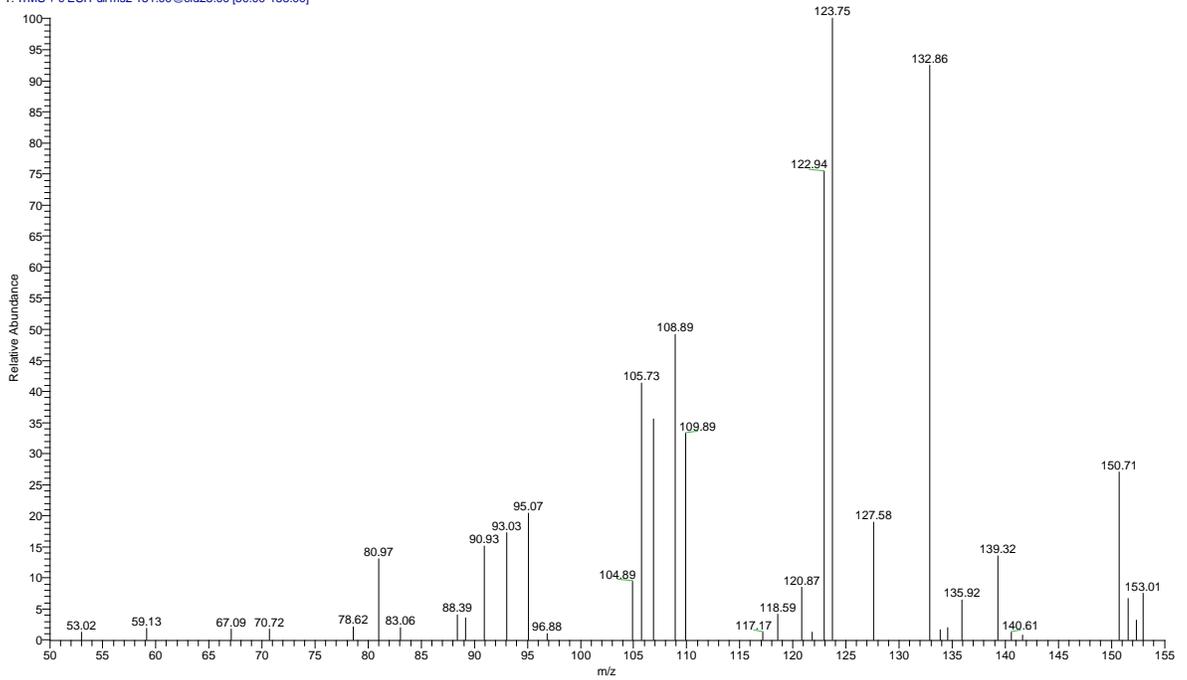
Figura 23. Fragmentos principales de la vanilina.

- Espectro Teórico



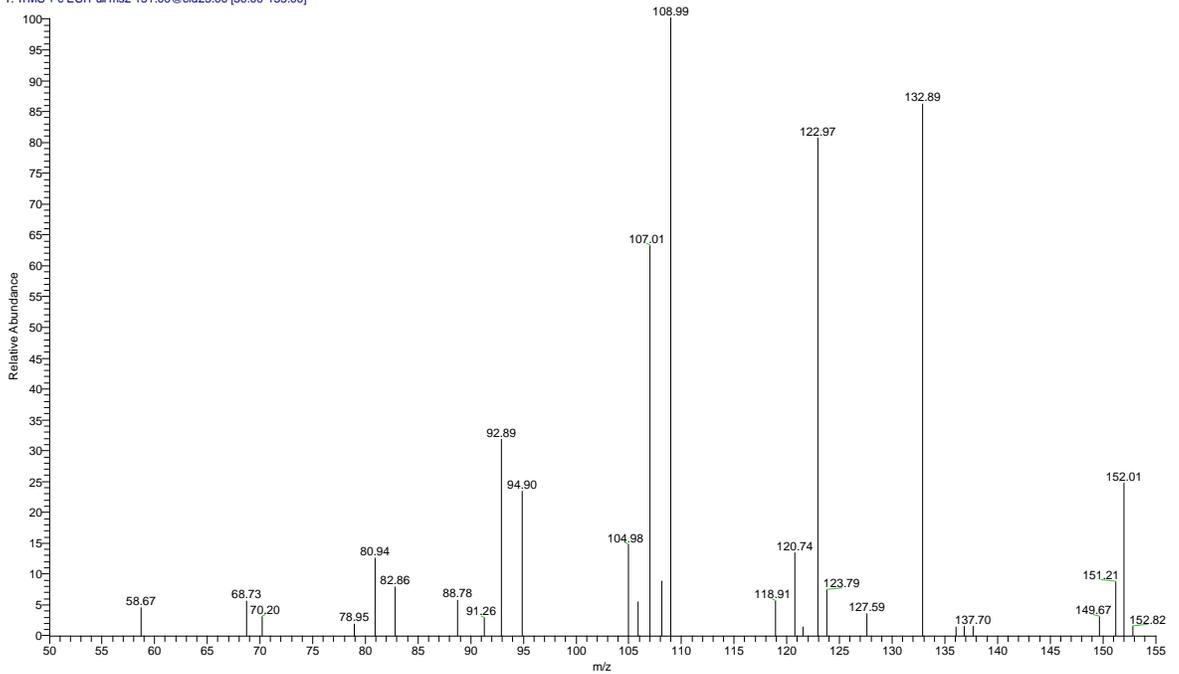
- Miel Santander

VANILINA - MIEL SDER_180925095408 #12 RT: 0.29 AV: 1 NL: 4.13E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 151.00@cid25.00 [50.00-155.00]



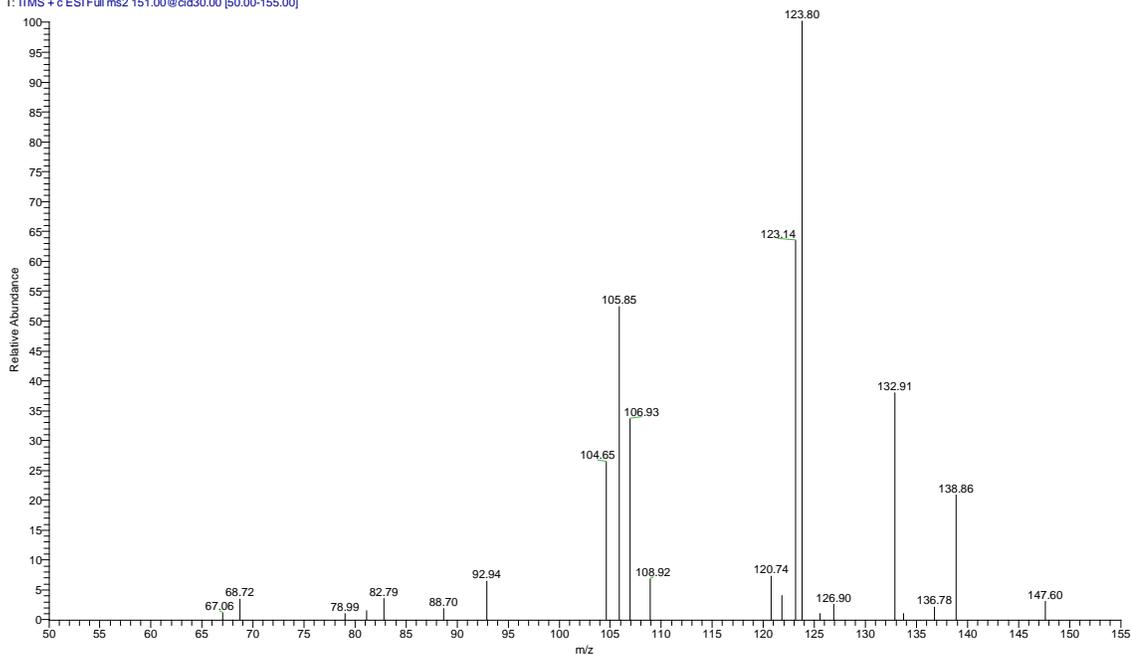
- Miel Tunía

VANILINA - MIEL TUNIA_180925085707 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.12E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 151.00@cid25.00 [50.00-155.00]



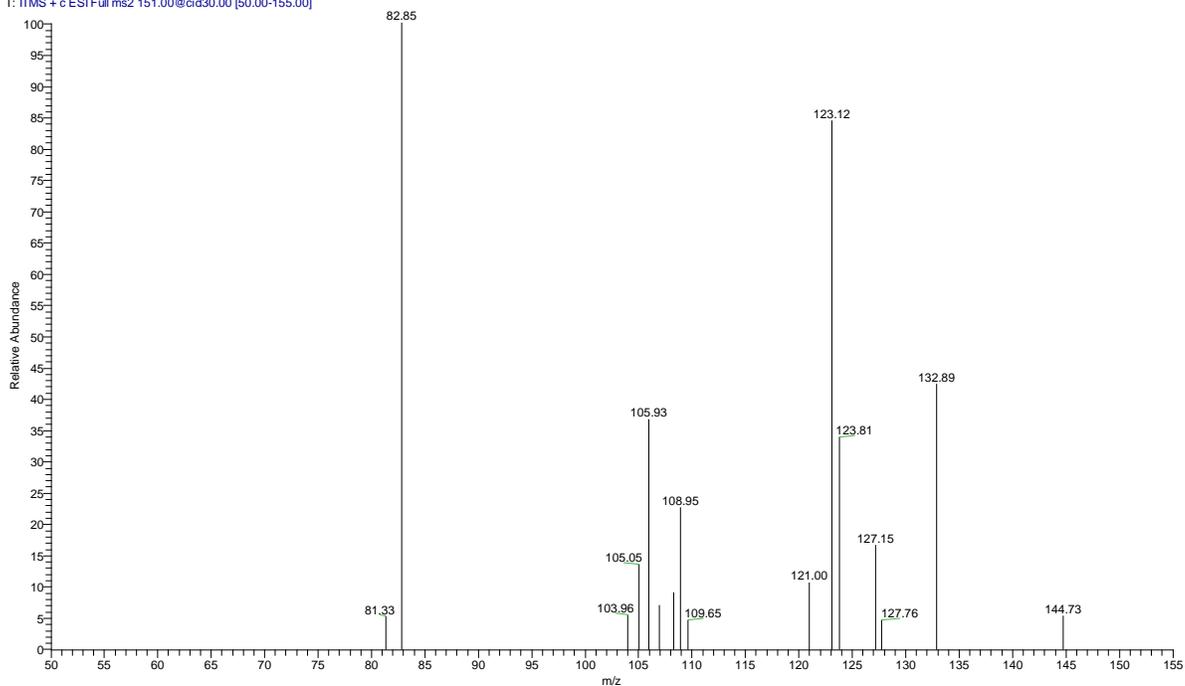
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

VANILINA - PROP SDER_180925103639 #11 RT: 0.28 AV: 1 NL: 3.06E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 151.00@cid30.00 [50.00-155.00]



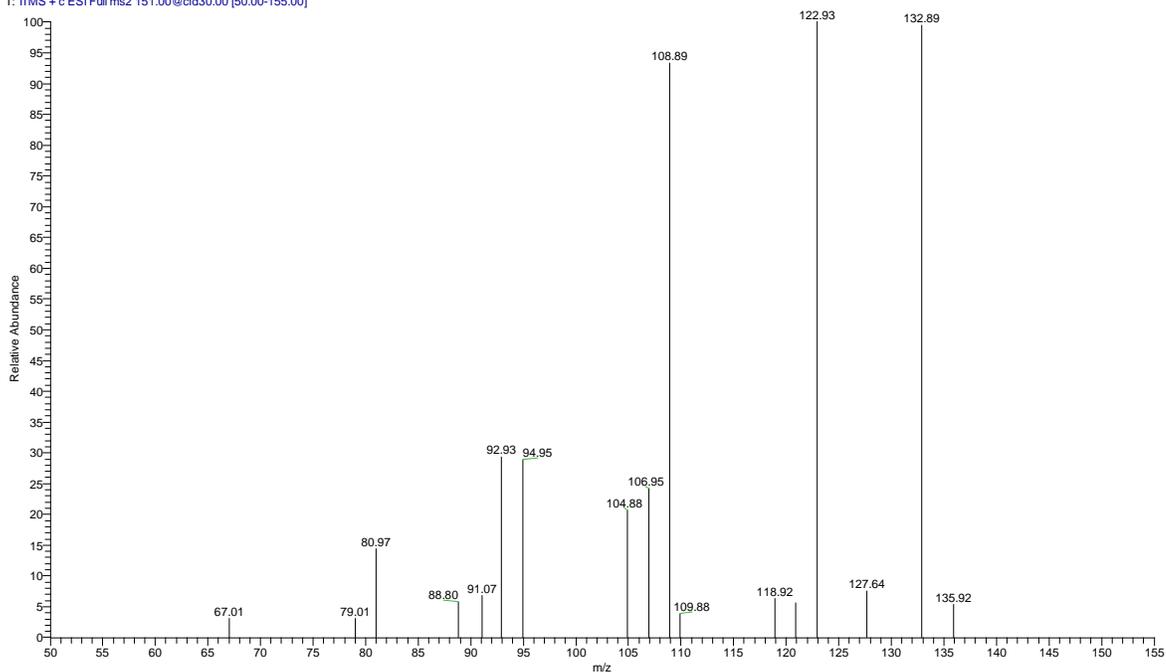
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

VANILINA - PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 8.09
T: ITMS + c ESI Full ms2 151.00@cid30.00 [50.00-155.00]



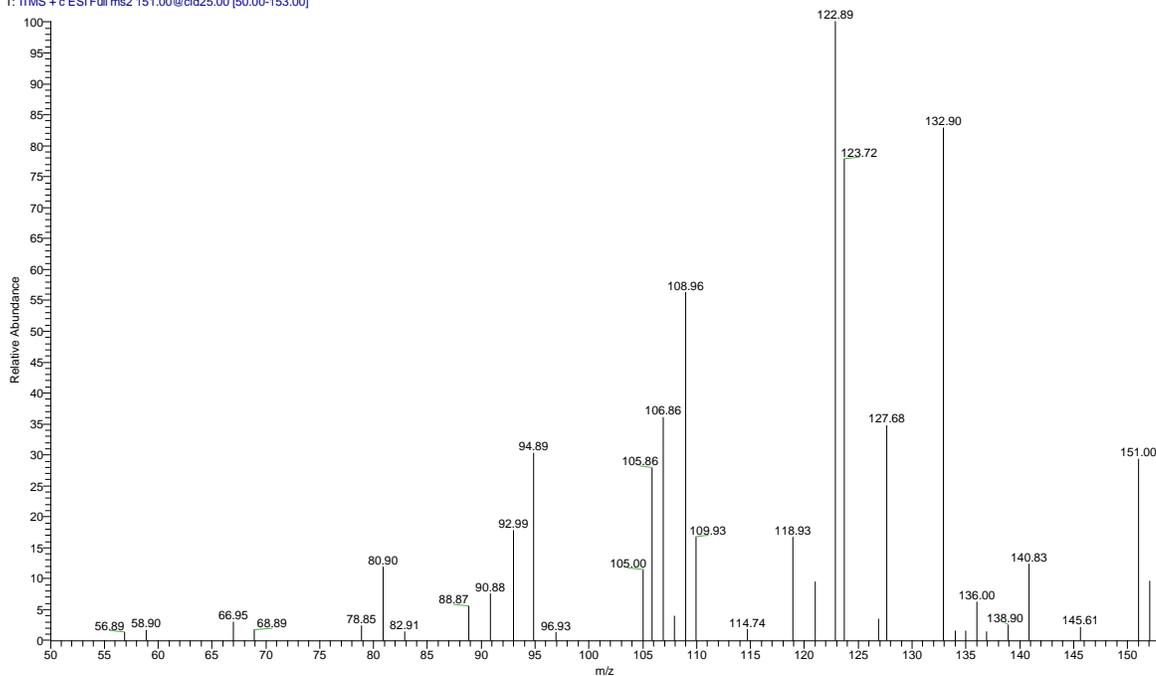
- Miel Propolizada Santander

VANILINA-MIEL PROPSDER #18 RT: 0.30 AV: 1 NL: 2.33E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 151.00@cid30.00 [50.00-155.00]



- Miel Propolizada Tunía

VANILINA-mielproptunia #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 2.39E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 151.00@cid25.00 [50.00-153.00]



APIGENINA

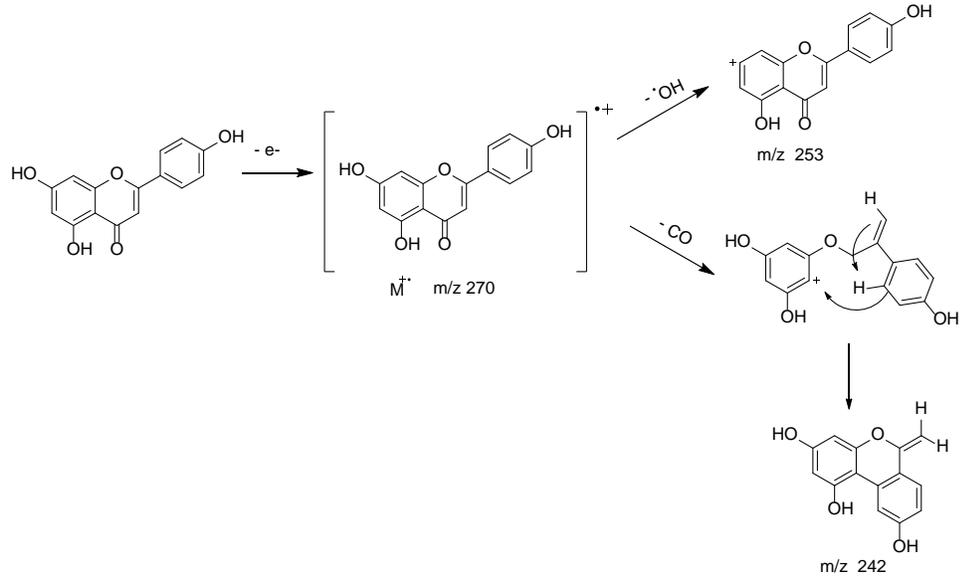
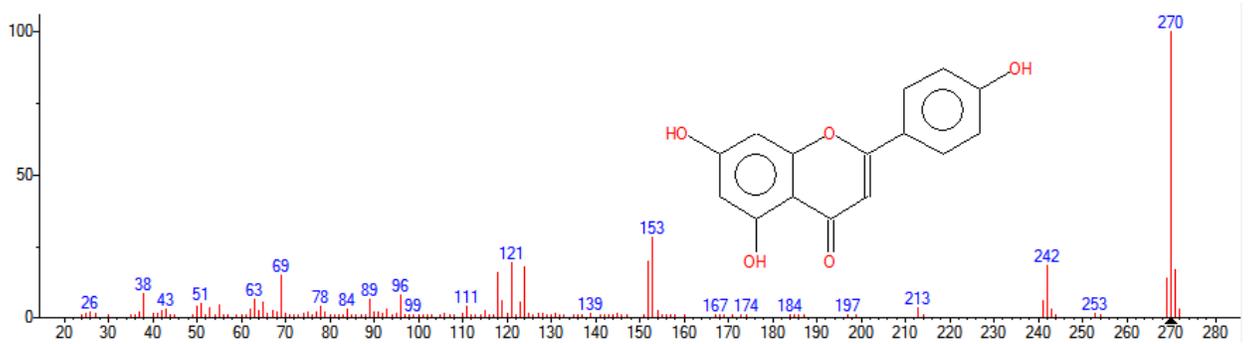


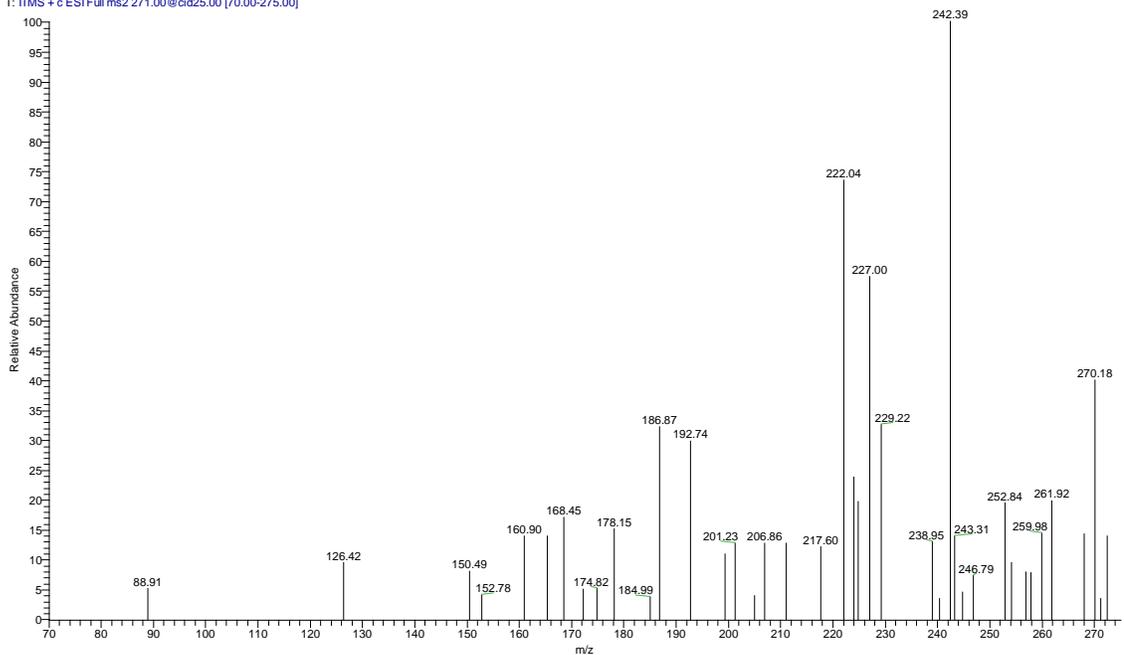
Figura 24. Fragmentos principales de la apigenina.

- Espectro Teórico



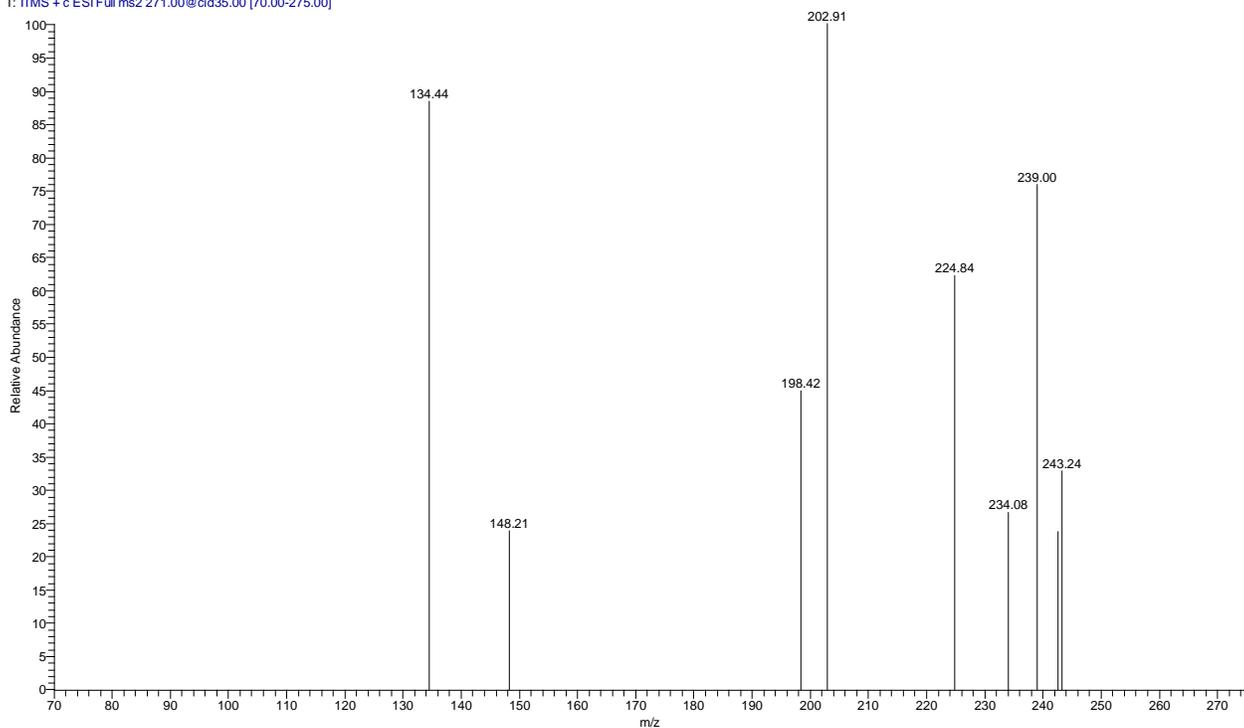
- Miel Santander

APIGENINA - MIEL SDER_180925095408 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 1.16E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 271.00@cid25.00 [70.00-275.00]



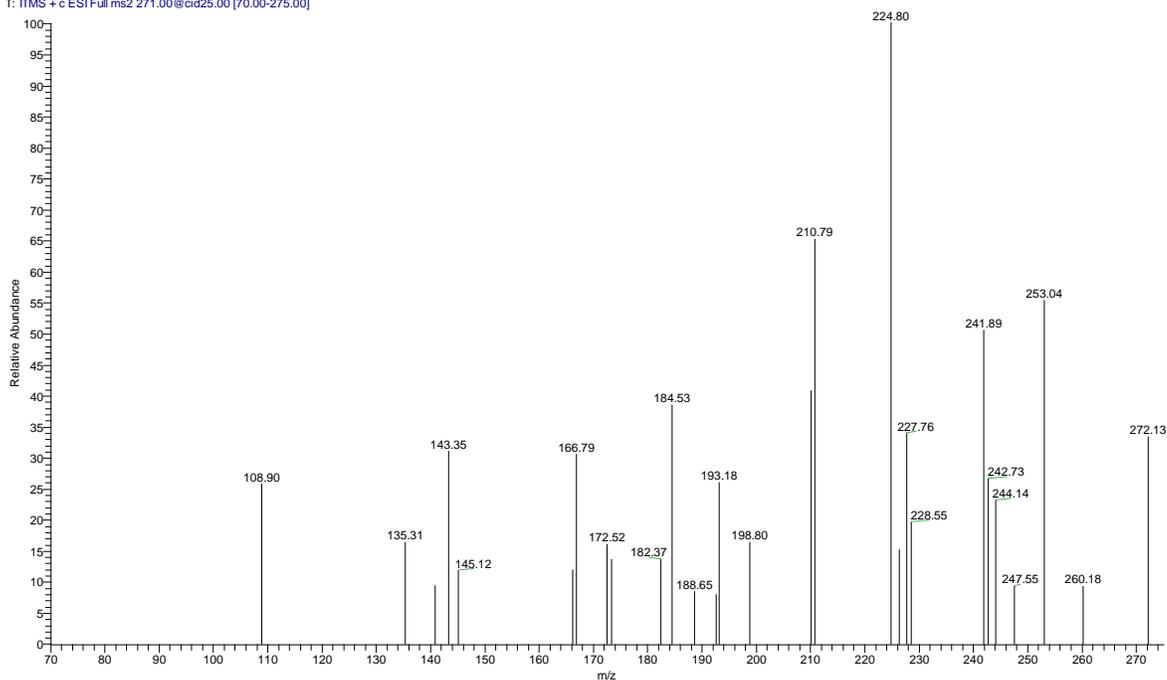
- Miel Tunía

APIGENINA - MIEL TUNIA_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.15
T: ITMS + c ESI Full ms2 271.00@cid35.00 [70.00-275.00]



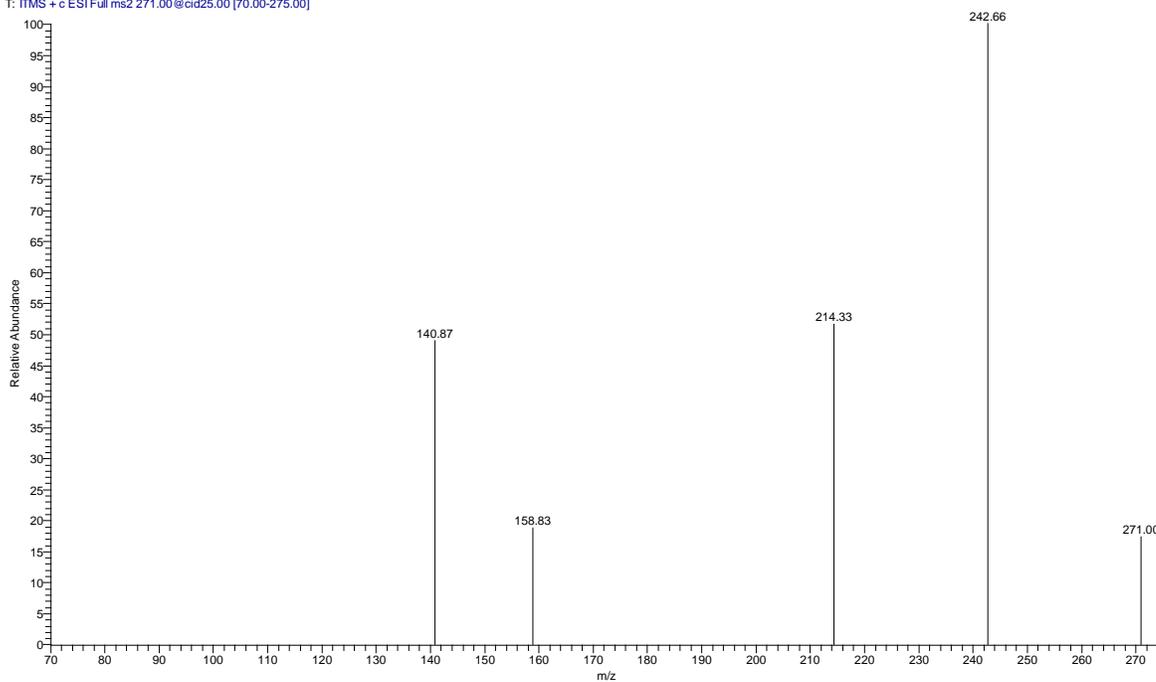
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

APIGENINA - PROP SDER_180925103639 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 3.59
T: ITMS + c ESI Full ms2 271.00@cid25.00 [70.00-275.00]



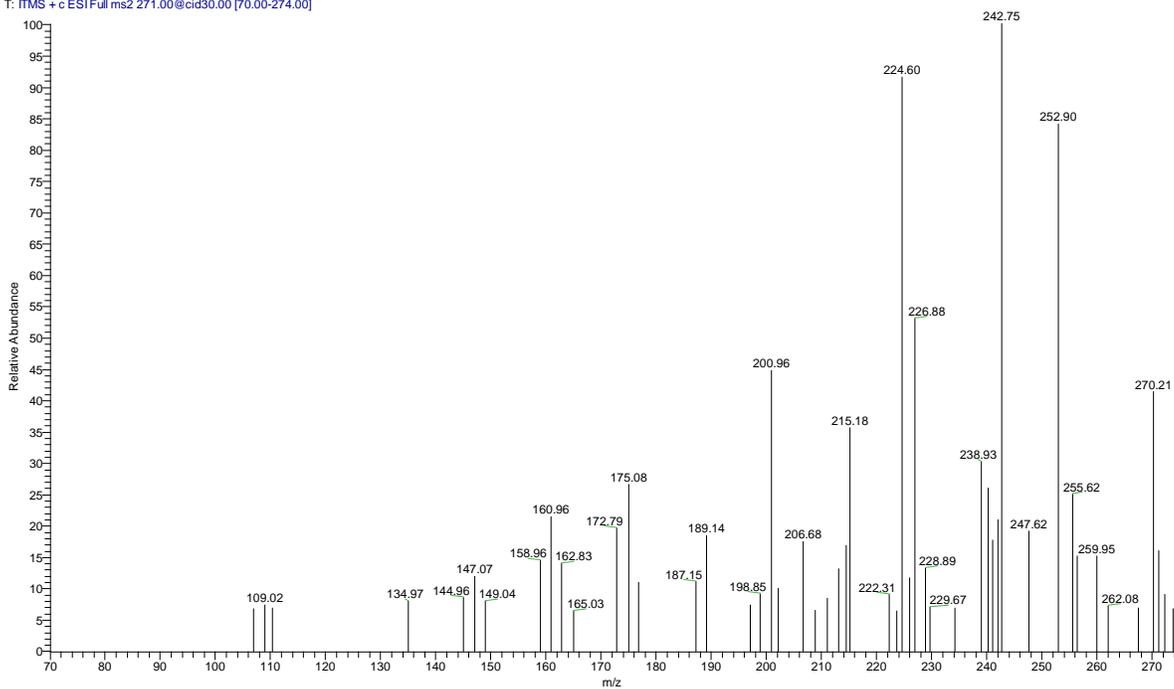
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

APIGENINA - PROP TUNIA_180925103639 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 1.57
T: ITMS + c ESI Full ms2 271.00@cid25.00 [70.00-275.00]



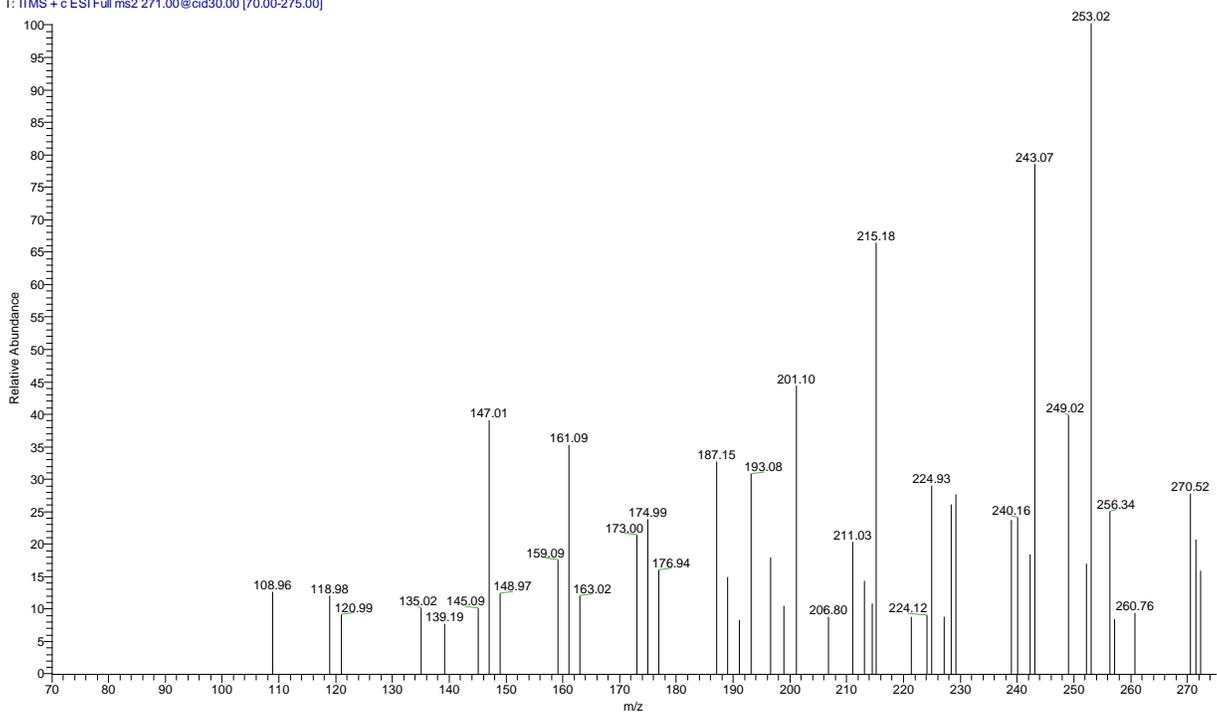
- Miel Propolizada Tunía

APIGENNA -mielpropluzia_180924164823 #12 RT: 0.29 AV: 1 NL: 4.75
T: ITMS + c ESI Full ms2 271.00@cid30.00 [70.00-274.00]



- Miel Propolizada Santander

APIGENNA-MIEL PROPSDER #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 3.83
T: ITMS + c ESI Full ms2 271.00@cid30.00 [70.00-275.00]



ISOHARMNETINA

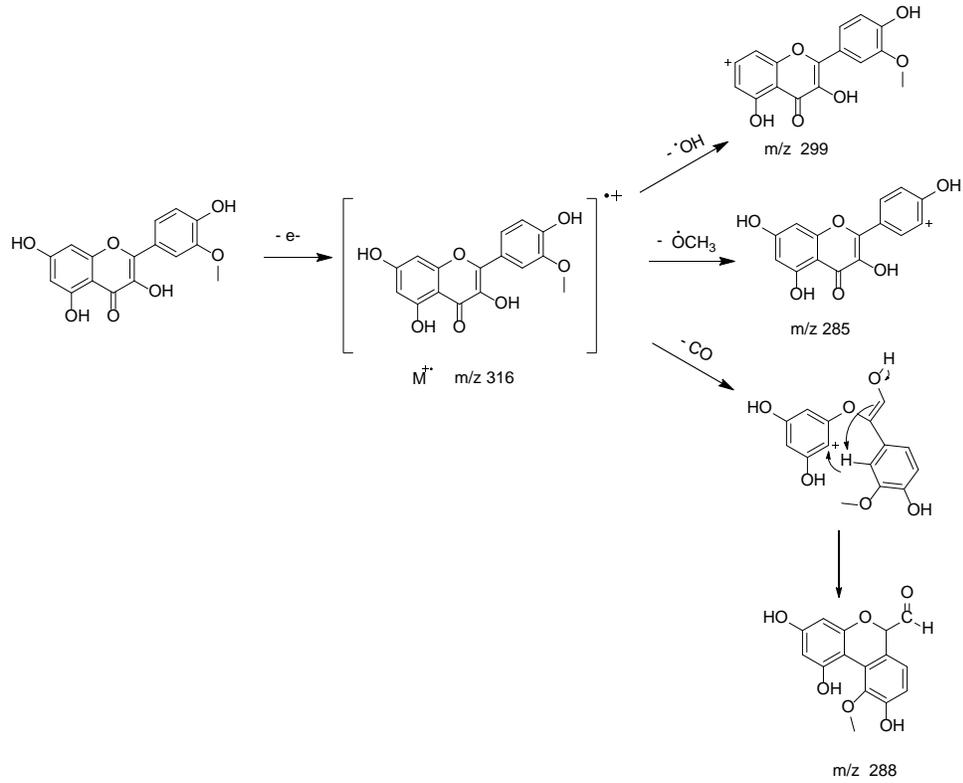
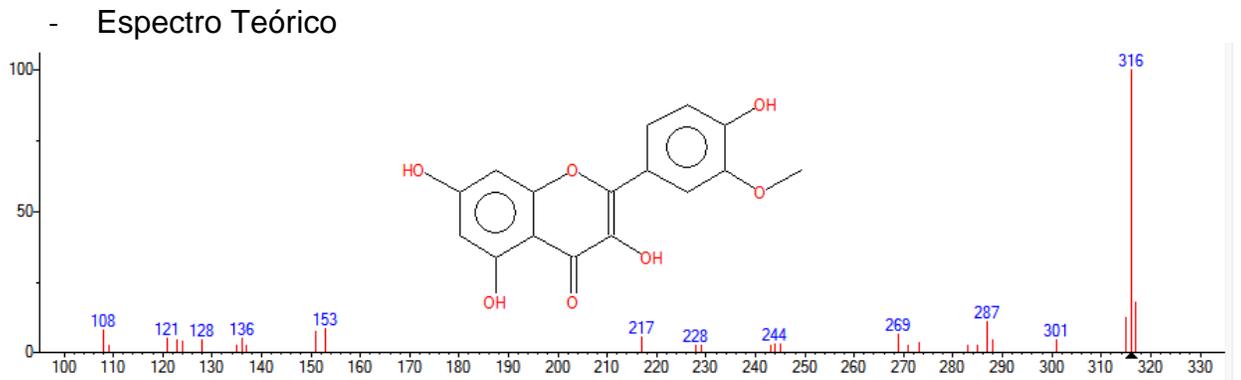
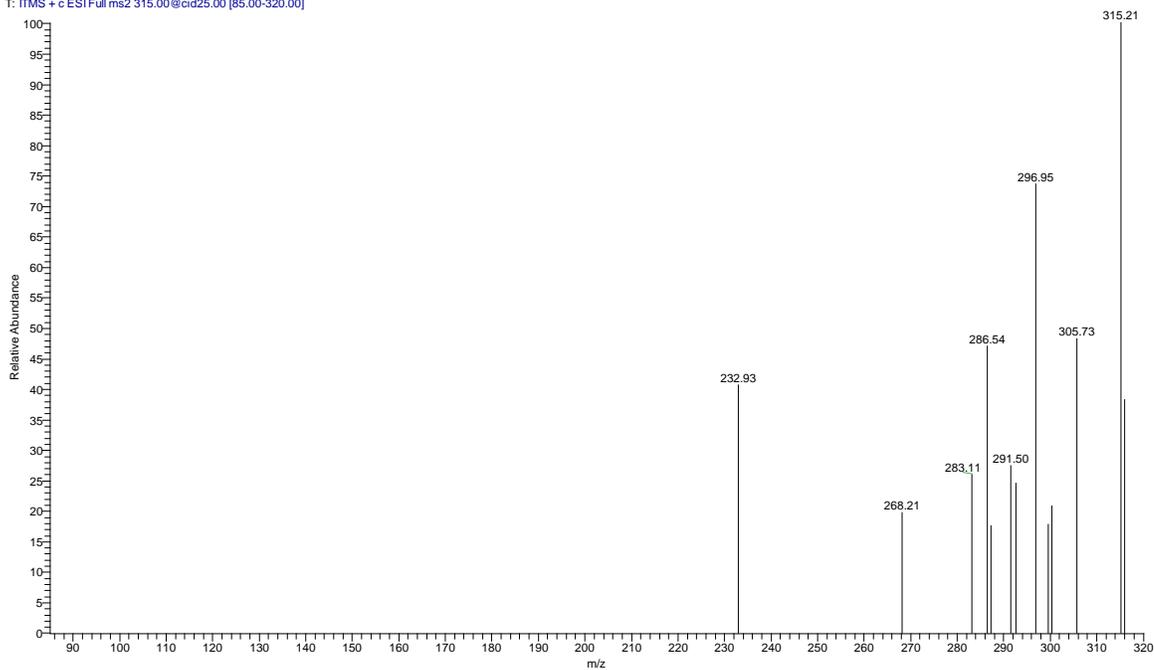


Figura 25. Fragmentos principales de la Isoharmnetina.



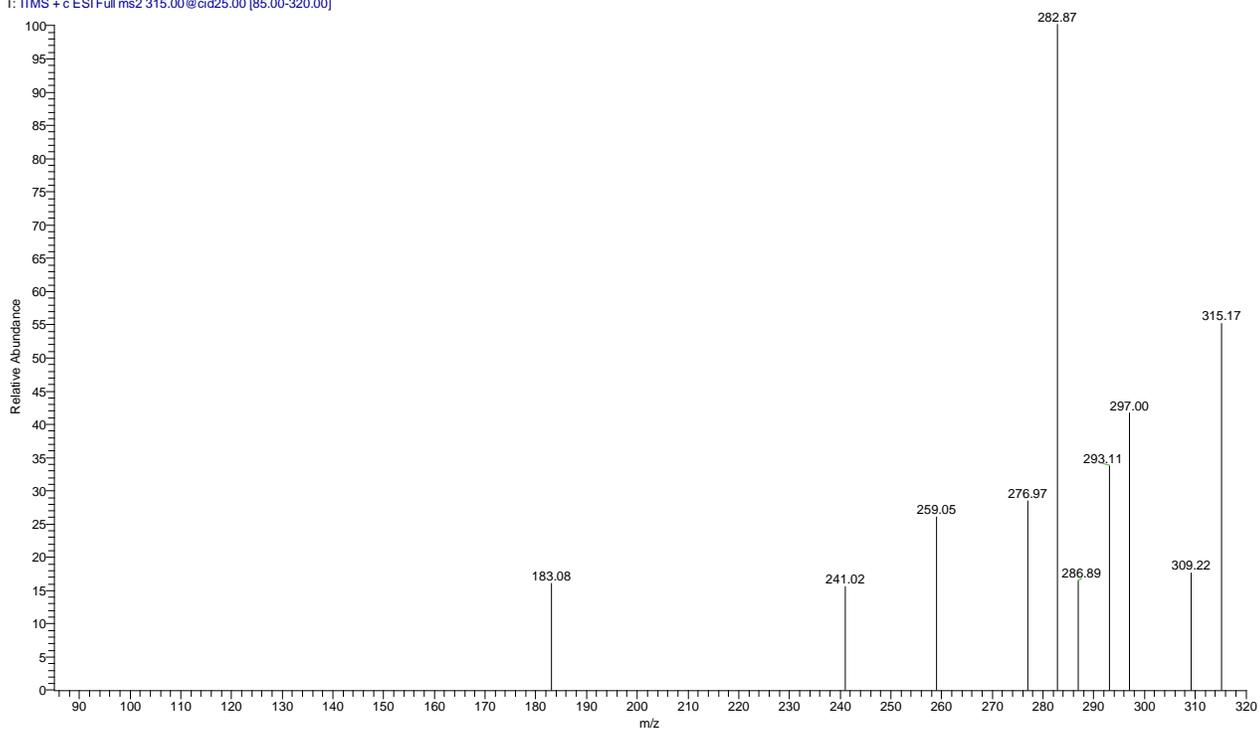
- Miel Propolizada Tunía

ISOHAMNETINA-mielproptunia_180924164823 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 1.70
T: ITMS + c ESI Full ms2 315.00@cid25.00 [85.00-320.00]



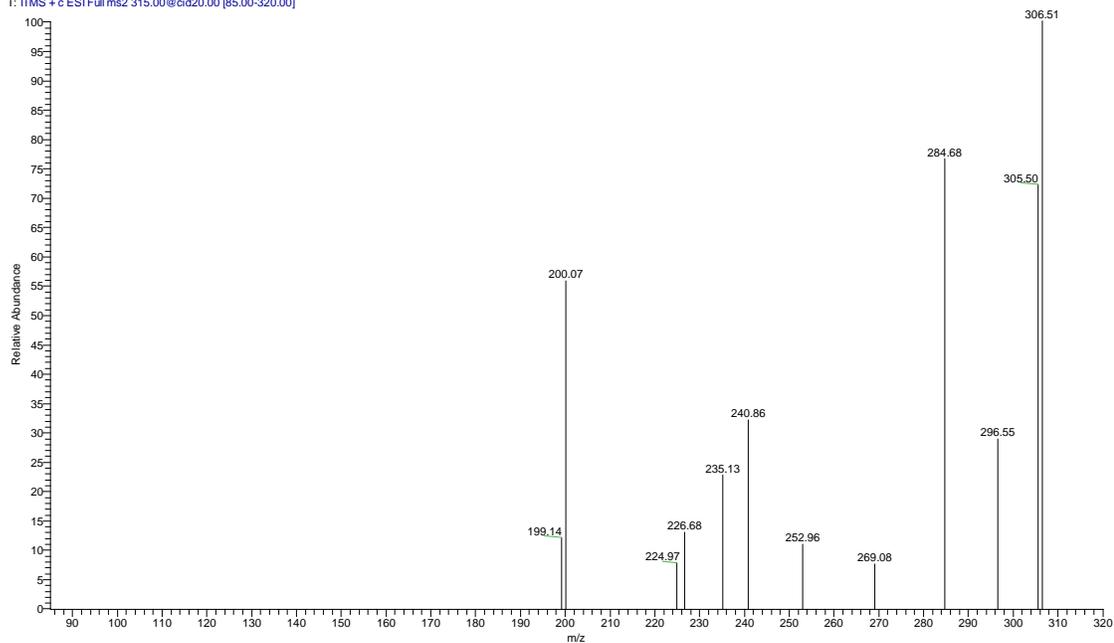
- Miel Propolizada Santander

ISOHAMNETINA-MIEL PROPSDER #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 1.94
T: ITMS + c ESI Full ms2 315.00@cid25.00 [85.00-320.00]



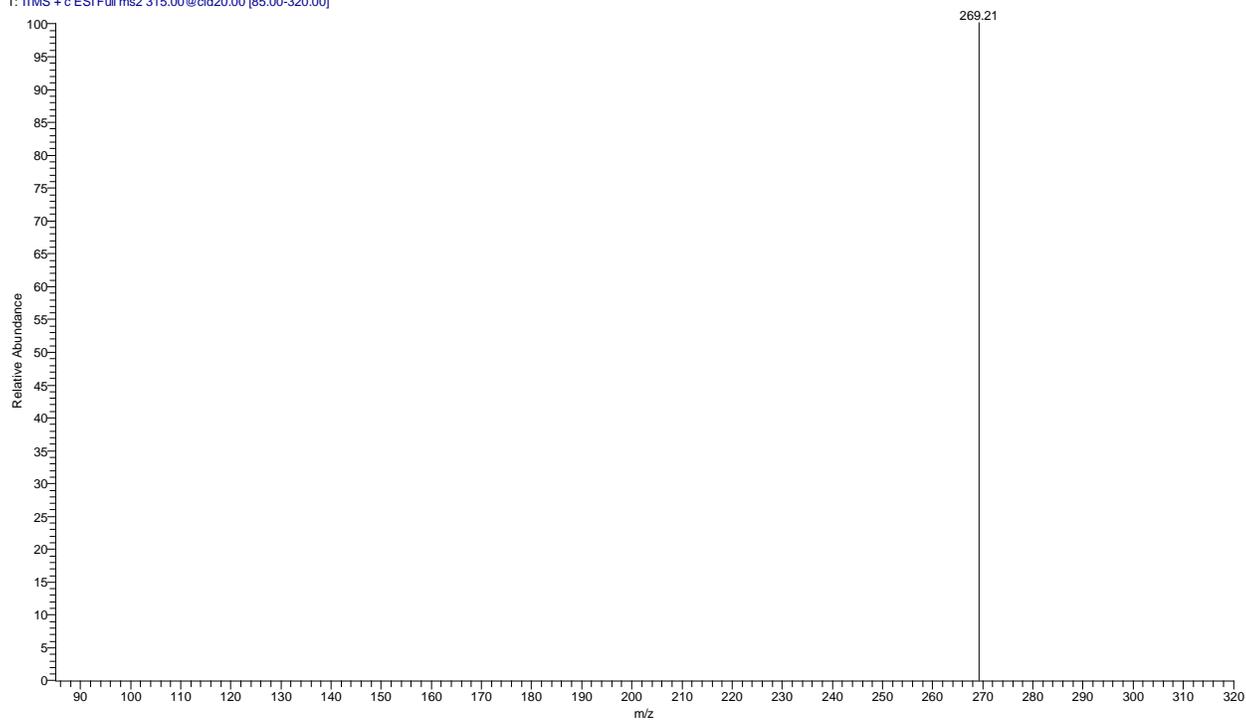
- Miel Santander

ISORHAMNETINA - MIEL SDER_180925095408 #12 RT: 0.30 AV: 1 NL: 6.52
T: ITMS + c ESI Full ms2 315.00@cid20.00 [85.00-320.00]



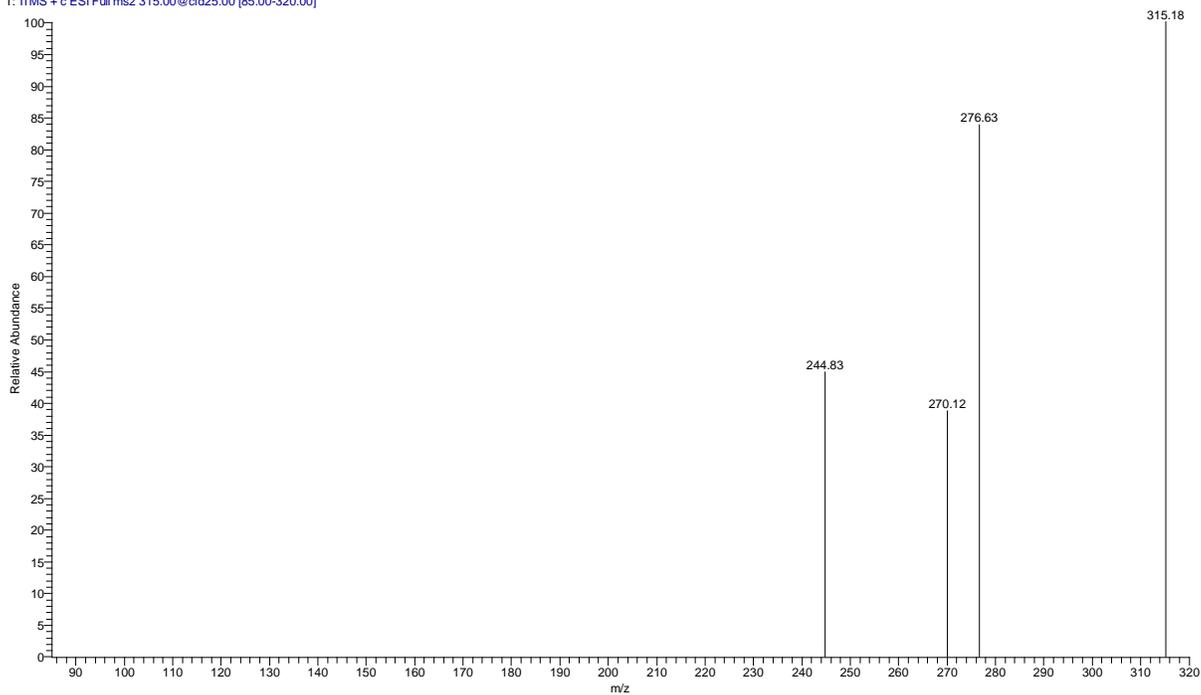
- Miel Tunía

ISORHAMNETINA - MIEL TUNIA_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 5.74E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 315.00@cid20.00 [85.00-320.00]



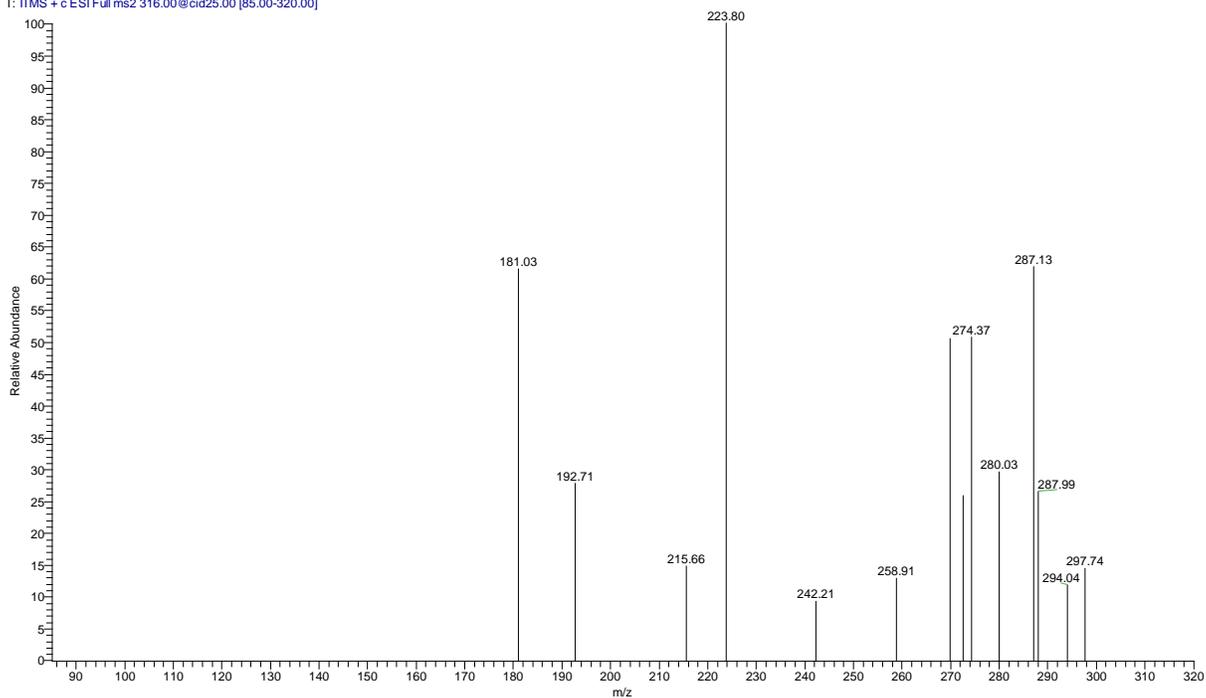
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

ISORHAMNETINA - PROP TUNIA_180925103639 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 6.55E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 315.00@cid25.00 [85.00-320.00]



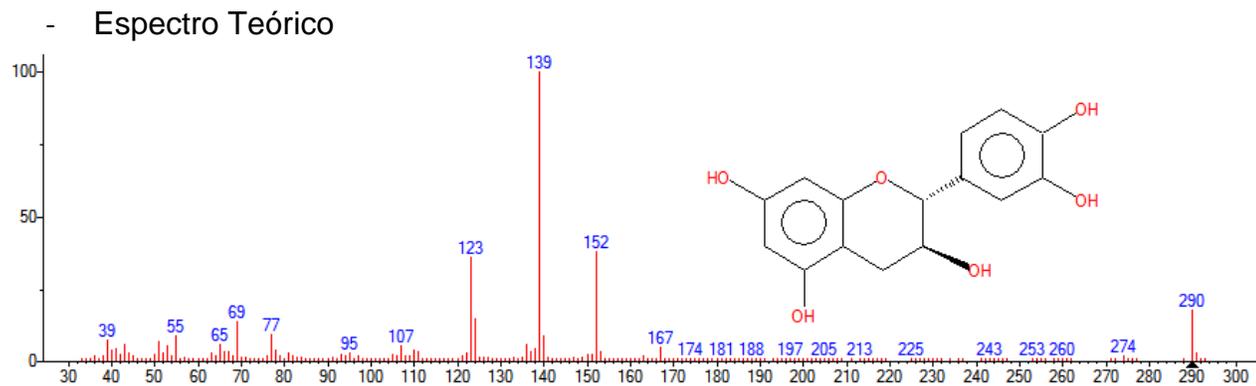
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

ISORHAMNETINA - PROP SDER_180925103639 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 4.39
T: ITMS + c ESI Full ms2 316.00@cid25.00 [85.00-320.00]

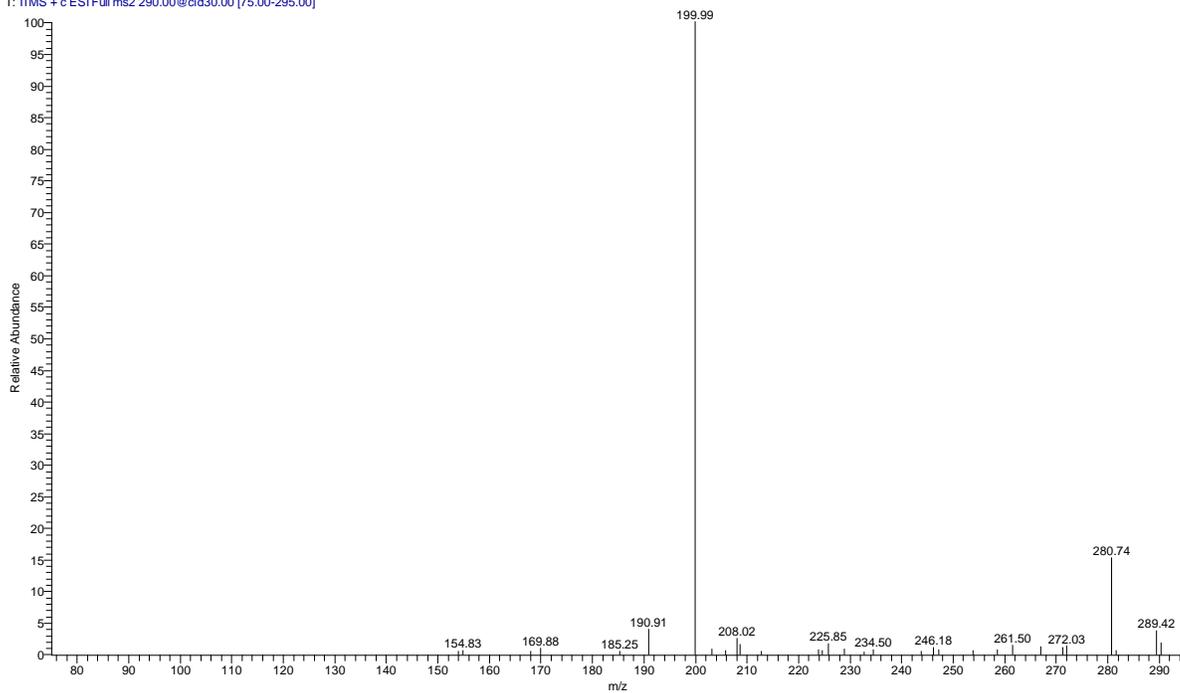


A continuación se muestran los espectros de masas obtenidos para catequina y crisina, siendo los flavonoides no encontrados en ninguna muestra.

CATEQUINA

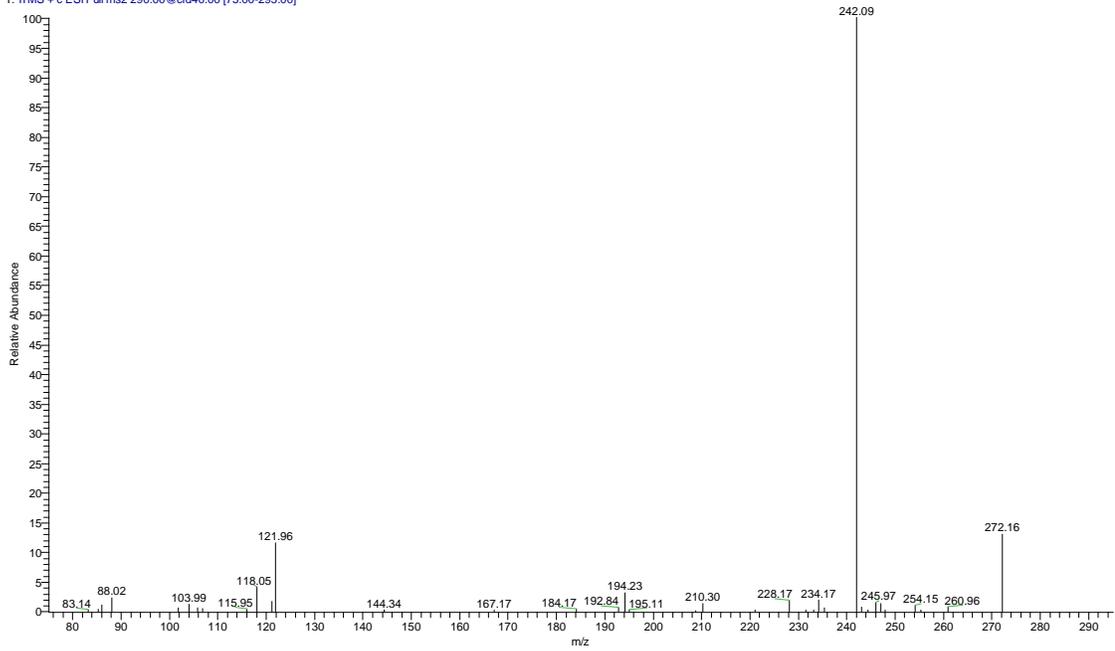


- Miel Santander
CATEQUINA - MIEL SDER_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 7.23E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 290.00@cid30.00 [75.00-295.00]



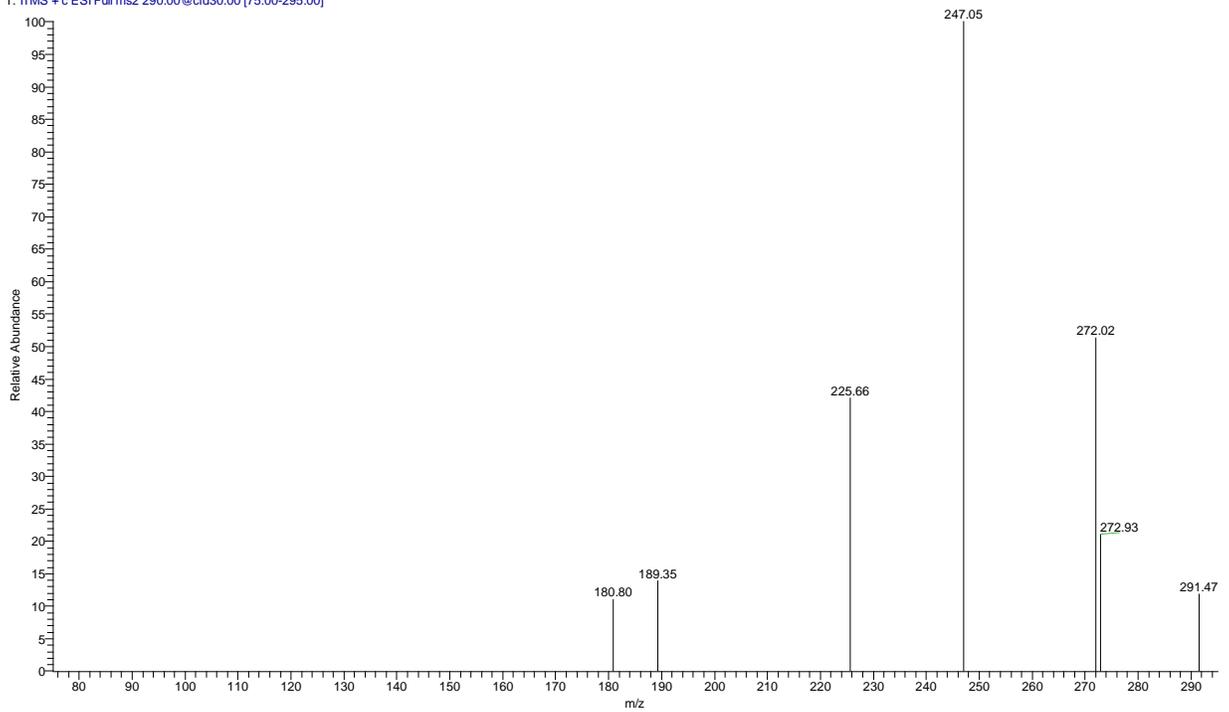
- Miel Tunía

CATEQUINA - MIEL TUNIA_180925085707 #25 RT: 0.29 AV: 1 NL: 7.42E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 290.00@cid40.00 [75.00-295.00]



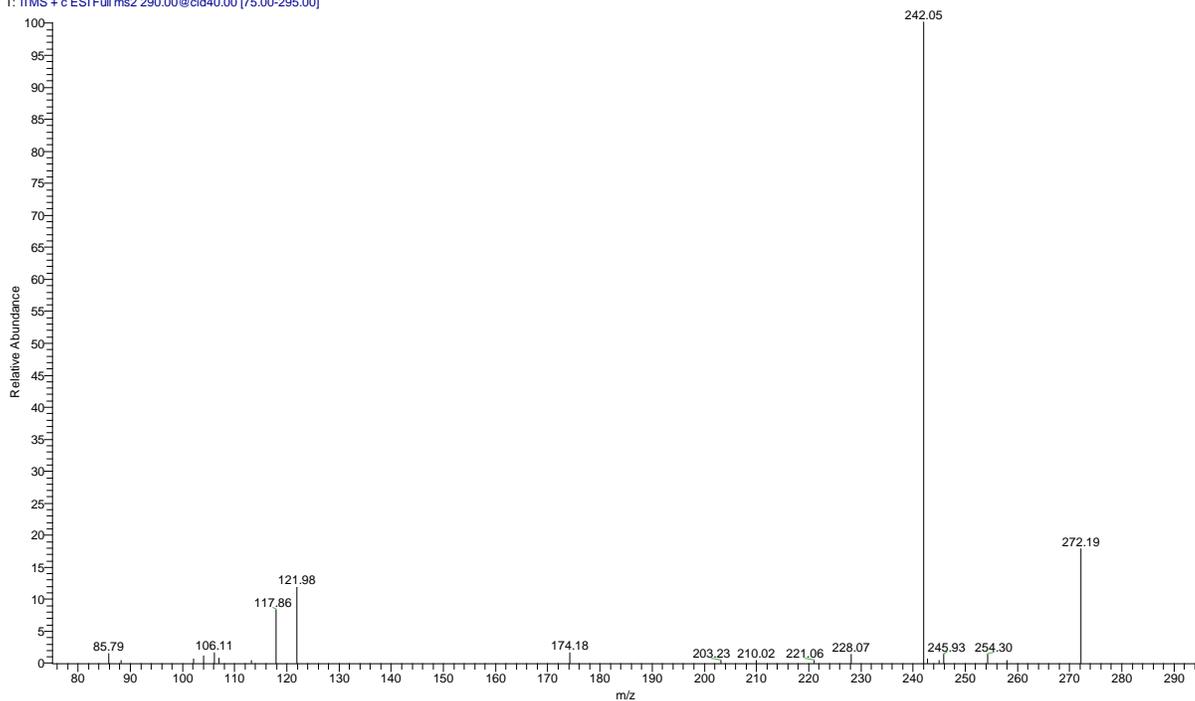
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

CATEQUINA - PROP SDER_180925095408 #12 RT: 0.29 AV: 1 NL: 2.36
T: ITMS + c ESI Full ms2 290.00@cid30.00 [75.00-295.00]



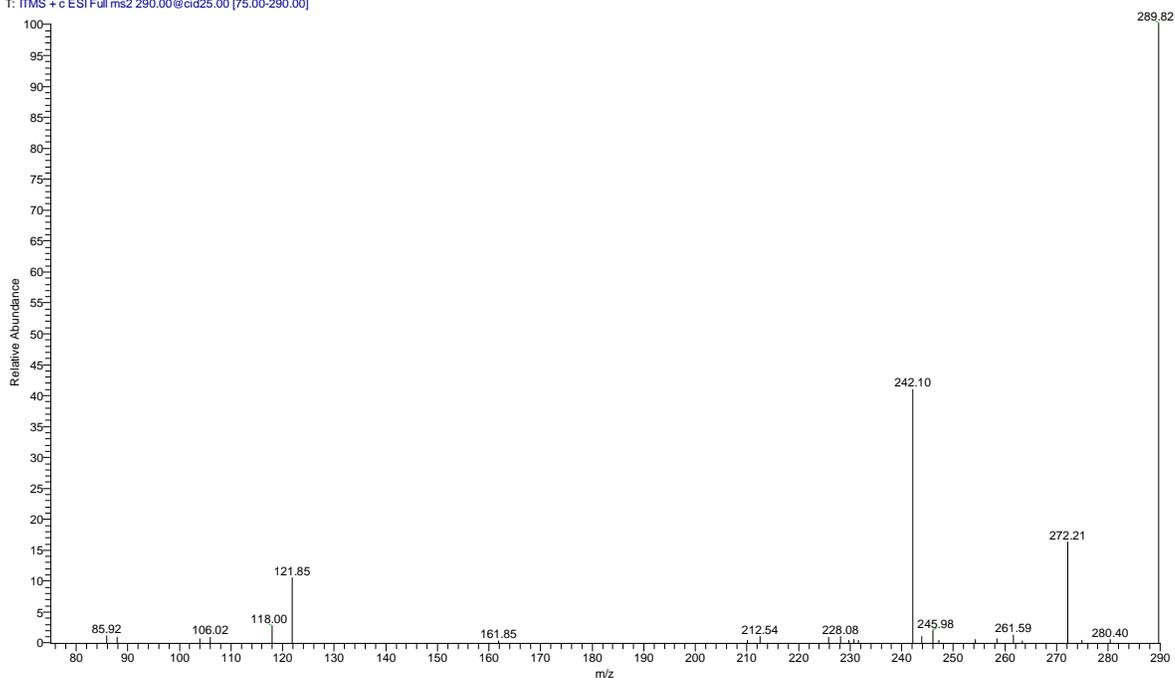
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

CATEQUINA - PROP TUNIA_180925103639 #23 RT: 0.30 AV: 1 NL: 6.19E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 290.00@cid40.00 [75.00-295.00]



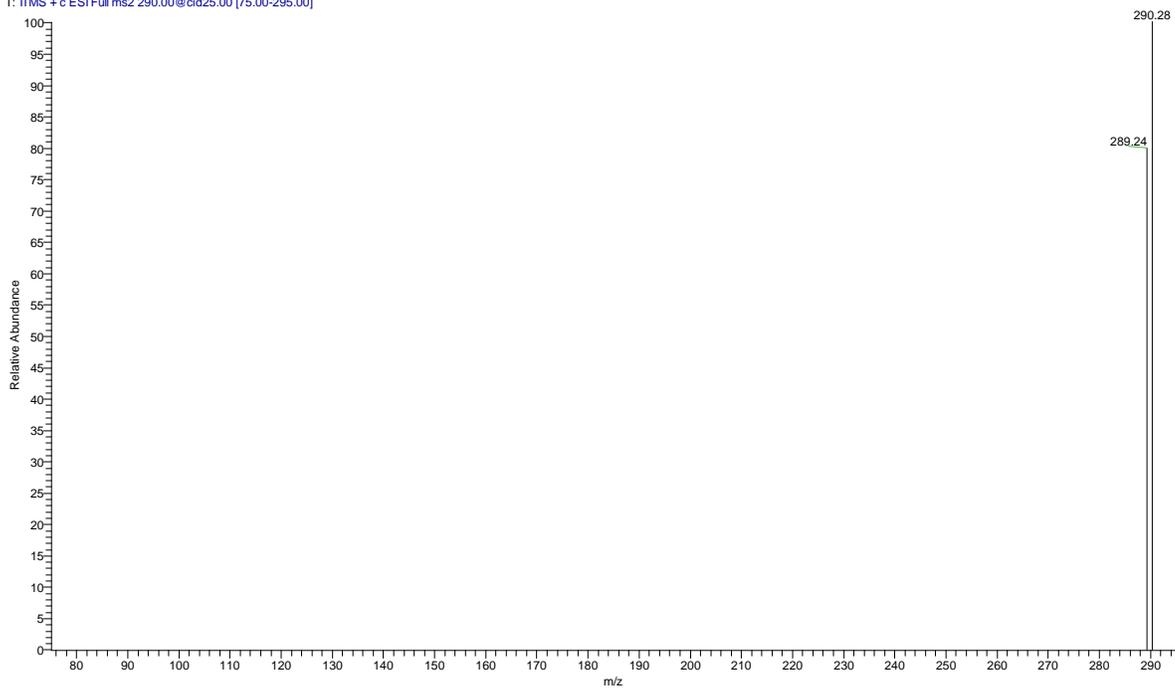
- Miel Propolizada Tunía

CATEQUINA - mielproptunia_180924162821 #22 RT: 0.29 AV: 1 NL: 5.79E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 290.00@cid25.00 [75.00-290.00]



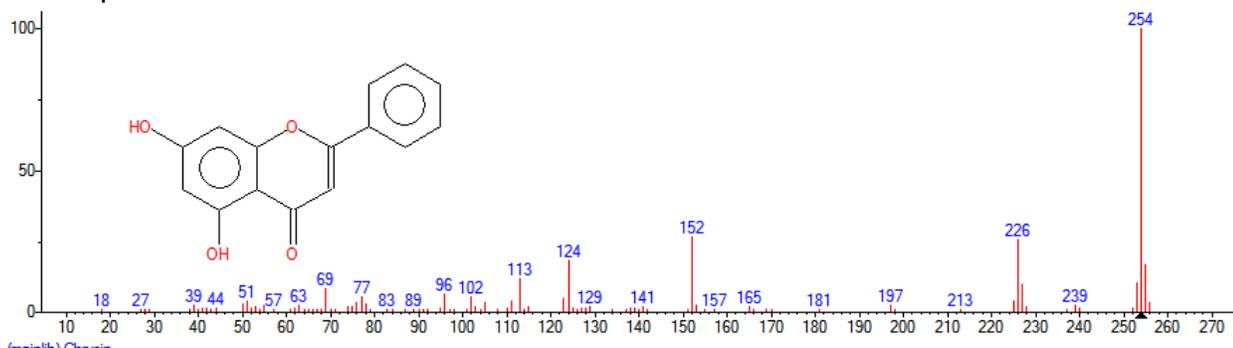
- Miel Propolizada Santander

CATEQUINA-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 4.13
T: FTMS + c ESI Full ms2 290.00@cid25.00 [75.00-295.00]



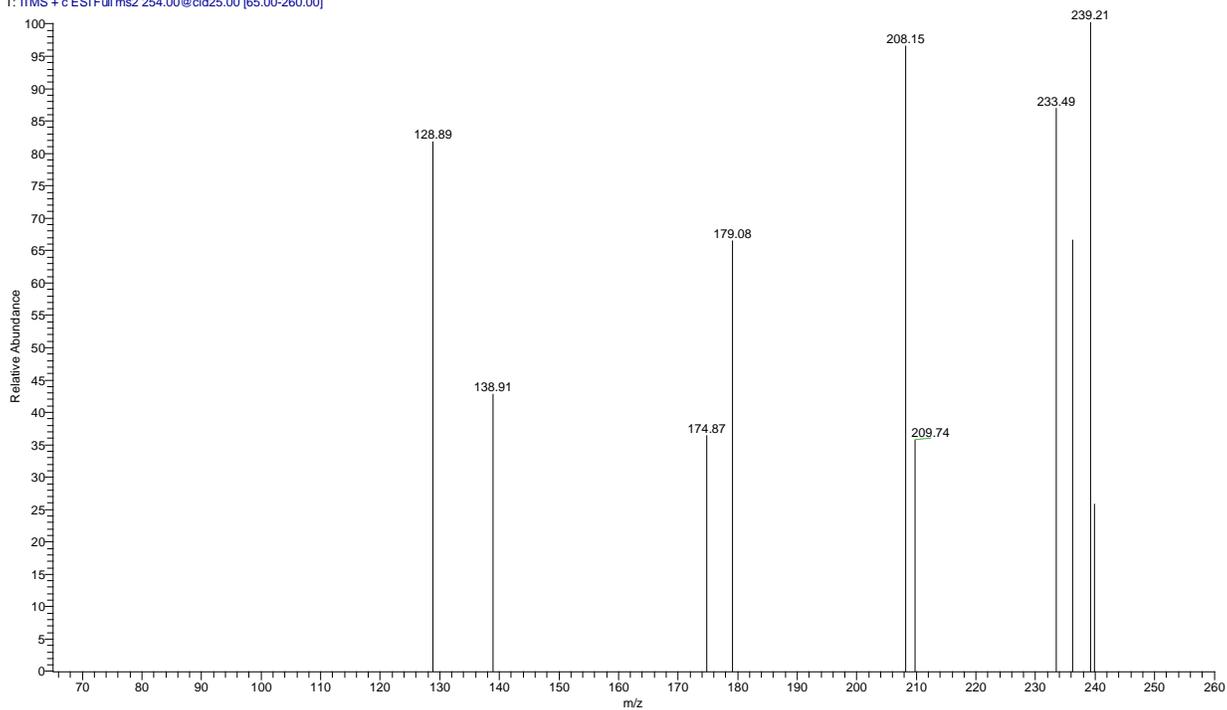
CRISINA

- Espectro Teórico



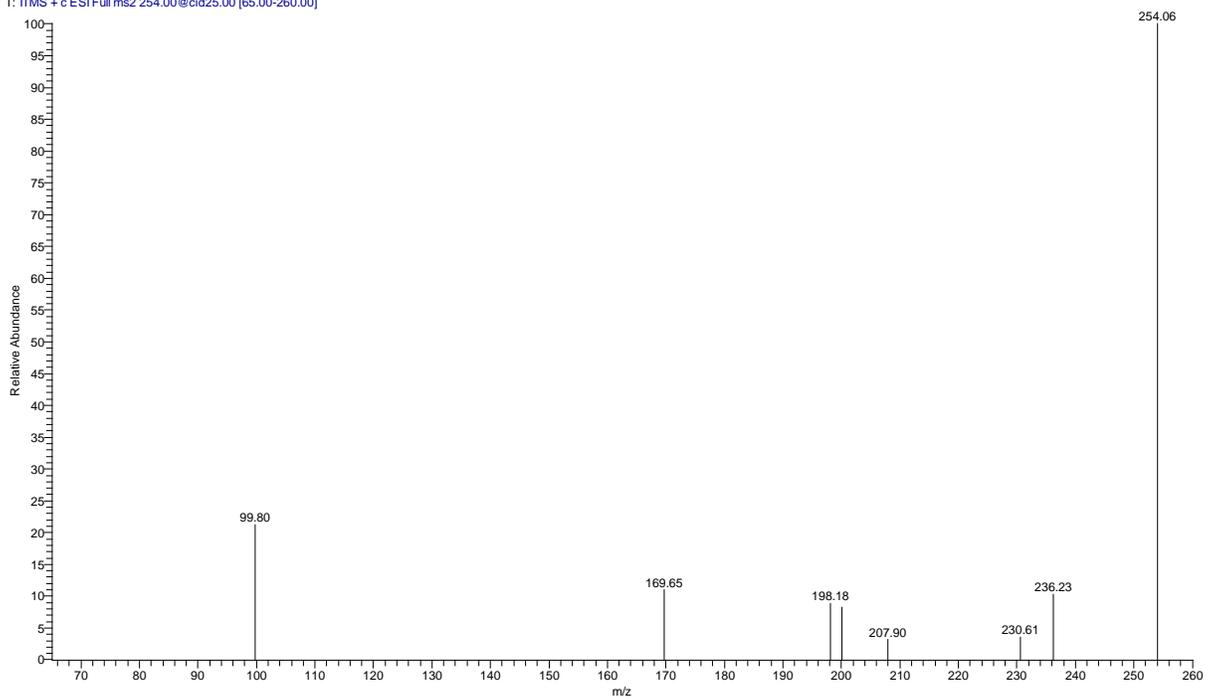
- Miel Santander

CRISNA - MIEL SDER_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 9.93E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 254.00@cid25.00 [65.00-260.00]



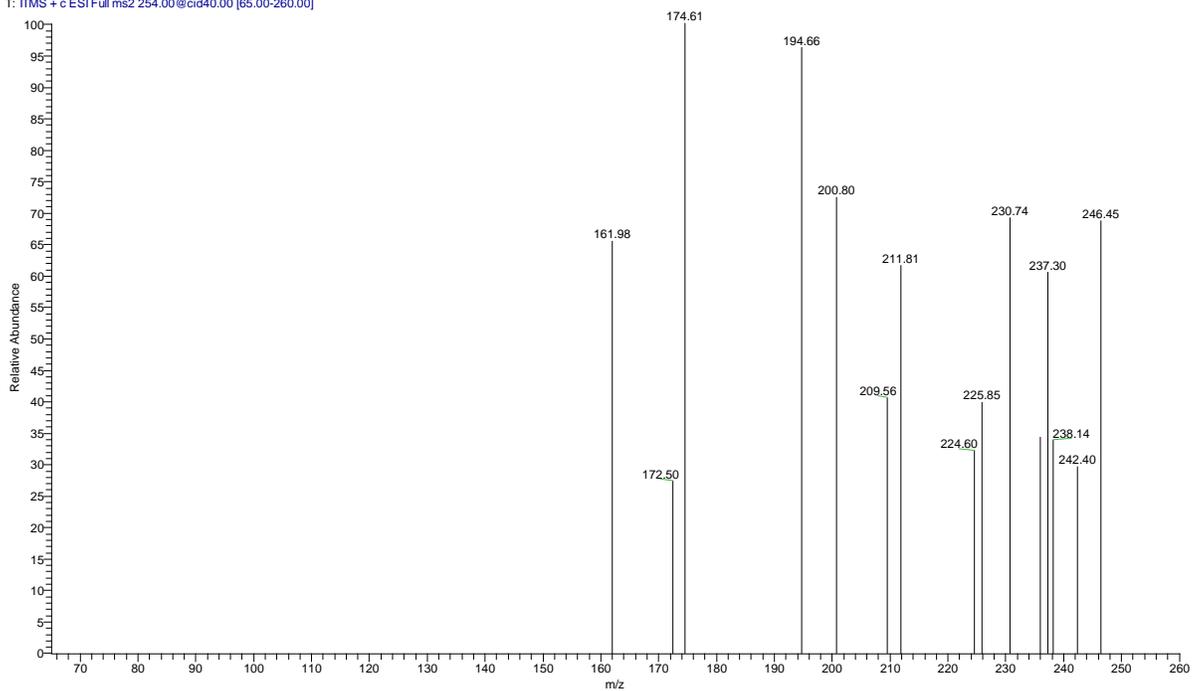
- Miel Tunía

CRISNA - MIEL TUNIA_180925085707 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.06E1
T: ITMS + c ESI Full ms2 254.00@cid25.00 [65.00-260.00]



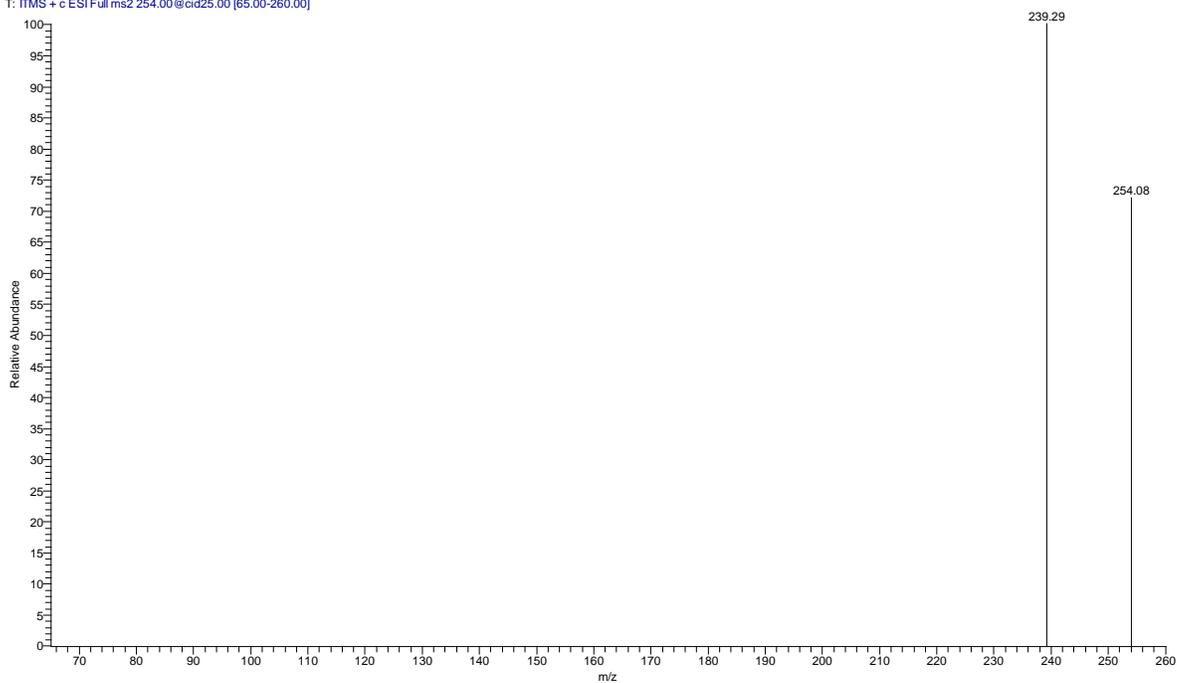
- Extracto Etanólico de Propóleo Santander

CRISNA - PROP SDER_180925095408 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 9.45E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 254.00 @cid40.00 [65.00-260.00]



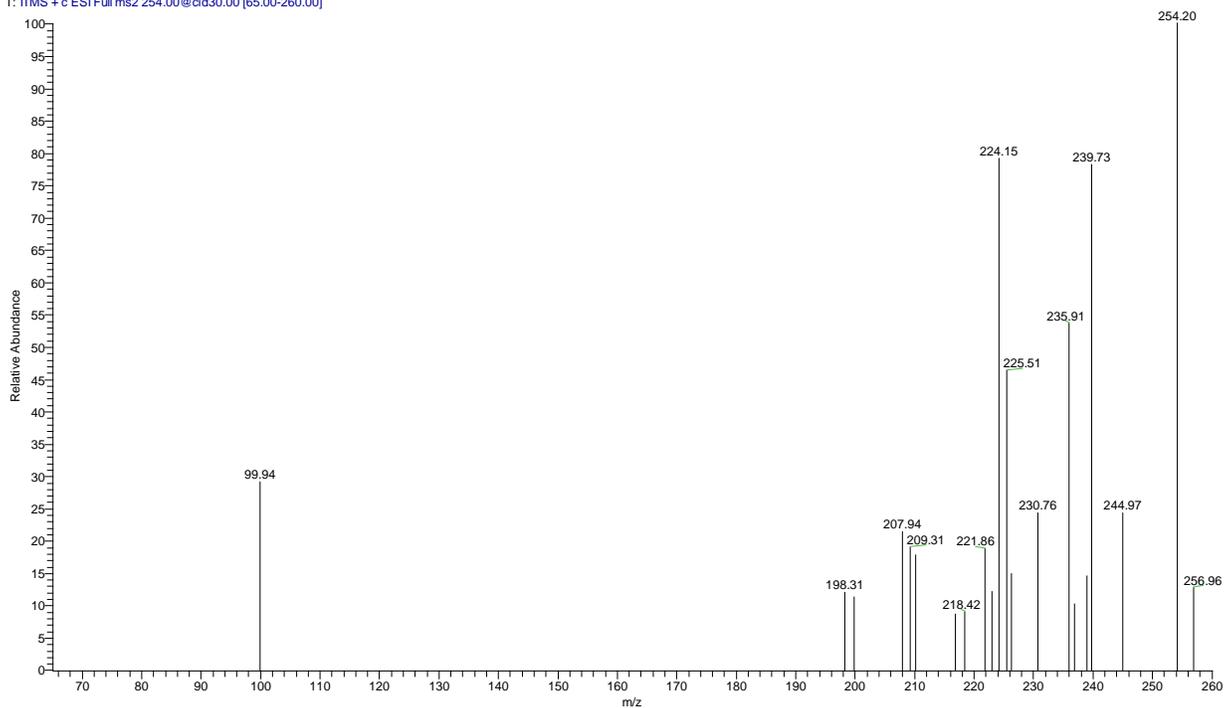
- Extracto Etanólico de Propóleo Tunía

CRISNA - PROP TUNIA_180925103639 #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 5.94E-1
T: ITMS + c ESI Full ms2 254.00 @cid25.00 [65.00-260.00]



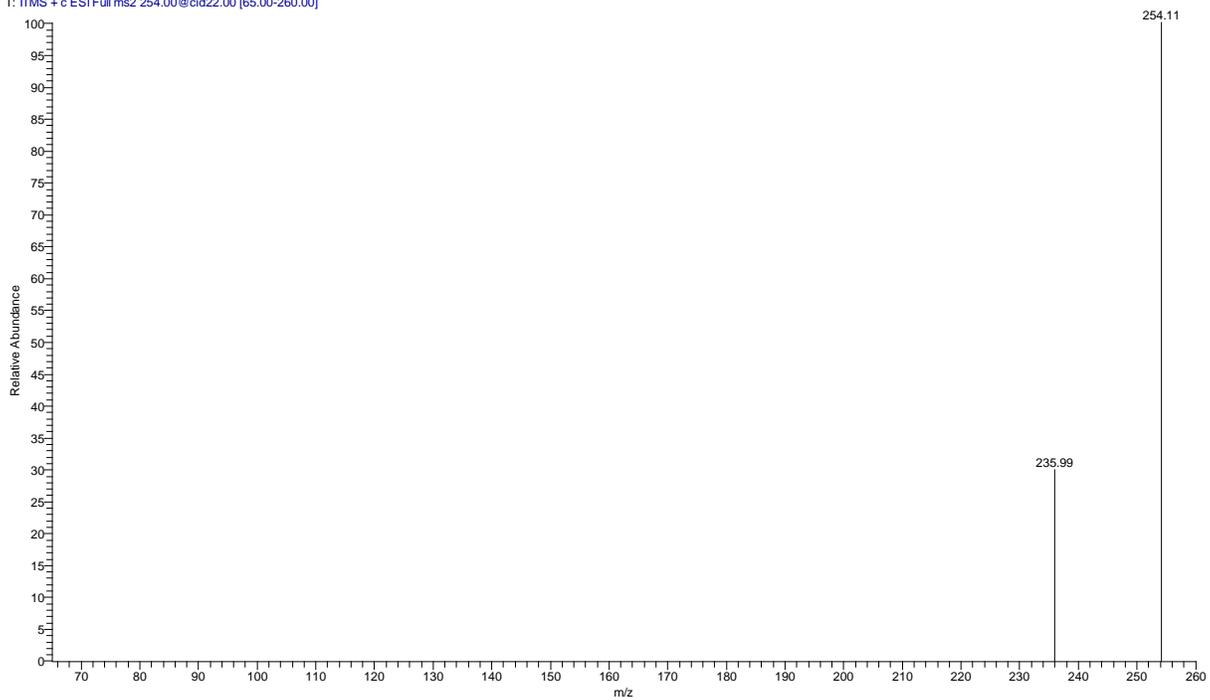
- Miel Propolizada Tunía

CRISNA -mielproptunia_180924162821 #12 RT: 0.31 AV: 1 NL: 3.31
T: ITMS + c ESI Full ms2 254.00@cid30.00 [65.00-260.00]



- Miel Propolizada Santander

CRISNA-MIEL PROPSDER #11 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.34
T: ITMS + c ESI Full ms2 254.00@cid22.00 [65.00-260.00]



10.4 CURVAS DE CALIBRACIÓN

10.4.1 Fenoles totales

Tabla 30. Resultados para la curva de calibración de ácido gálico.

Concentración	Absorbancia	Concentración promedio	Absorbancia promedio	Coefficiente de variación (%CV)
10	0,063			
10	0,070	10	0,067±0,004	5,69
10	0,069			
25	0,212			
25	0,205	25	0,206±0,005	2,49
25	0,202			
35	0,296			
35	0,273	35	0,285±0,013	4,48
35	0,294			
45	0,371			
45	0,374	45	0,367±0,009	2,47
45	0,357			
55	0,458			
55	0,453	55	0,456±0,003	0,63
55	0,458			

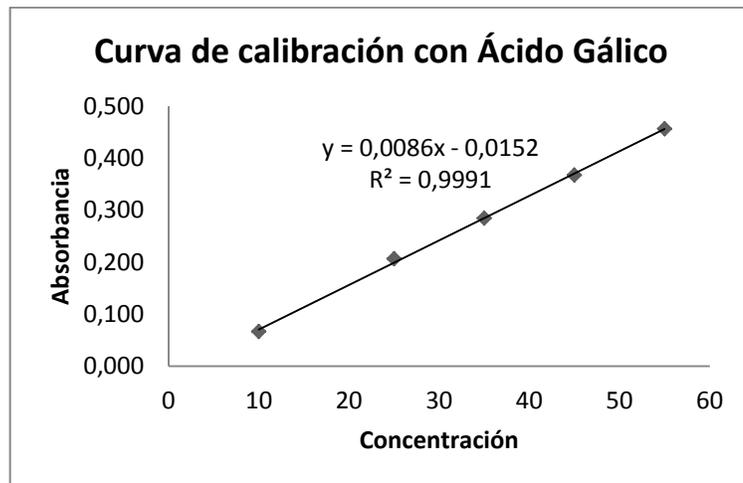


Figura 26. Curva de calibración con ácido gálico.

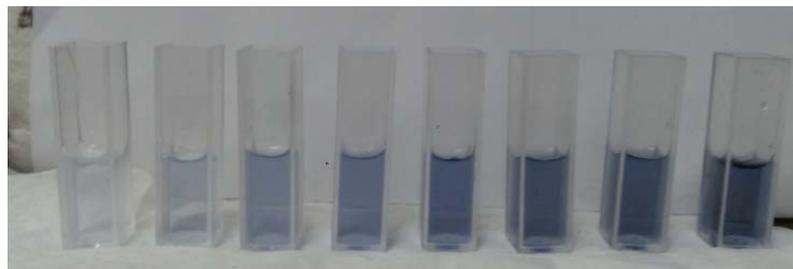


Figura 27. Imagen obtenida de la curva de calibración con ácido gálico.

10.4.2 Flavonoides totales

Tabla 31. Resultados para la curva de calibración con catequina.

Concentración	Absorbancia	Concentración promedio	Absorbancia promedio	Coefficiente de variación (%CV)
5,0	0,009	5,0	0,010±0,001	10,00
5,0	0,01			
5,0	0,011			
10	0,027	10	0,026±0,002	5,95
10	0,024			
10	0,026			
25	0,061	25		4,10

25	0,059		0,061±0,003	
25	0,064			
50	0,125			
50	0,140	50	0,129±0,010	7,48
50	0,122			
100	0,255			
100	0,256	100	0,258±0,004	1,47
100	0,262			
200	0,493			
200	0,499	200	0,493±0,007	1,32
200	0,486			

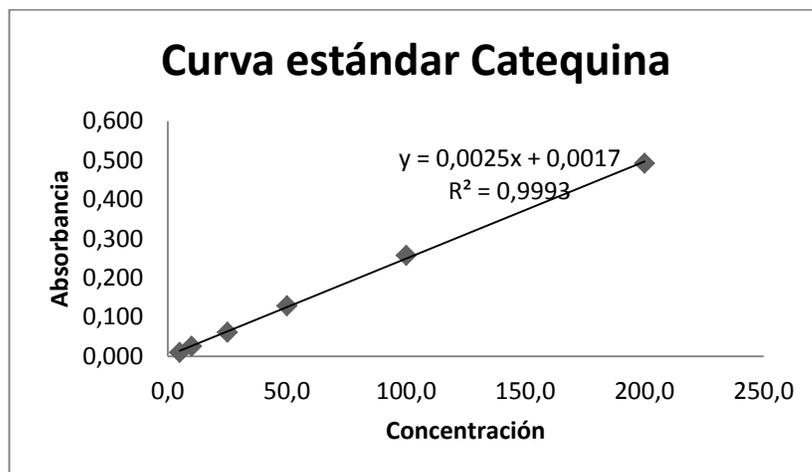


Figura 28. Curva de calibración con catequina.



Figura 29. Imagen obtenida para la curva de calibración con catequina.

10.4.3 Actividad antioxidante por DPPH

Tabla 32. Curvas de calibración para la actividad antioxidante en la miel de Tunía.

Concentración	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Control	Control prom.	Inh. 1	Inh. 2	Inh. 3
20000	0,474	0,480	0,473			0,130	0,119	0,132
50000	0,431	0,431	0,439			0,209	0,209	0,194
75000	0,399	0,403	0,418			0,267	0,260	0,233
100000	0,374	0,370	0,383	0,547		0,313	0,321	0,297
125000	0,347	0,349	0,359	0,542	0,545	0,363	0,359	0,341
150000	0,328	0,324	0,325	0,545		0,398	0,405	0,403
200000	0,271	0,271	0,265			0,502	0,502	0,513
225000	0,245	0,248	0,236			0,550	0,545	0,567

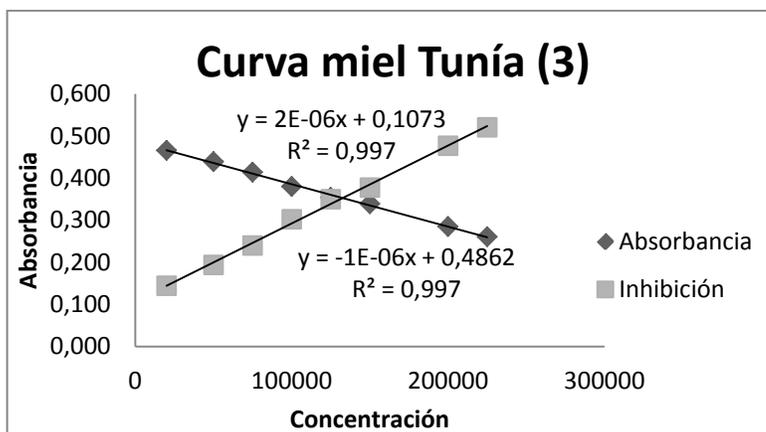


Figura 30. Curva de absorbancia e inhibición para la miel Tunía (3).



Figura 31. Imagen obtenida para la inhibición del radical DPPH en la muestra de miel de Tunía.

10.4.4 Actividad antioxidante por ABTS

Tabla 33. Curvas de calibración para la actividad antioxidante en miel de Tunía.

Concentración	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Control	Control promedio	Inh. 1	Inh. 2	Inh. 3
50000	0,453	0,451	0,457			0,326	0,329	0,320
100000	0,392	0,402	0,399			0,416	0,401	0,406
200000	0,307	0,304	0,309	0,671		0,543	0,547	0,540
300000	0,220	0,217	0,222	0,671	0,672	0,672	0,677	0,669
400000	0,133	0,139	0,138	0,673		0,802	0,793	0,795
500000	0,050	0,047	0,043			0,926	0,930	0,936

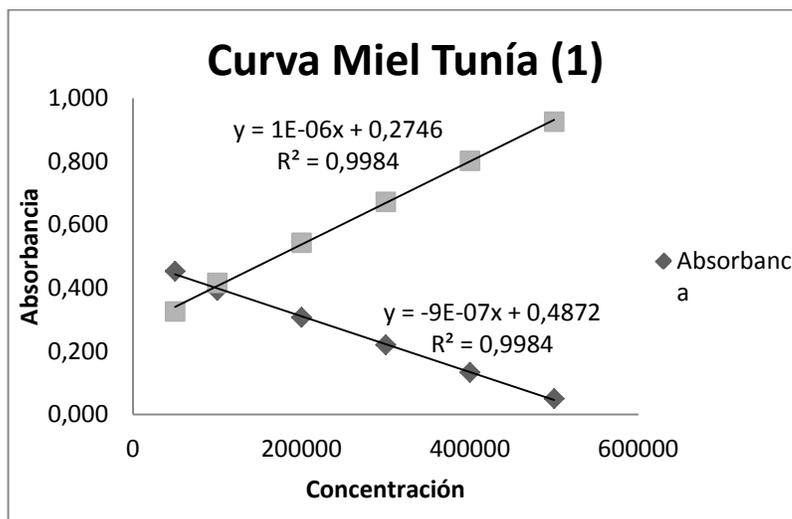


Figura 32. Curva de absorbancia e inhibición para la miel Tunía (1).



Figura 33. Imagen obtenida para la inhibición del radical ABTS en la muestra de miel de Tunía.