



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ZAMORA**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE LA MIEL Y SU POTENCIAL  
COMO CONSERVANTE NATURAL**

**TITULACIÓN: GRADO INGENIERÍA AGROALIMENTARIA**

**ALUMNO: DAVID MARTÍN GARRETAS**

**TUTORA: ANA MARÍA GONZÁLEZ PARAMAS**

**DEPARTAMENTO: QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**ÁREA: NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**FECHA DE ADJUDICACIÓN: OCTUBRE 2013**

**FECHA DE PRESENTACIÓN: FEBRERO 2015**



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mis más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a que este trabajo sea posible, porque sin ellos nunca lo hubiera conseguido.

En primer lugar agradecer a la universidad de Salamanca por darme la oportunidad de realizar este estudio tan innovador.

Al área de nutrición y Bromatología de la escuela politécnica superior de Zamora, y en especial a la Dra. D<sup>a</sup> Ana María González Paramas por ser una gran profesora y dirigir este proyecto, ya que, sin su dedicación no hubiera sido posible.

A D<sup>a</sup> Marisol, la encargada del laboratorio que, siempre estaba disponible para facilitarme el acceso al laboratorio y ayudarme en cualquier problema que surgiera.

Al grupo de investigación del Dr. José Sánchez de la Universidad de Salamanca por facilitarme amablemente las muestras de las mieles.

A mis padres y hermanos.

A mis amigos.

A mis compañeros de viaje durante estos años.

..... A todos muchas gracias

# ÍNDICE

<b>I OBJETIVO.....</b>	<b>4</b>
<b>II INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1. La miel.....	8
1.1 Definición .....	8
1.2 Legislación.....	9
1.2.1 Disposiciones comunitarias de directa aplicación.....	9
1.2.2 Disposiciones nacionales: .....	9
1.3 Clasificación de la miel.....	9
1.4 Composición química de la miel .....	11
1.5 Compuestos fenólicos de la miel .....	13
1.6 Propiedades físicas de la miel.....	14
1.6.1 pH.....	14
1.6.2 Actividad de agua ( $a_w$ ) .....	15
1.6.3 Conductividad eléctrica.....	15
1.6.4 sólidos insolubles y sólidos totales.....	16
1.6.5 Color.....	16
1.7 Propiedades bioactivas de la miel.....	16
1.7.1 Propiedades bactericidas .....	16
1.7.2 Propiedades antioxidantes .....	17
1.8 Propiedades nutritivas de la miel .....	18
2. Antioxidantes.....	20
2.1 concepto .....	20
2.2 Clasificación .....	22
2.2.1 Según su mecanismo de acción.....	22
2.2.2 Según su naturaleza.....	24
2.3 Técnicas para la determinación de la capacidad antioxidante .....	25
2.3.1 Ensayos basados en métodos químicos.....	25
2.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante a nivel celular .....	28
2.4 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos .....	29
3. Pardeamiento enzimático.....	31

3.1 concepto .....	31
3.2 sustratos del pardeamiento enzimático .....	32
3.3 Sistemas enzimáticos responsables .....	33
3.4 Mecanismo de reacción .....	34
3.5 Factores que condicionan el proceso del pardeamiento.....	36
3.6 Control del pardeamiento enzimático .....	37
3.6.1 Métodos físicos .....	38
3.6.2 Métodos químicos .....	42
3.6.3 Métodos enzimáticos.....	44
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4. Materiales utilizados.....	46
4.1 Laboratorio.....	46
4.2 Reactivos.....	47
5 Materias primas .....	48
5.1 Miel.....	48
5.2 Manzanas .....	50
6. Métodos Utilizados.....	51
6.1 Método FRAP (Benzie y col. 1996) .....	51
6.2 ABTS <sup>•+</sup> (Roberta y col. 1999).....	53
6.3 Método del Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1966) .....	57
6.4 Inhibición del pardeamiento enzimático (Vela y col. 2007).....	59
6.5 Tratamiento estadístico .....	61
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
7 Evaluación de la capacidad antioxidante de las mieles .....	63
8. Compuestos Fenólicos de las mieles .....	71
9. Inhibición del pardeamiento enzimático.....	77
<b>V CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>VI BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>116</b>

## I OBJETIVO

La capacidad antioxidante de los extractos naturales y los alimentos han despertado gran interés en los últimos tiempos. Ya se comercializan, como ingredientes alimentarios, extractos con elevada capacidad antioxidante y algunos alimentos se distribuyen indicando esta propiedad, como atributo fundamental para contribuir a la conservación de la salud o a la prolongación de la vida útil de los productos.

Los antioxidantes constituyen una parte esencial para la preservación y cuidado de la salud humana contemporánea. Debido a la toxicidad potencial de algunos antioxidantes sintéticos se han intensificado las investigaciones para descubrir y utilizar antioxidantes de fuentes naturales, como frutas o verduras.

En los alimentos de origen vegetal, por ejemplo, se atribuye esta capacidad a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente a los flavonoides.

Entre los alimentos con potencial antioxidante uno de los que más interés han despertado, en los últimos diez años han sido las mieles, no solo por sus propiedades nutritivas o medicinales, sino también por su capacidad antioxidante y su posible utilización como conservante natural. Es importante señalar que aunque la utilidad de la miel como antioxidante forma parte de la cultura tradicional, en general el interés por esta actividad y por los componentes implicados en la misma son bastante recientes. En parte, este mayor interés tiene su origen en la revalorización que han experimentado los productos naturales frente a otros más manipulados, así como la demanda por parte del consumidor de la utilización de antioxidantes naturales frente a aditivos o conservantes sintéticos.

La miel es un producto natural que, además de todas las propiedades nutritivas y medicinales que aporta al organismo, se utiliza como conservante natural ya que presenta actividad antioxidante debido a que es un producto rico en compuestos fenólicos.

El objetivo inicial de este proyecto fue evaluar la capacidad antioxidante de mieles de diferente orígenes botánicos y valorar la correlación existente entre dicha actividad y su contenido en compuestos fenólicos.

Posteriormente, diferentes mieles fueron utilizadas para valorar su posible uso como conservante natural para evitar el pardeamiento enzimático en puré de frutas y para ver si hay correlación entre la capacidad antioxidante y la capacidad de la miel para inhibir el pardeamiento enzimático en los citados purés de frutas.



Para llevar a cabo este estudio se utilizaron siete tipos de mieles diferentes, de las cuales una de ellas será una miel sin origen botánico contrarrestado (miel de milflores), cuatro mieles tienen un origen botánico mono-floral (romero, azahar, eucalipto y tomillo), y las dos restante serán mieles de mielada ( castaño y roble).

El estudio se realizó en el área de nutrición y bromatología. en la escuela politécnica superior de Zamora.

## II INTRODUCCIÓN

## 1. La miel

### 1.1 Definición

Se considera la miel el producto azucarado natural producido por las abejas ( *Apis mellifera* y otras especies), a partir del néctar de la flores y otras exudaciones de las plantas sin adicción alguna, que ha de responder a las siguientes características (Código alimentario español, 1967):

- Líquida, muy viscosa, pastosa o sólida de color variable, olor aromático y sabor dulce sabroso.
- Agua no más del 22.5 % en peso.
- Sólidos totales no menos del 77.5 % en peso.
- Sustancias insolubles no más del 1% de los sólidos totales.
- Cenizas más del 0.1 % y menos del 0.6 %.
- Azúcares reductores no menos del 70 %.
- Sacarosa no más del 3 %.
- Dextrinas no más del 8 %.
- Hidroximetilfurfural no más del 0.5 %.
- Índice de diastasas no menos de un 8 % y no más de un 10 %.
- Acidez máxima de 5 grados expresados en mililitros de lejía alcalina decimo-normal por 100 gramos de producto.

También se define la miel como la sustancia natural dulce producida por las abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de la planta o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que maduren. (Directiva 2001/110/CE).

La RAE (real academia española), define a la miel como sustancia viscosa, amarillenta y muy dulce, que producen las abejas transformando en su estómago el néctar de las flores, y devolviéndolo por la boca para llenar con él los panales y que sirva de alimento a las crías.

## 1.2 Legislación

La miel es un producto alimenticio, cuyas propiedades fisicoquímicas y parámetros de calidad quedan recogidos en los siguientes reglamentos y directivas, (<http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/legislacion/subdetalle/miel.shtm>):

### 1.2.1 Disposiciones comunitarias de directa aplicación

- Reglamento (CE) 2074/2005, de 5 de Diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) nº 853/2004 y (CE) nº 854/2004
- Reglamento (CE) Nº 1162/2009 de la Comisión, de 30 de noviembre de 2009, por el que se establecen disposiciones transitorias para la aplicación de los Reglamentos (CE) nº 853/2004, (CE) nº 854/2004 y (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios y particularmente a los productos de origen animal.

### 1.2.2 Disposiciones nacionales:

Real Decreto 1049/2003, de 1 de Agosto de 2003, , por el que se aprueba la norma de calidad relativa a la miel (B.O.E. 06.08.2003). corresponde a la transposición de la Directiva 2001/110/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel.

## 1.3 Clasificación de la miel

Existe infinidad de tipos de mieles cuya composición y propiedades organolépticas o funcionales dependen fundamentalmente de las características del néctar de las flores, de excreciones vegetales o animales que están presentes en las zonas donde las abejas realizan su trabajo.

Según el Real decreto 1049/2003 por el que se aprueba la norma de calidad relativa a la miel, la miel se puede clasificar atendiendo a los siguientes criterios:

A. Según su origen:

- Miel de flores o miel de néctar: La que procede del néctar de las plantas.
  - Mono-florales: Predominio del néctar de una especie (Azahar, romero, eucalipto...)
  - Multi-floral: El néctar es producido a partir de varias especies y en proporciones muy variables .
- Miel de mielada: Es la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas.

B. Según su elaboración o presentación:

- Miel en panal: Es la miel depositada por las abejas en los alvéolos operculados de panales recientemente contruidos por ellas, o en finas hojas de cera en forma de panal realizadas únicamente con cera de abeja, sin larvas y vendida en panales, enteros o no.
- Miel con trozos de panal o panal cortado en miel: Es la miel que contiene uno o más trozos de miel en panal.
- Miel escurrida: Es la miel que se obtiene mediante el escurrido de los panales desoperculados (Procedimiento por el cual se remueven los opérculos del panal para extraer la miel), sin larvas.
- Miel centrifugada: Es la miel que se obtiene mediante la centrifugación de los paneles desoperculados, sin larvas.
- Miel filtrada: Es la miel que se obtiene eliminando materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de manera que se genere una importante eliminación del polen.
- Miel prensada: Es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado de hasta un máximo de 45 °C.

C. Miel para uso industrial: Es la miel apropiada para usos industriales o como utilización como ingredientes para otro productos alimentarios.

### 1.4 Composición química de la miel

El principal componente de la miel lo constituyen los hidratos de carbono sencillos (azúcares), mayoritariamente glucosa y fructosa. También contiene agua (tercer componente mayoritario), ácidos y minerales. Los azúcares que se encuentran en la miel pueden clasificarse como monosacáridos (glucosa, fructosa), disacáridos (sacarosa) y oligosacáridos (White, 1980).

La composición de las mieles depende de 2 factores (Anklam, 1998):

- La composición del néctar o los néctares: Va a depender de la especie o conjunto de especies de plantas que producen el néctar.
- Factores externos: Tipo y química del suelo, clima, manejo apícola y manejo de la miel una vez cosechada por el apicultor.

A pesar de la variabilidad que puede existir en la composición química de la miel se puede describir de la siguiente forma (Belitz-Grosch, 1997):

- Carbohidratos: (73 -83 %) es el componente mayoritario de la miel. Los principales azúcares son la fructosa (38 %) y la glucosa (31 %). También contiene otros tipos de azúcares en menores proporciones como la maltosa, sacarosa, etc.. El contenido en sacarosa varía dependiendo el grado de madurez de la miel.
- Agua: El contenido medio varía entre (14.5- 18.5 %), contenidos mayores de agua puede inducir a fermentaciones por levaduras osmófilas. Aunque algunos tipos de mieles como por ejemplo, el castaño, tiene un contenido en agua del 17-19%.
- Enzimas: Las enzimas se usan como indicadores de la calidad (índice del grado de frescura). Las enzimas más importantes de la miel son las  $\alpha$ -glucosidasas (invertasa o sacarasa), y las  $\alpha$  y  $\beta$  - amilasas (diastasas). Las actividades invertásicas y diastásica han cobrado importancia, en unión al contenido de Hidroximetilfurfural (HMF), como indicadores del tratamiento térmico sufrido por la miel y/o su envejecimiento.
- Proteínas: (0.3 %) Proceden tanto del material vegetal, principalmente de los granos de polen como de las secreciones de las abejas.

- **Ácidos:** El ácido principal de la miel es el ácido glucónico, la concentración de dicho ácido varía en función del tiempo transcurrido entre la toma del néctar de las abejas y la consecución de la densidad final de la miel en el panal.  
Existen otros ácidos minoritarios como son: acético, láctico, cítrico, málico, oxálico. Estos dan a la miel un pH ácido que varía entre 3.5 y 6.1. Las mieles de mielada tienen un pH más alto que las mieles de flores.
- **Minerales:** Su contenido varía en función del origen botánico o las condiciones del suelo. Su contenido en general es escaso, los más abundantes son el hierro, calcio y fósforo, aunque se pueden encontrar otros minerales en menores proporciones, como magnesio, manganeso, zinc, potasio, etc.. Las mieles oscuras por lo general tienen mayor cantidad de sales minerales.
- **Vitaminas:** Proviene del polen y del néctar, pero se encuentran en cantidades mínimas en la miel. Las vitaminas más representativas son la B y la C, en menor concentración encontramos las vitaminas A, D y K.

**Tabla I: Composición promedio de una muestra de mieles estadounidenses (White, y Col. 1962)**

Componentes	Valores extremos	Valor medio
<b>Agua<sup>a</sup></b>	13.4 - 22.5	17,2
<b>Glucosa<sup>a</sup></b>	22.0 - 40.8	31.3
<b>Fructosa<sup>a</sup></b>	27.3 - 44.3	38.2
<b>Sacarosa<sup>a</sup></b>	0.3 - 7.6	1.3
<b>Maltosa<sup>a</sup></b>	2.7 - 16.0	7.3
<b>Azúcares superiores<sup>a</sup></b>	0.1 - 8.5	1.5
<b>Otros<sup>a</sup></b>	0.1 - 3.2	3.1
<b>Nitrógeno (Proteínas y aa)<sup>a</sup></b>	0 - 0.13	0.04
<b>Minerales<sup>b</sup></b>	0.02 - 1.03	0.17
<b>Ácidos libres (Glucónico)<sup>b</sup></b>	6.8 - 47.2	22
<b>Lactona (Gluconolactona)<sup>b</sup></b>	0 - 18.8	7.1
<b>Ácidos totales<sup>b</sup></b>	8.7 - 59.5	29.1
<b>pH</b>	3.42 - 6.10	3.91
<b>Índice de Diastasa (Enzimas)<sup>c</sup></b>	3.0- 61.2	20.80

dato: a % ; b mEq/Kg; c escala de Schade

### 1.5 Compuestos fenólicos de la miel

Muchos son los autores que han estudiado el contenido fenólico de las mieles para determinar el origen botánico de las mismas. Representan el grupo más importante de los compuestos minoritarios de la miel. Su contenido total depende de la especie de plantas de donde las abejas recogen el néctar y su cantidad varía desde 5-1300 mg/kg (Al-mamary y col., 2002). Su contenido también varía en función del origen floral y geográfico de la miel. El procesamiento, manipulación y el almacenamiento de la miel puede influir en su composición (Turcomano y col., 2006).

Los compuestos fenólicos presentes en la miel están directamente relacionados con los recursos botánicos, como el polen, néctares, resinas y aceites que se suministran a las abejas y, en consecuencia, las mieles de diferentes orígenes florales poseen propiedades bioactivas distintos (Aljadi y Kamaruddin, 2004)

Por lo general, en mieles de colores brillantes el contenido en fenoles es más bajo que en mieles oscuras (Jasicka-Misiak y col., 2012).

Los compuestos fenólicos que se encuentran en la miel son: fenoles libres (ácidos volátiles), ácidos fenólicos, polifenoles (por lo general en forma de flavonoides), pigmentos (Jasicka-Misiak y col., 2012).

Dentro de los ácidos fenólicos, se pueden destacar: cafeico, cumárico, elágico, clorogénico, ácido ascórbico, etc..

Los flavonoides se dividen en tres grupos con una estructura similar flavonoles, flavonas y flavanonas (crisina, pinocembrina, quercetina, kaempferol, luteolina, apigenina, hesperetina, miricetina, etc.).

Los flavonoides (principalmente flavanonas y flavonoles) son importantes debido a su contribución al color, el gusto y el sabor de la miel, también por sus efectos beneficiosos para la salud humana (Estenvinho y col., 2008). Su presencia en la miel se debe a las plantas visitadas por las abejas y su contenido es aproximadamente de 6 mg/kg (Anklam, 1998).

Varios estudios han demostrado que la capacidad antioxidante está fuertemente correlacionada con el contenido de fenoles totales (Aljadi y Kamaruddin, 2004; Berretta y col., 2005).



## 1.6 Propiedades físicas de la miel

Desde un punto de vista físico, la miel una vez extraída del panal, es una dispersión acuosa de sustancias que cubre un amplio rango de tamaño de partículas. Desde iones inorgánicos, sacáridos y otros materiales orgánicos en verdadera solución, hasta macro moléculas coloidales de proteína y polisacáridos, esporas de levaduras y mohos, y las partículas más grandes que son las de polen.

Aunque la miel es superficialmente un jarabe con un promedio de 84% de su contenido de sólidos disueltos en forma de fructosa y glucosa, sus propiedades, (viscosidad, índice refractivo, densidad, etc.) difieren algo de aquellas propias de una solución de azúcar invertido con un contenido de agua similar. Estas propiedades varían en relación al contenido de humedad de la miel.

### 1.6.1 pH

El valor de acidez que pueda presentar las mieles es un parámetro importante ya que contribuye a dar estabilidad al alimento frente a los ataques microbianos (Sancho y col.,1991). El estado de acidez de un alimento se halla muy condicionado por la presencia de sales minerales, como por ejemplo, sales de potasio, calcio y sodio (Crane,1975). Por esta razón las mieles de mielada pueden aumentar la acidez debido al efecto regulador de las sales tampones que contienen ( Sanz y Trigueros, 1970 y Louveaux, 1985.).

En general el pH de la miel oscila entre 3.4 y 6.1 con una media de 3.9 (Belitz-Grosch, 1997) esta variación depende de la procedencia botánica, generalmente el pH es inferior a 4 para mieles de tipo floral y superior a este valor para mieles de mielada (Frías y Hardisson,1992).

En un estudio realizado con mieles italianas por Cherchi y col., (1994) se observó que el pH disminuía ligeramente con el tiempo, aunque según Jiménez y col., (1994) se puede considerar un parámetro muy estable durante el almacenamiento de la miel.

La acidez protege a la miel de los ataque microbianos y le atribuye aromas, aunque no sea advertido por el sabor al estar enmascarado con el dulzor de los azúcares (Piana y col.,1989). Durante mucho tiempo el sabor ácido fue atribuido al ácido fórmico, pero posteriormente se ha demostrado la existencia de al menos 20 ácidos orgánicos en la miel (ácido acético, málico, cítrico, oxálico, etc.) (Loveaux,1985). El ácido glucónico es el principal ácido de la miel (Belitz-Grosch, 1997).

Según Campos, (1987) los ácidos de la miel se originan a partir de secreciones de las glándulas salivares de la abeja que producen los procesos enzimáticos y de fermentaciones.

Por otro lado, si la miel es calentada en exceso se puede formar Hidroximetilfurfural por deshidratación de las hexosas, el cual a su vez se descompondrá en ácido levulínico y fórmico aumentando la acidez de la miel (Montes, 1966).

### 1.6.2 Actividad de agua ( $a_w$ )

Según Belitz-Grosch, (1997) la  $a_w$  de la miel oscila entre 0.490-0.650 lo que le convierte en un alimento seguro al ataque de numerosos microorganismos. Sin embargo en la miel cristalizada, el gradiente de concentración puede generar actividades de agua diferentes permitiendo el crecimiento local de levaduras osmófilas (Rüegg y Blanc, 1981).

Leveau y Bouix, (1979) refieren el crecimiento de una cepa *Z. bailii* aislada en la miel con una  $a_w$  0.68, lo que corroboraron (Esteban Quilez y Marcos- Barrado, 1996) estableciendo que la  $a_w$  mínima para el crecimiento de un grupo de levaduras osmotolerantes era de 0.68. En cambio, Zamora y Cherife, (2005) encontraron mieles naturales como límites para el crecimiento de levaduras osmotolerantes actividades de agua de 0.62-0.63.

Lázaro, (1974) señaló la existencia de una relación positiva entre el contenido de humedad de la miel y su  $a_w$  confirmado posteriormente por Alcalá, (1977).

### 1.6.3 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de la miel está relacionada con el contenido de sales minerales, ácidos orgánicos, proteínas, etc. (Crane, 1975) además es un parámetro útil para diferenciar los diferentes orígenes florales de la miel. Es un parámetro estable que no varía en la miel durante el almacenamiento (Krauze y Krauze, 1991).

La conductividad eléctrica de la miel varía entre 0.868 a los  $3.65 \times 10^{-4}$ /ohm cm, esta variación depende de su origen botánico siendo valores superiores en mieles de bosques o mielada que en las florales (Perez-Arquillué y col., 1990). Vorwohl (1964) observó que mieles de un mismo origen floral presentan una conductividad eléctrica similar a pesar de tener orígenes geográficos y condiciones climatológicas diferentes.

#### **1.6.4 sólidos insolubles y sólidos totales**

El contenido de sólidos insolubles es un parámetro de gran importancia para detectar las impurezas en la miel (Bogdanov,2002). Además afecta a propiedades físicas como la textura, estabilidad y resistencia.

#### **1.6.5 Color**

El color de la miel puede variar casi de incoloro hasta color rojo oscuro, pasando por tonalidades amarillas, ámbar y marrones con matices verdes y rojos (White,1978). El color de la miel es un parámetro importante para la clasificación desde el punto de vista comercial.

Bogdanov y col., (2004) indican que el color de la miel es uno de los atributos de mayor variabilidad y que principalmente son determinados por su origen botánico, pero también puede deberse a su contenido en cenizas, temperatura y tiempo de almacenamiento.

### **1.7 Propiedades bioactivas de la miel**

A la miel se le atribuyen una serie de propiedades biológicas, algunas de las cuales están fundadas en experimentación científica y otras (la mayoría) en recomendaciones basadas en remedios caseros. A continuación trataremos de presentar aquellas que han sido más discutidas y evidenciadas.

#### **1.7.1 Propiedades bactericidas**

Dold y col., (1937) fueron los primeros en examinar las propiedades antibacterianas de la miel, que se atribuyeron a una sustancia llamada en aquellos momentos "inhibina". Ésta era susceptible al calor y a la luz. Más tarde se encontró que los efectos de la "inhibina" eran causados por la acumulación de peróxido de hidrógeno, producido por un sistema natural de glucosaoxidasa (White y col., 1962). Diversos componentes son los responsables de la actividad antimicrobiana de la miel, entre ellos están la osmolaridad proporcionados por los azúcares, la acidez, el peróxido de hidrógeno y otros relacionados con el origen botánico de la miel (Molan,1992). Sin embargo, un componente importante en la miel son los fitoquímicos (compuestos activos presentes en los alimentos de origen vegetal), sustancias que provienen de la floración visitada por la abeja para la colecta del néctar. Dentro de éste grupo están los flavonoides, que

presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Bogdanov, 1997).

La miel de abejas se puede usar externamente debido a que favorece la cicatrización y previene infecciones en heridas o quemaduras superficiales.

Su acción antibacteriana se debe a que destruye a las bacterias por lisis osmótica, por lo que se utiliza en el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas (Aguilera y col., 2006).

Una de las áreas donde más se habla sobre los beneficios de la miel es en la aplicación tópica en quemaduras. La viscosidad de la miel es una barrera excelente contra microorganismos. Su alta solubilidad en agua la hace fácil de remover. Y sus propiedades corrosivas leves previenen o evitan daño adicional a los tejidos.

### **1.7.2 Propiedades antioxidantes**

Tradicionalmente, el uso de la miel era utilizado como agente edulcorante. Sin embargo, varios aspectos de su uso indican que también funciona como un conservante de alimentos.

Se ha demostrado que la miel sirve como una fuente de antioxidantes naturales, que son eficaces en la prevención de las reacciones de oxidación en los alimentos, tales como la inhibición reacciones de pardeamiento en frutas y verduras

La capacidad antioxidante es la habilidad que tienen algunas mieles para contrarrestar la cantidad de reacciones oxidativas que pueden ocurrir en la naturaleza, éstas pueden producir efectos perjudiciales tanto en los alimentos como en el organismo, donde contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas.

Muchos autores demostraron que la miel sirve como una fuente de antioxidantes naturales, que son eficaces en la reducción del riesgo de enfermedades del corazón, cáncer, etc. ( Bertoncelj y col., 2007).

El uso de la miel en el tratamiento de úlceras diabéticas, cataratas, otras enfermedades oculares, dolencias gástricas ,etc. se atribuía en un principio a la actividad antimicrobiana de las mieles, sin embargo, ya que algunas de estas enfermedades han sido reconocidas como una consecuencia de los daños de los radicales libres, la acción terapéutica de las mieles es debido a su actividad antioxidante.

La miel es una fuente de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que incluye glucosaoxidasa, ácido ascórbico, catalasas, flavonoides, compuestos fenólicos, derivados de carotenoides, ácidos orgánicos, productos de reacción de Maillard, aminoácidos y proteínas (Aljadi y Kamaruddin, 2004).

Los principales componentes de la actividad antioxidante de las mieles son los compuestos fenólicos. Sin embargo, la capacidad antioxidante varía en gran medida según el origen botánico de la miel, otros factores como la elaboración, manipulación y almacenamiento de las mieles afecta a la capacidad antioxidante en menor grado (Berretta y col., 2005). Frankel y col.,(1998) sugirieron que las propiedades antioxidantes de la miel están relacionadas con su color y contenido de humedad, ya que muchos de los pigmentos que contiene ( carotenoides y flavonoides) presentan actividad antioxidante y el contenido de agua de la miel puede determinar el grado de acumulación de compuestos antioxidantes solubles en agua.

Las vitaminas solubles en agua y especialmente la vitamina C ( ácido ascórbico) por su carácter antioxidante son de los componentes más importantes en las mieles. El ácido ascórbico es conocido por sus propiedades reductivas, para su uso como agente antioxidante en alimentos y bebidas (da Silva y col., 2012).

Muchos son los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante de las mieles, el método DPPH' es considerado un método rápido y fácil de evaluar (Sánchez-Moreno, 2002). El origen de estas propiedades beneficiosas de la miel procede de la gran variedad de plantas medicinales y aromáticas que las abejas visitan a lo largo de su ciclo de vida. En consecuencia, los componentes bioactivas vegetales se transfieren a la miel (Ignat y col., 2011).

### **1.8 Propiedades nutritivas de la miel**

La miel fue un producto alimenticio de supervivencia para los primitivos dado su valor energético.

Durante muchos siglos la miel de abejas fue un producto muy importante como endulzante ya que no se conocía el azúcar de caña o de remolacha o el jarabe de maíz alto en fructosa.

Según García y Zago, (2006) las propiedades nutritivas de la miel son:

- Es un alimento de alto poder energético, ya que, proporciona más de 3000 Kcal/gr.
- Posee mayor poder edulcorante que el azúcar, con un 40 % menos de calorías a iguales cantidades.
- Es de fácil asimilación debido a que posee hidratos de carbono de cadenas cortas, es una fuente de energía rápida. Por este motivo mejora el rendimiento físico, especialmente, en los deportistas.
- Facilita la digestión y metabolismo de otros alimentos, sobre todo, en los niños facilita la metabolización del calcio y el magnesio.
- Además contiene minerales tales como el calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, fósforo y potasio.
- También contiene de 1 a 2 gramos de vitaminas por cada 100 gramos de miel, principalmente vitaminas A, E, C, B6 y B12.

La miel que más aporta a la salud del ser humano es la miel cruda o las que han sufrido un proceso de filtración suave, ya que, tanto las vitaminas, las sales minerales y los aminoácidos se encuentran principalmente en el polen y cuanto mayor sea el grado de filtración mas granos de polen se pierden en la miel y por lo tanto, menores propiedades nutritivas.

Las enzimas, vitaminas, proteínas y demás componentes activos de la miel son sumamente susceptibles al calor.

Muchas mieles comerciales son pasteurizadas y filtradas a presión o ultra-filtradas lo cual destruye muchos de los componentes beneficiosos. Los motivos por lo cual se lleva a cabo un calentamiento o una pasterización son:

- Disminuye la cristalización
- Reduce la posibilidad de fermentación
- Modifica la viscosidad.

## 2. Antioxidantes

### 2.1 concepto

Para conocer mejor la acción de los antioxidantes en el organismo, hay que explicar antes qué son los radicales libres.

Un radical libre (RL) se define como aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad (Auroma,1999; Young, 2001). Para conseguir la estabilidad modifican las moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen (Auroma, 1999).

Los radicales libres producen daños a diferentes niveles celulares:

- Atacan a los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales (transporte de nutrientes, eliminación de desechos, división celular...).
- Atacan al ADN impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento celular.

Los procesos normales del organismo como el metabolismo de los alimentos, la respiración (cadena transportadora de electrones a nivel de mitocondria), el ejercicio etc. producen radicales libres. Pero no todos los radicales libres son perjudiciales, ya que por ejemplo, las células del sistema inmune crean radicales libres que se encargan de matar bacterias y virus y un nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) actúa como señalizador celular que desencadena toda una cascada de reacciones enzimáticas. En este contexto, un antioxidante es un compuesto químico que hallándose en pequeñas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge,1999). Igualmente, se definen los antioxidantes como compuestos que protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en los procesos que pueden causar una oxidación excesiva (Duthie y col. 2000).

Los antioxidantes se pueden encontrar de forma natural en el organismo o en los alimentos, éstos reaccionan con el radical libre, el cual, le cede un electrón oxidándose y se transforma en un radical libre débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Rodríguez y col., 2001).

Debido a esto, los antioxidantes son a menudo agentes reductores, como los polifenoles.

Numerosas sustancias encontradas en los vegetales, consideradas como componentes no nutritivos del alimento, se comportan como antioxidantes efectivos en estudios in vivo, como por ejemplo, los flavonoides, que pasa por ser una de las sustancias naturales más eficaces como antioxidantes (Valenzuela, 1999).

Los antioxidantes que se utilizan en la industria alimentaria pueden ser, antioxidantes artificiales y antioxidantes naturales (Bello Gutiérrez, 2000).

*Antioxidantes artificiales:* En la industria alimentaria se han empleado con gran eficacia, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP) o palmitato de ascorbilo (PA). Hoy en día se han ido sustituyendo estos antioxidantes artificiales por antioxidantes de origen natural como los tocoferoles, ácido ascórbico y los extractos de romero.

Para sus aplicaciones en la elaboración de los alimentos, los antioxidantes artificiales tienen que poseer las siguientes propiedades; deben ser inocuos, muy activos a concentraciones bajas 0.01-0.02 % con el fin de evitar sus niveles de toxicidad y liposolubles para situarse en la fase lipídica. En el caso de las emulsiones aceite/agua son más adecuados los antioxidantes lipófilos (BHA y BHT). Por el contrario los antioxidantes fuertemente polares como (GP) son especialmente activos en grasas y aceites porque se acumulan en la interfase grasa/aire. También se requieren que sean estables bajo las condiciones propias de cocción.

En la industria alimentaria es frecuente aplicar mezclas de antioxidantes para aprovechar sus propiedades sinérgicas. Así se emplean mezclas de BHA y BHT, o BHA con GP. El PA es un antioxidante débil cuando se usa solo, pero posee una actividad sinérgica cuando se mezcla con antioxidantes naturales.



*Antioxidantes naturales:* En los últimos años ha aumentado el interés por los antioxidantes naturales para reducir al mínimo el empleo de los antioxidantes artificiales. Entre los antioxidantes naturales más empleados destacamos: los tocoferoles, ácido ascórbico y el extracto de romero.

- Tocoferoles: Se encuentran principalmente en los aceites vegetales, aunque se presenta en grandes variaciones en cuanto al tipo y las proporciones dependiendo de la variedad del alimento, así por ejemplo, el aceite de soja es rico en  $\gamma$ - tocoferol, mientras que el aceite de girasol es rico en  $\alpha$ -tocoferol que son los más abundantes.

Por lo general, los tocoferoles resultan antioxidantes de escaso poder para los aceites vegetales que contienen una gran riqueza en ácidos grasos poli-insaturados.

- Ácido ascórbico: Actúa como un eficaz agente reductor que permite regenerar el antioxidante y aumentar su eficacia. Existe un gran sinergismo entre el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico.
- Extractos de romero: Son una buena fuente de sustancias naturales con actividad antioxidante, relacionadas con dos estructuras de diterpenos fenólicos: el ácido carnósico y el carvasol.

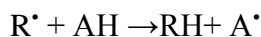
## 2.2 Clasificación

Existen varios criterios que permiten clasificar las sustancias antioxidantes. Algunos de los más comunes son los que se recogen a continuación.

### 2.2.1 Según su mecanismo de acción

De acuerdo con sus mecanismos de acción y en el marco de una matriz alimentaria se pueden distinguir tres grupos de sustancias antioxidantes ( Bello Gutiérrez, 2000):

- Los que tienen capacidad de interrumpir la cadena de formación de radicales libres: Los antioxidantes (AH) de este grupo son aquellos que inhiben o retardan la oxidación de los ácidos grasos insaturados al interferir, unas veces la propagación de la cadena de radicales libres, otras la etapa de iniciación al facilitar la donación de átomos de hidrogeno a los radicales libres con una neutralización de sus efectos, según el tipo de reacciones:



Dentro de este tipo de antioxidantes resultan muy eficaces los de estructura fenólica: BHA, BHT, GP y tocoferoles, por dos razones:

- Al producir radicales antioxidantes relativamente reactivos y estables, no propagan la cadena.
- Permiten competir por los radicales peróxilos con el sustrato lipídico RH, por lo general presente en más alta concentración.

En presencia de un antioxidante de esta naturaleza, la formación de hidroperóxidos depende de la relación de concentración  $[RH]/[AH]$ .

Tanto los antioxidantes fenólicos, como el  $\alpha$ -tocoferol, pueden actuar como pro-oxidantes, en condiciones de altas temperaturas y alta concentración de antioxidantes (250 ppm), al invertirse la reacción y generar radicales peroxilos

- Los que ejercen una acción preventiva de la oxidación: Los compuestos más importantes de este grupo de antioxidantes son los inactivadores de metales, capaces de ejercer tres tipos de acciones:
  - Desactivar los iones metálicos
  - Promover el inicio de la degradación de los hidroperóxidos.
  - Retrasar la formación de aldehídos deletéreos.

Suelen funcionar mediante la coordinación con los iones metálicos y modificación de su potencial al suprimir las reacciones redox que llevan a radicales alcoxilos y peroxilos, y otras por bloqueo de hidroperóxidos y promover su degradación.

En este grupo son eficaces los ácidos cítricos y ascórbico, aunque este último puede tener una acción pro-oxidantes, cuando se encuentra en concentraciones elevadas.

- Los que tienen una capacidad destructiva sobre los hidroperóxidos: Son compuestos que inhiben la oxidación de los ácidos grasos insaturados al inducir la descomposición de los hidroperóxidos y formar compuestos estables e inactivos. Algunos de ellos como el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido 6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxilo (TROLOX<sup>TM</sup>), solubles en agua resultan débiles destructores de hidroperóxidos.

En cambio agentes reductores como los compuestos en cuya estructura existen fosfitos, fosfuros, azufre o selenio, son bastantes más eficaces pero sus actividades toxicas no les hace apto para incorporarlos a los alimentos.

### 2.2.2 Según su naturaleza

Las células disponen de complejos sistemas antioxidantes y secuestradores químicos que previenen los daños oxidativo originados por las altas concentraciones de los radicales libres. Estos sistemas de defensa se dividen en (Parker,1999; Duthie y col., 2000):

Tabla II: clasificación de los antioxidantes

Exógeno	Endógeno
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Coenzima Q
Beta-caroteno	Enzimas: Superóxido-dismutasa(SOD) Catalasa Glutación peroxidasa
Flavonoides	
Licopeno	
Cofactores enzimáticos: Selenio, cobre, zinc, hierro y manganeso.	

- Antioxidantes endógenos: Aquellos que se originan a través de mecanismos enzimáticos del organismo (superóxido-dismutasa, catalasa, glutación peroxidasa, glutación y la coenzima Q).

Los sistemas enzimáticos constituye la primera línea de defensa respecto al daño oxidativo. Su principal función es eliminar los radicales superóxido y peróxido de hidrogeno para evitar que se forme el radical hidroxilo, considerado el radical más reactivo de las especies de oxigeno ( Martínez y Sanchez,2001).

Las enzimas antioxidantes requieren la presencia de metales para realizar su función las más importantes son la catalasa que requiere del hierro, superóxido-dismutasa que requiere zinc, cobre y manganeso dependiendo de su localización

celular y el glutatión peroxidasa que requiere del manganeso y del selenio (Thomas, 2002).

- Antioxidantes exógenos: Son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E( $\alpha$ -tocoferol) y C, caroteno, flavonoides, entre otros).

En el plasma existen pocas cantidades de antioxidantes endógenos, por lo tanto es necesario a partir de la dieta introducir antioxidantes, como pueden ser, tocoferoles, ácido ascórbico para que realicen el papel antioxidante en este medio (Thomas, 2002).

## 2.3 Técnicas para la determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de un compuesto se puede determinar por métodos químicos o a nivel celular (López - Alarcón y Denicola, 2013).

### 2.3.1 Ensayos basados en métodos químicos

Teniendo en cuenta la complejidad involucrada en la acción de los antioxidantes, se han desarrollado diferentes metodologías in vitro para estimar, de forma experimental simple, la capacidad de los antioxidantes y sus mezclas complejas. Los ensayos se basan en diversas estrategias encaminadas a evaluar distintos mecanismos de acción (López - Alarcón y Denicola, 2013):

#### 2.3.1.1 Métodos basados en la captación de radicales

Son métodos basados en el uso de diferentes radicales (ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>\*</sup>) que se caracterizan por ser estables y coloreados. En presencia de un antioxidante, o una muestra que contiene antioxidantes, el radical disminuye al reaccionar con el antioxidante, provocando una disminución proporcional de color que es registrada espectrofotométricamente a una longitud de onda determinada.

Este tipo de métodos tiene el inconveniente de que evalúa mecanismos de reacción complejos en los que no se tiene en cuenta la cinética de las reacciones por lo que el índice que se obtiene es variable en función de las condiciones experimentales. A pesar de ello, son uno de los métodos más utilizados para evaluar actividad antioxidante.

- *Método ABTS<sup>•+</sup>*: El radical ABTS<sup>•+</sup> se genera a partir de su precursor el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) por oxidación. Existen varios métodos de generación del radical ABTS:
  - Enzimáticamente (mioglobina, peroxidasa de rábano).
  - Químicamente (Dióxido de manganeso, per-sulfato potásico, radicales peróxido).
  - Electroquímicamente

En cualquier caso, el radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68V), pudiendo reaccionar con el radical, muchos componentes fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada, fijando tiempos cortos o muy elevados que pueden interferir en los resultados finales, lo cual, es un inconveniente. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso.

- *Método DPPH<sup>•</sup>*: Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH<sup>•</sup> para aceptar un átomo de hidrógeno (H) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece.

Como se ha indicado anteriormente el cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

### 2.3.1.2 La reducción de compuestos metálicos

Este método tiene por objeto evaluar la capacidad de la muestra para reducir los iones férricos o cúpricos en medios acuosos.

- *Método FRAP (ferric reducing antioxidant power)*: Este método originalmente fue desarrollado para evaluar la capacidad del plasma humano como antioxidante. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  que es menos oxidante. En la práctica el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Se trata de un método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del  $\text{Fe}^{2+}$ . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y más alta la señal de absorbancia. El complejo va a poder ser reducido por productos con potenciales redox menores a 0,7 V (potencial redox del  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ).

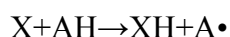
Debido a que el potencial redox del  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ es comparable con el del ABTS<sup>•+</sup> se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce una captura de radicales libres, según esto, el FRAP puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.

La ventaja del método FRAP es la simplicidad de las condiciones experimentales, pero tiene el inconveniente que depende del tiempo de reacción y también depende de la muestra de estudio, otro inconveniente de este método es que sólo mide la capacidad de reducción del ión férrico, lo cual no es relevante desde el punto de vista fisiológico.

### 2.3.1.3 Métodos Competitivos

Este tipo de métodos evalúan la habilidad de un antioxidante o mezcla de ellos para inhibir la degradación de una molécula diana.

- *Método ORAC*: Entre las metodologías desarrolladas para estimar la capacidad antioxidante, este ensayo es una de las más empleadas. El método ORAC se basa en gran medida en el trabajo realizado en el laboratorio Glazer (Delange y Glazer, 1989). Este método ha sido utilizado para la estimación de la capacidad antioxidante de alimentos y bebidas que se consumen principalmente en EEUU. El fundamento del método ORAC se basa en la habilidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno:



En este método, el radical artificial AAPH (2,2'-Azobis-(2-aminopropano)-dihidrocloruro) se utiliza como fuente de radicales peróxido (ROO<sup>•</sup>) capaces de oxidar a la fluoresceína, utilizada como molécula diana de forma que ésta pierde su fluorescencia. De esta manera, las sustancias antioxidantes presentes en el extracto obtenido a partir del alimento disminuirían dicha pérdida de fluorescencia. En el ensayo ORAC la eficacia de un antioxidante se evalúa a partir del área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo.

El ensayo ORAC proporciona información importante sobre la capacidad antioxidante de compuestos puros, como por ejemplo, antocianos, flavonoles, etc. (Sanchez-Moreno, 2002) y tiene la ventaja de ser un método simple y estandarizado (Bisbi y col. 2008).

### 2.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante a nivel celular

Estos métodos son más caros que los métodos químicos, ya que requieren métodos celulares complejos y métodos clínicos complejos, ya que hay que analizar por ejemplo muestras de sangre antes y después de consumir el producto. Sin embargo, es recomendable realizar un método celular después de realizar uno químico con el fin de conocer algunos parámetros de biodisponibilidad del potencial antioxidante, la absorción, el metabolismo, etc..

Wolfe y Liu, (2008) desarrollaron uno de los métodos celulares más utilizados para evaluar la actividad antioxidante de extractos de alimentos y complementos dietéticos. El método mide la capacidad de los compuestos para evitar la oxidación de DCFH<sub>2</sub> (Dihidrodiclorofluorescencia) intracelular que pueden ser seguidos por fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ ) y los resultados se expresan en moles de equivalentes de quercetina (es un flavonol que se encuentra presente generalmente como O - glucósidos y raramente como C - glucósidos en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras, principalmente cebolla). El ensayo de CAA (Capacidad antioxidante Celular) es una herramienta importante para determinar la actividad antioxidante en productos de extractos naturales que evalúa su potencial para ejercer una respuesta antioxidante a nivel celular y no sólo su capacidad como agente reductor.

## 2.4 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

La acción antioxidante de los flavonoides se basa en sus propiedades como donadores de electrones o hidrógenos. Los flavonoides son antioxidantes capaces de donar hidrógeno a través de sus grupos hidroxilos para inactivar a un radical libre, generando a su vez un radical fenoxilo, estable por deslocalización del electrón en su estructura. La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes por donación de electrones depende directamente del potencial de reducción de sus radicales e inversamente de la reactividad de las moléculas de flavonoides con oxígeno (Rice-Evans, 1999). Además, tienen la capacidad de quelar iones metálicos implicados en el proceso de oxidación, por la presencia de grupos como el o-dihidroxilo (Pietta, 2000). Estos compuestos son menos lipofílicos que el  $\alpha$ -tocoferol, así, mientras que éste se localiza en la membrana lipídica dentro de la bicapa fosfolipídica, los flavonoides se localizan principalmente en la superficie polar de la bicapa, por lo que los radicales acuosos que se transportan en plasma, serían más fácilmente capturados por los flavonoides, de forma que previenen el consumo de  $\alpha$ -tocoferol y retrasan la oxidación de los lípidos contenidos en las LDL (Teiseedre y Landrault, 2000).

La actividad antioxidante de antocianos ha sido evaluada en diferentes sistemas, basados en la oxidación de moléculas diana, como lípidos y proteínas, y en la captación de radicales libres.



Soobrattee y col., (2005) estudiaron los potenciales antioxidantes de estándares puros de un gran número de compuestos fenólicos, por diferentes métodos, entre ellos el TEAC, FRAP, capacidad de captación de hipoclorito. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos fue relativamente alta en el orden quercetina > miricetina > kaempferol, demostrando que está relacionada con el número de grupos OH de la molécula.

En general Soobrattee y col., (2005) concluyen que los flavonoides tienen actividades más elevadas comparadas con otros antioxidantes fisiológicos, como  $\alpha$ -tocoferol y sintéticos, como el Trolox, etc..

### 3. Pardeamiento enzimático

#### 3.1 concepto

El pardeamiento enzimático es una alteración química, aunque de naturaleza enzimática en sus primeras etapas que tiene como sustratos a los compuestos fenólicos que se transforman en estructuras poliméricas con coloraciones pardas como consecuencia de la actividad principalmente de los sistemas enzimáticos polifenoloxidasas.

Para que el pardeamiento enzimático tenga lugar se necesita que estén presente cuatro compuestos: El oxígeno molecular, sustratos apropiados, la polifenoloxidasa y la presencia de cobre en el centro activo de la enzima. Estos factores van a determinar la velocidad del pardeamiento (Laurila y col.,1998).

Las enzimas responsables del pardeamiento enzimático reciben el nombre de polifenoloxidasas, fenolasas o tirosinasas (origen animal).

Se han interpretado de varias formas la función que la polifenoloxidasa y el oscurecimiento enzimático pueden jugar en la fisiología vegetal.

Cheftel y Cheftel, (1976) aseguraron que las reacciones de pardeamiento enzimático poseían un papel de protección contra microorganismos. En efecto, se considera que los polímeros coloreados que se forman cuando un tejido se lesiona, pueden constituir una defensa contra la penetración de microorganismos, o incluso retrasar su proliferación. Por su parte, Valero-Ruiz, (1993) consideró que la participación de la polifenoloxidasa en procesos fisiológicos tan diversos como la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de artrópodos y la biosíntesis de melaninas se debe a la gran variedad de posibles sustratos y la elevada reactividad de las quinonas, productos primarios de reacción generados por la actividad de esta enzima.

Por su origen, apenas puede ocurrir en los alimentos de origen animal, pero puede ocasionar numerosos problemas de calidad en la conservación de frutas y verduras .

Las alteraciones aparecen sobre todo cuando los productos vegetales han sufrido algún daño en sus tejidos por contusiones o debido a agresiones propias de su tratamiento tecnológico ( troceado, extracción de zumos, deshidratación de zumos, congelación, etc.).

No siempre la formación de estos pigmentos coloreados se ha de considerar como un fenómeno químico indeseable, en algunos casos se busca precisamente que se produzcan esas transformaciones de los compuestos fenólicos, como por ejemplo, en la preparación de la sidra, fermentación del té, en el secado de los granos del cacao, etc. (Mc Evily y col. 1992).

### 3.2 sustratos del pardeamiento enzimático

Ya en 1920 Onslow demostró que el pardeamiento que sufrían los tejidos vegetales en contacto con el aire se debía a la presencia de derivados de mono-di-orto fenoles (Catecol, ácido protocatéquico, DOPA y el ácido cafeico), y de ésteres del ácido hidroxigálico con el ácido cafeico (ácido clorogénico), que se encuentra difundido en muchos frutos, y especialmente en los granos de café, en las patatas y en menor medida en plátanos.

Los mono-fenoles suelen originar procesos más lentos porque necesitan de una primera hidroxilación enzimática (reacción química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazando un átomo de hidrógeno, oxidando al compuesto). Las reacciones de hidroxilación son facilitadas por enzimas llamadas hidrolasas y sus oxidaciones resultan más selectivas que en el caso de los di-fenoles.

Muchos de los sistemas enzimáticos que intervienen en los procesos de pardeamiento son específicos de los compuestos orto-fenólicos. Los sustratos fundamentales que pueden ser objeto de las reacciones propias del pardeamiento enzimático son los compuestos fenólicos presentes en los alimentos de origen vegetal ( Bello Gutiérrez, 2000):

- El orto-di-fenol y sus derivados.
- Los compuestos derivados del aminoácido L-tirosina, como es la dopa ó la dopamina que es el sustrato principal del pardeamiento de los plátanos.
- Los ácidos orgánicos que incluyen en sus estructuras anillos aromáticos: el ácido gálico, sólo o formando parte de algunos taninos hidrosolubles, y el ácido clorogénico y sus derivados que constituyen el principal sustrato del pardeamiento en frutas que se pasaron de su punto optimo de madurez, principalmente en las manzanas.

- Los compuestos flavonoides, que pueden encontrarse bajo las formas más diversas:
  - Antocianos, presentan coloraciones muy sensibles a las variaciones de pH o a la pérdida hidrolítica del grupo glucosídico.
  - El compuesto incoloro leucocianidol, que por calor en medio ácido se oxida y deshidrata desarrollando coloraciones de tonos rosas o rojos, que ocurren en las manzanas.
  - Los flavonoles, como la quercetina.
  - Las flavononas, como el naringenol o naringina que son responsables del amargor de algunos frutos cítricos.
- Las ligninas, que son polímeros fenólicos responsables de las estructuras rígidas de muchos vegetales.
- Los taninos, unos derivados pirogálicos y otros condensados catéquicos, que reaccionan con proteínas.

### 3.3 Sistemas enzimáticos responsables

El pardeamiento enzimático está mayormente asociado con la acción de las polifenoloxidasas (PPO), sin embargo existen otras enzimas responsables en menor grado. La principal catalizadora del color de los alimentos, la polifenoloxidasa se encuentra tanto en organismos procariotas como eucariotas. Recibe diferentes nombres según el material biológico del que proceda. Se denomina tirosinasa en animales y procariotas y polifenoloxidasa en vegetales (Valero-Ruiz, 1993).

Cuando la célula se encuentra sana e intacta, las polifenoloxidasas y sus sustratos fenólicos, se encuentran en compartimientos separados (cloroplastos y vacuolas, respectivamente). Sin embargo, cuando la célula se desorganiza al envejecer, o como resultado de un daño físico o infeccioso, las enzimas y sustratos se juntan y sucede el conjunto de reacciones que dan lugar al oscurecimiento de los tejidos vegetales.

Se trata de un grupo de metaloenzimas que contienen un 0.2% de cobre como grupo prostético. Para que la enzima actúe sobre el sustrato fenólico, el  $\text{Cu}^{2+}$  ha de encontrarse reducido a  $\text{Cu}^{1+}$ , estado en el que la enzima se puede unir a moléculas de oxígeno (Dorantes-Álvarez y Chiralt, 2000).

El cobre, situado en el centro activo del enzima, es esencial para la inactividad de la polifenoloxidasas y su acomplejamiento da lugar a la inhibición de la misma.

Dentro de lo que denominamos polifenoloxidasas quedan comprendidas dos tipos de enzimas: Las Catecoloxidasas y las lacasas.

- Las Catecoloxidasas: catalizan dos reacciones distintas:
  - El paso de mono-fenoles a orto-di-fenoles mediante una actividad cresolasa, que implica una hidroxilación.
  - La conversión de orto-di-fenoles a orto-quinonas a través de una actividad catecolasa que implica una oxidación.

Estas dos reacciones enzimáticas se caracterizan porque ambas consumen oxígeno. La actividad cresolasa tiene un comportamiento de oxigenasa (catalizan la incorporación de átomos de oxígeno en el sustrato, dando lugar en la mayoría de los casos a la formación de grupos hidroxilos), mientras que la actividad catecolasa tiene un comportamiento de oxidasa (catalizan la transferencia de electrones desde el sustrato al oxígeno, reduciendo este último a peróxido, superóxido o agua, pero sin incorporar ningún átomo de oxígeno al sustrato. Las oxidasas son frecuentemente metaloproteínas.).

- Las lacasas: Pueden oxidar tanto los o-difenoles como los p-difenoles a sus correspondientes o-quinonas, (Walker y Mc Callion,1980) con un pH óptimo entre 4-7.5. Se ha cuestionado que las lacasas estén presentes en el pardeamiento enzimático, ya que, están ausentes en la mayoría de los vegetales. Sin embargo, se sabe que estas enzimas están presentes en melocotones, albaricoques, tomates, etc..

Este sistema es activo en un rango de pH 5.0-7.0 aunque su óptimo es de 6.0-6.5. El sistema se inactiva a un pH inferior a 3.0.

### 3.4 Mecanismo de reacción

El pardeamiento enzimático transcurre a través de un proceso, en el cual se pueden distinguir cinco etapas, cada una de ellas con mecanismo de actuación diferente, de naturaleza enzimática las dos primeras etapas ( Bello Gutierrez,2000):

- *Hidroxilación inicial mediante actividad cresolasa*: Esta primera etapa tiene como sustrato a los mono-fenoles, casi siempre incoloros, que son convertidos en di-fenoles, también incoloros, mediante una hidroxilación enzimática, con la ayuda de una actividad cresolasa con intervención de una molécula de  $O_2$  de la cual un átomo se usa para formar el di-fenol y el otro es reducido a agua.
- *Oxidación a quinonas por actividad catecolasa*: No se conoce con claridad el mecanismo de oxidación de los di-fenoles, para dar lugar a quinonas aunque puede ser propiciado por una actividad enzimática. En esta etapa también interviene el  $O_2$  como aceptor de H y la actividad enzimática es conocida con el nombre de catecolasa.

En ambas actividades el catión cobre que se encuentre en todos los sistemas polifenolasas resulta esencial, tanto para la actividad cresolasa como catecolasa, la intervención catalítica del cobre comprende un mecanismo de reacción que se desarrolla en varias etapas. La separación de las actividades de la cresolasa y catecolasa resulta difícil, algunos autores han explicado la reacción como una oxidación no enzimática en la que intervienen a la vez tanto las quinonas y los mono-fenoles, ya presentes en los alimentos.

- *Hidroxilación química secundaria de las quinonas*: La formación de quinonas es un proceso que depende de la presencia de oxígeno y enzima, pero una vez que han sido formadas se producen de forma espontánea una serie de reacciones de diversa naturaleza. Entre las reacciones que pueden tener lugar, las quinonas pueden ser hidroxiladas de modo secundario mediante reacción con moléculas de agua para dar lugar a trihidroxibencenos.
- *Cambios intramoleculares entre quinonas y fenoles*: La gran capacidad de reacción de estos compuestos tri-fenólicos (trihidroxibencenos) les llevan a cambios intramoleculares entre quinonas y fenoles para dar lugar a la formación de hidroxiquinonas.
- *Condensación de quinonas para dar lugar a polímeros*: Finalmente las hidroxiquinonas son la base de la condensación oxidativa que conducen a la formación de polímeros denominadas melaninas que tras pasar por una gran variedad de colores rosas, rojo, azulado, alcanzan una coloración final parda o negra. Estas melaninas corresponden a estructuras complejas no bien aclaradas.

Las proteínas y los aminoácidos también pueden reaccionar a través de sus grupos libres aminos ( $-NH_2$ ) y tioles ( $-SH$ ) con las quinonas para dar compuestos de coloración intensa.

Algunas estructuras específicas de ciertos aminoácidos también pueden experimentar una serie de transformaciones químicas, que llevan a la formación de polímeros con coloraciones que varían desde el rosa al pardo.

### 3.5 Factores que condicionan el proceso del pardeamiento

Existe una gran variedad de datos referente a los parámetros que afectan a la actividad enzimática de la polifenoloxidasas (pH óptimo, latencia, especificidad por el sustrato, etc.) entre especies y dentro de la misma especie, entre variedades y diferentes estados de desarrollo (la actividad enzimática es más elevada en frutos jóvenes que en los más maduros), las causas de estas diferencias se puede deber a la extracción y purificación de la polifenoloxidasas.

Para que se produzca el pardeamiento enzimático hacen falta que concurren tres factores esenciales (Bello Gutiérrez, 2000):

- Presencia de sustratos fenólicos adecuados
- Sistema enzimático activo: enzima O-di-fenol oxígeno oxidoreductasa, con átomos de cobre con grupo prostético.
- Presencia de oxígeno.

Para el control de las etapas iniciadoras del proceso resulta posible actuar sobre dos de estos factores: La actividad enzimática y la disponibilidad de oxígeno. Sin embargo poco se puede hacer para la eliminación del sustrato: bien elegir variedades pobres en ellos, o bien intentar transformarlos en derivados menos reactivos, con el fin de bloquear la transformación en quinonas.

El pH es un factor determinante en el pardeamiento enzimático, ya que, tanto la intensidad como el color resultante del oscurecimiento varían dependiendo del fenol precursor y de las condiciones químicas ambientales, como el pH (Nicolas y col., 1994). En algunos alimentos el pardeamiento enzimático aumenta con la actividad de agua, como es el caso de las uvas.

La polifenoloxidasas no es muy estable frente al calor, comparada con otras enzimas responsables de alteraciones en alimentos, el efecto que causa la temperatura en la enzima ha sido estudiada en numerosas investigaciones, así por ejemplo, una inactivación del 50% de polifenoloxidasas de manzana necesita 12 min. a 65°C destruyéndose por completo a 80°C (Nicolas y col., 1994).

Algunas prácticas agronómicas como la fertilización, el riego y el estrés salino del suelo afecta a la actividad de la polifenoloxidasas. El efecto, en general es un aumento de la actividad de la enzima en respuesta a las situaciones de estrés, por ejemplo, excesivo o deficiente contenido en potasio, altas concentraciones de cloruro de sodio o fósforo.

Por otra parte las condiciones climáticas en las que se realiza el cultivo pueden afectar al pardeamiento enzimático. Por ejemplo, la temperatura ó más concretamente la diferencia de temperaturas diurnas y nocturnas pueden producir una acumulación de antocianos en la piel de manzanas durante su desarrollo en el árbol, este efecto también se observa en otras frutas como, fresas, uvas, etc. (Tomás-Barberan y Espín, 2001).

### 3.6 Control del pardeamiento enzimático

Los diferentes métodos desarrollados para controlar, minimizar o inhibir el proceso de pardeamiento enzimático suele ser preventivos. Se pueden describir de dos maneras los múltiples métodos de inhibición para limitar el pardeamiento enzimático (Cabrera Pérez, 2003):

- Procedimientos de inhibición enzimática: Comprenden cuatro categorías dependiendo de donde actúa el método inhibitorio del pardeamiento enzimático (sobre la enzima, el sustrato, la disponibilidad de oxígeno o sobre los productos de la reacción).
- Diferenciar entre métodos físicos y métodos químicos.

Para describir los métodos de control del pardeamiento enzimático nos basaremos en el segundo método de clasificación ya que suele ser más práctica si se considera que, por ejemplo, algunos inhibidores químicos pueden actuar simultáneamente sobre varios de los componentes de la reacción y serían de muy difícil clasificación.



### 3.6.1 Métodos físicos

El creciente interés por parte del consumidor a tratamientos alternativos a la aplicación de agentes químicos, ya que son considerados gran parte de ellos como perjudiciales para el hombre y el medio ambiente ha creado la necesidad de buscar alternativas a su aplicación. Entre las innovaciones más destacadas en este campo, además de la aplicación de calor y la conservación en refrigeración, podemos citar la conservación bajo una atmósfera variable, controlada y programada y los recubrimientos comestibles.

#### 3.6.1.1 Tratamientos térmicos

El tratamiento térmico es el método más efectivo para la inactivación de la polifenoloxidasas, y consecuentemente para la inhibición del pardeamiento enzimático (McEvelly y col., 1992).

Las técnicas convencionales para prevenir el pardeamiento incluyen los métodos de autoclave y escaldado con temperaturas de 75-95°C por tiempos de 1 a 10 min. dependiendo de los requerimientos del producto y el proceso. Estos procesos convencionales, sin embargo, están relacionados con importantes pérdidas de peso y calidad del producto.

- *Aplicación de altas temperaturas:* El tratamiento de inactivación enzimática por calor causa la desnaturalización de proteínas y ha sido uno de los más estudiados, ya que con este es posible observar el comportamiento de la enzima expuesta a distintas temperaturas.

La desnaturalización de las enzimas es provocada por numerosos factores. A pesar de la eficacia del tratamiento térmico, normalmente su utilización sólo se recomienda cuando se trata de inhibir el pardeamiento en frutas o vegetales que son destinadas a congelación y a producciones en conserva debido a los efectos de cocción, causantes de pérdidas de textura y al desarrollo de reacciones del pardeamiento no enzimático.

Sin embargo, existen algunos trabajos donde se ha estudiado la aplicación de tratamientos térmicos de baja intensidad, por ejemplo en peras mínimamente procesada mediante la inmersión en soluciones isotónicas a bajo pH (2.5) o por la exposición a vapor.

Pittia y col.,(1999) observaron que con los tratamientos de inmersión a temperatura de 95°C durante 3 min se obtiene una buena estabilidad enzimática y microbiológica durante el almacenamiento del producto, manteniendo una textura aceptable.

A través de estudios previos de viabilidad se puede llegar a determinar las condiciones adecuadas de procesamiento térmico que reduzcan al máximo la pérdida de calidad, si el grado de sensibilidad del producto al calor es aceptable.

También se ha utilizado con éxito un pre-tratamiento térmico (45°C durante 2h) aplicado en manzanas antes del corte para disminuir el pardeamiento enzimático un vez procesadas en rodajas (Kim y col., 1993).

- *Empleo de bajas temperaturas:* Es una de las medidas usadas para controlar la actividad enzimática de los productos frescos, durante el manejo, procesamiento y el almacenamiento de frutas y hortalizas. A temperaturas bajas no solo es reducida o inactivada las actividades enzimáticas que son responsables del pardeamiento, de manera que se preserve la calidad del producto, sino que además las velocidades metabólicas descienden significativamente, ambas disminuciones contribuyen a incrementar la vida útil del producto. Además durante todo el procesamiento de los productos las bajas temperaturas controlan o inhiben el crecimiento de microorganismos.
- *Ondas electromagnéticas:* El efecto inhibitorio de las radiaciones de microondas sobre las polifenoloxidasas ha sido objeto de varias investigaciones. En el control del pardeamiento en rodajas de plátano, el tratamiento de inactivación a 650 W durante 2 horas mostró grandes variaciones en la eficiencia dependiendo del estado de madurez (Cano y col., 1990).

En purés de kiwis y fresas con un tratamiento de 450 W durante 60 segundos se obtuvo una inactivación del 70 % de la polifenoloxidasa. La disminución de la actividad polifenoloxidasa fue casi lineal a la potencia utilizada en el tratamiento. No obstante, el color de los productos tratados térmicamente con microondas se modificó como consecuencia de la alteración que la radiación provocó sobre las clorofilas en el kiwi y los antocianos en las fresas ( de Ancos y col., 1999).

### 3.6.1.2 Aplicación de tecnologías no térmicas

En un contexto en el que el consumidor demanda productos más naturales, mínimamente procesados y exentos de agentes químicos potencialmente perjudiciales para el producto y el medio ambiente los métodos no térmicos tienen su actuación.

- *Reducción de la disponibilidad de oxígeno:* El modo más satisfactorio de inhibir el pardeamiento enzimático es eliminando por completo el oxígeno. Esto puede obtenerse por desoxigenación a vacío, borboteo de nitrógeno o por la acción combinada de la glucosaoxidasa y la catalasa (Cheftel y Cheftel, 1976). Sin embargo es importante considerar que el oxígeno es un requisito de los tejidos vivos.

En el caso de sólidos, como pueden ser porciones de frutas y hortalizas la eliminación de oxígeno más sencilla es por inmersión en soluciones de salmuera, jarabe o agua para retardar la difusión del oxígeno. Sin embargo el tejido pardeará cuando entra en contacto nuevamente con el aire.

Otra alternativa sería el envasado del producto en atmósfera inerte. Pero el desarrollo del metabolismo anaerobio alteraría las propiedades organolépticas de las frutas, por lo cual este método no se utiliza.

- *Atmósfera modificada:* El confinamiento en atmósferas modificadas resulta ser la tecnología idónea del envasado de productos vegetales mínimamente procesados. Esta es una técnica aplicada a alimentos metabólicamente activos, los cuales son rellenos en una atmósfera esencialmente empobrecida en O<sub>2</sub>, entre el 2-8% y enriquecida en CO<sub>2</sub>, entre el 5-15% .

La inyección de mezclas conocidas de gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CO y/o N<sub>2</sub>) o la generación interna de atmósferas, por parte de la interacción producto-envase prolonga la vida útil del producto.

Al disminuir la concentración de O<sub>2</sub> se inhiben o se reducen las reacciones enzimáticas del pardeamiento, y al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> se inhibe la síntesis de metabolitos fenólicos.

Rocha y Morais, (2001) consiguieron una inhibición significativa de la actividad de la polifenoloxidasas en cubos de manzana var. Jonagored envasada en 2% de O<sub>2</sub> y 12 % de CO<sub>2</sub>.

Se debe de tener siempre presente que la acción sinérgica del frío y de la atmosfera, bajo condiciones adecuadas, inhibe el desarrollo fúngico y bacteriano.

- *Recubrimientos comestibles*: Son considerados como ingredientes o aditivos alimentarios dependiendo de la actividad que desempeñen.

Los diferentes tipos de recubrimientos poseen en su mayoría una función de crear una micro-atmosfera controlada que restringe el intercambio de gases. Esto conlleva una limitación de entrada de O<sub>2</sub>, una disminución de la tasa de respiración, retraso en la producción de etileno, reducción en las pérdidas de humedad y compuestos volátiles deseables (Baldwin y col., 1995).

Los compuestos utilizados generalmente para la formación de los distintos tipos de recubrimientos son: lípidos, proteína, polisacáridos, entre otros. Una de las ventajas de los recubrimientos comestibles es que se pueden utilizar como soporte para determinados agentes antioxidantes y acidulantes (Baldwin y col., 1996) y también de fungicida y bactericida (Torres y Karel, 1985) que ayudan en la prevención del pardeamiento y crecimiento de microorganismos.

Hay numerosas investigaciones sobre la eficacia de estos recubrimientos comestibles, tanto en la inhibición del pardeamiento enzimático, así como en el control de pérdidas por agua y en la reducción de la concentración del etanol interno, entre otros destacamos: peras (Olivas y col., 2002) manzanas y patatas (Baldwin y col., 1996).

Se han desarrollado patentes para la formulación de recubrimientos comestibles a base de las propias frutas o vegetales.

McHugh y Senesi, (2000) incorporaron puré de manzana en la formulación de recubrimientos comestibles para rectángulos de manzana obteniendo la preservación del color durante 12 días a 5 °C y una significativa reducción de pérdidas de humedad y pardeamiento con respecto a rectángulos de control.

Este tipo de recubrimientos son de gran importancia ya que alargan la vida útil del producto a la vez que aumenta su valor nutricional, con la ventaja de presentar una mayor aceptabilidad por parte de los consumidores.

### 3.6.2 Métodos químicos

La metodología más extendida para evitar el pardeamiento enzimático, consiste en la utilización de agentes químicos que actúan como inhibidores, interaccionando directamente sobre las enzimas, los substratos o los productos de las reacciones enzimáticas.

La existencia de compuestos químicos que poseen propiedades antipardeantes ha llevado al desarrollo y aplicación de métodos adecuados para la disminución del pardeamiento.

Su aplicación está reglamentada por los organismos correspondientes (FAO/OMS; Codex Alimentarius, etc.,) y su dosificación o aplicación están restringidos total o parcialmente en alguno de ellos, por consideraciones toxicológicas y/o impactos en el sabor, aroma, textura y color.

Los mejores inhibidores de la actividad enzimática de las polifenolasas son el anhídrido sulfuroso y las sales sódicas de sulfitos, bisulfitos....

Las concentraciones utilizadas de SO<sub>2</sub> son del orden de ppm para que sean eficaces. Se suelen aplicar en aquellos productos donde el tratamiento térmico puede ocasionar cambios de textura o desarrollar sabores anormales. Estos compuestos, sin embargo, pueden originar efectos secundarios, como la destrucción de tiamina con pérdida del valor nutritivo o degradación de antocianinas con pérdida del color. Solo es eficaz el SO<sub>2</sub> libre, por tanto su exceso debe de ser eliminado para evitar malos sabores.

Con las desventajas que supone el uso de los sulfitos para la salud humana, surgió la necesidad de encontrar nuevos agentes que actúen sobre los componentes implicados en el pardeamiento y que sean seguros para el consumidor. Se han encontrado diversos productos naturales que actúan como agentes antipardeantes, con los que se han obtenido resultados satisfactorios en la reducción del pardeamiento y en el deterioro organoléptico de frutas y hortalizas.

Los antipardeantes se pueden clasificar según actúen sobre la enzima, sobre el substrato o sobre los productos de reacción y su efecto puede ser temporal, irreversible o reversible (Weemaes y col.,1999).

Los compuestos utilizados como antipardeantes actúan como agentes antioxidantes, quelantes o acidulante. Los ácidos poli carboxílicos (cítrico, málico, tartárico, oxálico),

poli-fosfatos, el EDTA (Etilendiaminotretaacético) y otras macromoléculas como proteínas se utilizan para secuestrar el cobre del centro activo de la enzima.

Los agentes acidulantes bajan el pH de las frutas a valores inferiores a 3 donde se inhibe la enzima, el control del pH en frutas es complejo, ya que se puede alterar el tejido y causar rupturas celulares que derivan en la potenciación del pardeamiento junto con la aparición de sabores residuales (Sapers y Ziolkowski, 1987). Los agentes reductores o antioxidantes actúan reduciendo las quinonas, los difenoles o formando con las quinonas productos de adición menos coloreados.

**Tabla III: Aditivos de interés para el procesamiento de frutas y hortalizas (Adaptado de Pérez y col., 2003)**

Compuesto	Función	Mecanismo de acción
Ácido ascórbico y su sal	Antioxidante	Reduce quinonas a difenoles incoloros de baja reactividad
EDTA	Antioxidante, conservante, sinérgico y secuestrante	Quelante del centro activo $\text{Cu}^{2+}$
Cloruro de calcio	Agente de firmeza y regulador de acidez	Formación de pectatos de calcio insolubles
Lactato de calcio		
Ácido cítrico	Antioxidante, regulador de la acidez y secuestrante	Acidulante del medio y secuestrador de iones metálicos $\text{Cu}^{2+}$
Ácido oxálico	Secuestrante y regulador de la acidez	
Ácido tartárico	Antioxidante, sinérgico, regulador de la acidez y secuestrante	Acidulante del medio
Sorbato de potasio	conservante	Antimicrobiano (fungicida)

El pH óptimo para la mayoría de las fenolasas en los alimentos está en un rango de 7. Al disminuir el pH a valores inferiores de 3 se retarda considerablemente la actividad de las fenolasas, por lo que es un método muy empleado en la industria. El agente más utilizado es el ácido cítrico, por su efecto quelante sobre el cobre.

El ácido ascórbico reduce las quinonas a sus fenoles de origen. En frutas congelas se utiliza una mezcla de ascórbico y málico.

La inversión de los vegetales en soluciones diluidas de de ClNa, inmediatamente después de ser troceados ha resultado un modo eficaz de retrasar la aparición del pardeamiento enzimático.

Se debe a una inactivación de la enzima por la acción de la sal en concentraciones pequeñas 0.1%. Por razones del sabor salado se emplean solo en verduras y no se suele aplicar en frutas por su sabor dulce, en estos casos se aplica un recubrimiento de jarabe para las frutas que van a ser congeladas

#### **3.6.2.1 Efectos sinérgicos**

La utilización de mezclas de varios agentes al mismo tiempo puede promover un mecanismo de acción sinérgica. Estos mecanismos de acción implican la penetración en el tejido y alteración en el centro de la polifenoloxidasas, con una disminución del pH y la aparición de procesos competitivos entre inhibidores enzima-substrato. Son y col., (2001) evaluaron la reducción de la luminosidad (DL\*) en rodajas de manzana sumergidas 3 min en diferentes agentes antipardeantes solos o combinados durante 3 h a 4°C. Encontraron que el ácido oxálico es un potente inhibidor a concentraciones inferiores a 0.05%, al mismo tiempo mostró un fuerte efecto sinérgico a concentraciones de 0.02% con 1% de ácido ascórbico o cítrico.

#### **3.6.3 Métodos enzimáticos**

Ciertas enzimas pueden utilizarse con objeto de prevenir la actividad no deseada de otras enzimas presente en el producto. Esta técnica ha sido aplicada con éxito en la inhibición del pardeamiento enzimático de varias formas.

Las proteasas vegetales son una de las enzimas más utilizadas para inhibir el pardeamiento de frutas y jarabes. Estas proteasas proceden, a veces, de extractos de frutas como en el caso de la ficina del higo, convirtiendo su empleo en una alternativa más natural que la adición de antipardeantes químicos. De este modo se ha mostrado que un 0.5 % (p/v) de ficina durante 5 min. es tan efectiva como el empleo de 1.25 % (p/v) de sulfitos para la inhibición del pardeamiento enzimático en frutas cortadas y gambas ( McEvelly y col., 1992).

## **III MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4. Materiales utilizados

### 4.1 Laboratorio

- Agitador con sistema de calefacción.( RH basic, KiKA LABORTECHNIK).
- Agitadores magnéticos.
- Agitador vortex. (MS2 Misnishaker KIKA).
- Balanza granataría (Max:620 g y d:0.001 g) (SARORIUS).
- Balanza de precisión (Max: 65 g y d:0.0001 g) (SCALITEC).
- Batidora 600 W. (PHILIPS)
- Baño maría (BÜCHI Heating Bath B-490).
- Centrifuga (SELECTA modelo: CENTROTONIC BL 7001375).
- Cubetas de cuarzo de 10 mm.(HELLMA).
- Cubetas de plástico.(DELTALAB S.L.)
- Cronometro ( VOICEZONE 2000 FYING OVER).
- Embudos.
- Espátulas.
- Espectrofotómetro (JENWAY modelo: 6405 UV/VIS.).
- Filtros de lana de vidrio.
- Filtros de 45 micras.
- Jeringuillas.
- Matraz aforado de 5 ml, 25 ml , 50 ml, 100 ml, 500 ml y 1000 ml.
- Micropipetas 200 µl y 1000 µl (Eppendorf).
- Papel de filtro.
- Papel de parafilm.(American National Can).
- pH metro. (CRISON; pH METER BASIC 20).
- Pipetas graduadas de 5 ml y 10 ml.
- Pipetas aforadas de 5 ml y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Probetas de 25 ml, 100ml y 250 ml.
- Puntas de micropipetas de 300 µl y 1000 µl (Eppendorf).

- Tubos Eppendorf de 2 ml.
- Tubos de plástico para centrifuga.
- Vasos de precipitados de 5 ml, 80 ml, 250 ml y 500ml.
- Vasos de plástico.
- Vidrio de reloj.

## 4.2 Reactivos

- ABTS (Sigma-Aldrich).
- Acetato sódico trihidratado. (Prolabo)
- Ácido acético glacial.(Panreac).
- Ácido ascórbico. (Merck)
- Ácido clorhídrico (HCl.) (Scharlau).
- Ácido gálico (Scharlau).
- Agua destilada.
- Agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich).
- Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20 % peso/volumen (Scharlau).
- Cloruro de hierro hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>-6 H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich).
- Folin-Ciocalteu.( Panreac)
- Glicerina. (Panreac)
- Metanol (Prolabo).
- Peroxidasa (Sigma-Aldrich).
- TPTZ (2,4,6 tripyridiltriazina) (Fluka Chemical).
- Trolox.

## 5 Materias primas

### 5.1 Miel

Para la ejecución del proyecto vamos a partir de siete tipos de mieles comerciales diferentes, de las cuales, una de ellas será miel de milflores (marca: Luna de miel, distribuida por TIERRA Y ORO S.A.) y las otras seis mieles serán con un origen botánico certificado:

- Romero: Sauca. Miel de producción ecológica.
- Azahar: Miel de Teresa.
- Eucalipto: Miele Brezos del Norte.
- Tomillo: Miel Antonio Simón. Apicultores artesanos desde 1897. Producción ecológica. Miembro fundador de APRECO (Asociación de Productores ecológicos de Madrid).
- Castaño: Sauca. Miel de producción ecológica.
- Roble: Miel Antonio Simón. Apicultores artesanos desde 1897. Producción ecológica. Miembro fundador de APRECO (Asociación de Productores ecológicos de Madrid).

Las seis muestras de mieles mono-florales o mielada fueron amablemente facilitadas por el grupo de investigación del Dr. José Sánchez de la Universidad de Salamanca. A continuación se incluye una pequeña descripción de las mieles objeto de estudio:

- *Miel de romero*: Es una miel de un color ámbar muy claro y blanco cuando cristaliza, aromática y dulce. Es una miel rica en litio lo que le otorga numerosas propiedades, entre ellas, balsámica, digestiva, etc.. Gil y col., (1995) caracterizaron la miel de romero por la presencia de kaempferol. Tomas- Barberan y col., (2001) corroboraron la presencia de kaempferol en la miel de romero.
- *Miel de azahar*: Es una miel de color ámbar claro, cremosa y dulce. Posee una gran cantidad de azúcares que al cristalizar le otorga a la miel una gran densidad. Otorga propiedades sedantes y relajantes. Gil y col., (1995) caracterizaron la miel de azahar por su concentración en hesperetina.

Tomas-Barberan y col.,(2001) corroboraron la presencia de hesperetina en la miel de azahar. Serra y Ventura, (1995), caracterizaron la miel de azahar por la presencia de antramilato de metilo.

- *Miel de eucalipto*:. Es una miel de color ocre y muy aromática. Las flores de eucalipto proporcionan propiedades balsámicas, antisépticas y antiinflamatorias. Martos y col., (2000) caracterizaron la miel de eucalipto por la presencia de tricetina, miricitina, ácido elágico y pinocembrina
- *Miel de tomillo*:. Es una miel de color rojizo y sabor agradable. Las flores de tomillo les proporciona dos propiedades específicas, capacidad para digerir los alimentos y capacidad para prevenir o atajar las infecciones. Tsiapara y col. (2009) describieron la presencia de ácido p-hidroxibenzoico y ácido vanílico en mieles de tomillo griegas, Karabagias y col. (2014), en mieles de tomillo griegas describieron la presencia de ácido siríngico y miricitina.
- *Miel de castaño*: Miel de mielada procede de las abejas cuando liban las flores del castaño u otras exudaciones del árbol. Es una miel de un color muy oscuro por su contenido en hierro y profundo sabor. Debido a su alto contenido en hierro es buena para situaciones de anemia, etc. Guyot y col., (1998) encontraron además de derivados de aminoacetofenona estas mieles podían caracterizarse por la presencia de 1-feniletanol. Tomás-Barbera y col., (2001), analizaron mieles de castaño de España, Italia, Francia y Alemania las caracterizaron por la presencia de ácido cafeico y Pinobanksina.
- *Miel de roble*: Es una miel de mielada, que procede de las bellotas de los robles. Es una miel de un color negro intenso. Tiene un alto contenido en minerales, favorece la regeneración muscular. Steeg y Montag, (1988) indicaron que es posible diferenciar las mieles de mielada del resto por la diferencia de concentración en ácido protocatéquico. Escrache y col., (2014), diferenciaron las mieles de mielada del resto de las mieles por su alto contenido en ácido  $\alpha$ -coumaric.

- *Miel Comercial:* Como miel comercial hemos cogido una miel general de milflores.

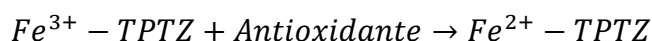
## 5.2 Manzanas

Para la elaboración del puré se han utilizado manzanas de las variedades Royal Gala cultivadas en España.

## 6. Métodos Utilizados

### 6.1 Método FRAP (Benzie y col. 1996)

- *Fundamento:* A pH bajo el complejo Férrico-tripiridiltrizaina ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) de coloración amarilla es reducido a ferroso por el antioxidante (reductor). Esta reacción produce un color azul intenso medido a una longitud de onda de  $\lambda = 593$  nm. ( Explicado en el apartado 2.4.1.2).



- *Preparación de reactivos:*
- Tampón Acetato: Pesar 3.1 gramos de acetato sódico trihidratado más 16 ml de ácido acético glacial y enrasar a un litro con agua destilada. De esta forma se obtiene un pH de 3.6, para que la concentración final sea 300 mM
  - TPTZ: 10 mM de TPTZ en 40 mM de HCl. Pesar 0.0781 g de TPTZ y disolver en 25 ml de HCl. 40 mM
  - Cloruro de hierro hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ ): Con una concentración final de 20 mM, para ello pesamos 0.1351 g de  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$  y disolver en 25 ml de agua destilada.
  - Trolox 1 mM disuelto en el tampón TEAC. Se preparó una solución madre de trolox disuelta en tampón glicina-HCl de concentración 1mM. La misma se conservo fraccionada y congelada a  $-39^\circ C$  hasta el momento de su utilización.

La preparación del reactivo FRAP requiere una mezclar de dichos compuestos en las siguientes proporciones: 10 tampón: 1TPTZ: 1  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ .

- *Procedimiento:*
1. Realizar curva de calibrado trolox (análogo de la vitamina E soluble en agua. Es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo) que permite medir la capacidad antioxidante de una sustancia por comparación con dicho estándar.

Para realiza la curva de calibrado se preparan por triplicado a diferentes concentraciones a partir de la solución madre de trolox, 1mM: 1mM; 0.5mM; 0.25mM; 0.125mM; 0.0625mM; 0.03125M.

En una cubeta de plástico añadimos 3 ml de la mezcla que hemos preparado con anterioridad (tampón: TPTZ:  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) y medimos su absorbancia en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  593nm. Es preciso realizar esta medida individualizada ya que al usar cubetas de plástico la absorbancia inicial presenta ligeras variaciones de unas a otras cubetas.

Una vez leída la abs. con los 3 ml de la mezcla añadimos, 100  $\mu\text{L}$  del correspondiente patrón, se mezcla durante 10 segundos en vortex y esperamos 6 minutos, exactamente medidos, para leer de nuevo la absorbancia. La absorbancia real de la muestra será la diferencia entre la Abs 6 min - Abs inicial de la cubeta. Este procedimiento se realiza con las diferentes concentraciones trolox, cada uno de los patrones se realiza por triplicado y la recta de calibrado se elabora con los valores medios de las tres determinaciones.

Así obtenemos una recta de calibrado y su correspondiente ecuación que utilizaremos para cuantificar la capacidad antioxidante de las mieles expresado como  $\mu\text{moles}$  de trolox/ g de muestra. Es necesario realizar una recta de calibrado diario porque la preparación Tampón: TPTZ:  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  es también diario

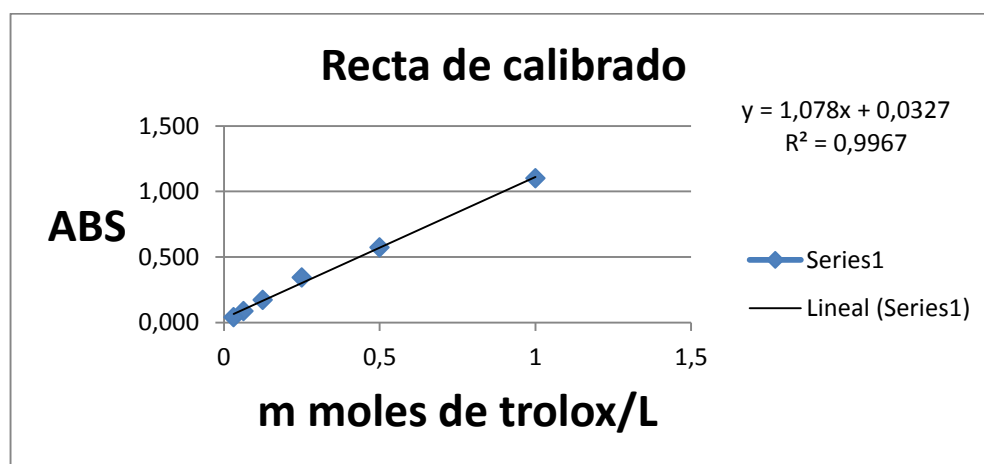


Figura I: Recta da calibrado de la capacidad antioxidante del trolox en el método FRAP

2. Una vez obtenida la recta de calibrado se repite el proceso de una manera similar con la muestra a analizar. En este caso, es necesario efectuar previamente un ensayo con diferentes concentraciones (g/ml) de la muestra a analizar para comprobar que los valores entran dentro de la recta.

Una vez seleccionada la concentración adecuada se realiza la determinación de la muestra por triplicado. Al igual que sucedía con los patrones, los triplicados de las muestras se analizan a su vez tres veces.

El valor que se obtiene de la absorbancia media de las tres determinaciones se lleva a la ecuación de la recta y así obtenemos los mmoles de trolox/ L o lo que es lo mismo  $\mu\text{moles de trolox/ml}$  y lo transformamos en  $\mu\text{moles de trolox/g de muestra}$ , teniendo en cuenta el peso partida.

- *Expresión de los resultados:* Como ya se ha comentado el resultado final se expresa en  $\mu\text{moles de trolox por gramos de la muestras}$ .

$$\frac{X \mu\text{moles de trolox/ml}}{[Muestra]g/ml} = \mu\text{moles de trolox/g de la muestra}$$

## 6.2 ABTS<sup>•+</sup> (Roberta y col. 1999)

- *Fundamento:* Se basa en la capacidad de los antioxidantes para atrapar radicales libres presentes en el medio. En primer lugar es necesario formar el radical coloreado in situ, después se añade el antioxidante y se mide el descenso de absorbancia producido por la captación de dicho radical por parte del antioxidante.

En el caso concreto del método propuesto por Roberta y col.,(1999), el radical se genera a partir del precursor ABTS, que por acción de un sistema enzimático formado por peroxidasa y agua oxigenada origina el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> de un color verde-azulado, capaz de monitorizarse a una  $\lambda=414 \text{ nm}$ . En este método la generación del radical se produce antes de la adición de la muestra (Explicado apartado 2.4.1.1).



➤ *Preparación de reactivos:*

- Agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): Se necesita que la concentración final del agua oxigenada sea de  $1.53 \times 10^{-3}$  (45 mM), para ello se toman 461  $\mu\text{l}$  y se enrasa con agua destilada hasta 100 ml.
- Peroxidasa: En un matraz de 5 ml se ponen alrededor de 2 ml de agua destilada y se le añade una pequeña cantidad de peroxidasa, lo suficiente para que obtengamos una absorbancia mayor de 0.6, posteriormente enrasamos con agua destilada.

En una cubeta de cuarzo leemos la absorbancia de la peroxidasa, para ello utilizamos agua destilada como patrón.

Con la absorbancia medimos la concentración de peroxidasa y ajustamos el volumen necesario de peroxidasa para tener una concentración final de 0.25  $\mu\text{M}$  en el medio de reacción que se utiliza para formar el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

$$ABS = C \times \epsilon$$

ABS= Absorbancia.

C= Concentración de la peroxidasa.

$\epsilon$ = En el caso de la peroxidasa es 100.000  $\text{M}^{-2}/\text{cm}$ .

Una vez calculado la concentración de la peroxidasa calculamos el volumen necesario para preparar el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$C_1$ = Concentración de la peroxidasa. (calculado por absorbancia).

$V_1$ = Volumen de peroxidasa.

$C_2$ = Concentración final del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

$V_2$ = Volumen del radical que se desea preparar.

- ABTS: Pesar 0.126 g de ABTS y llevar a un volumen final de 50 ml, como es posible que a esta concentración se salga del rango del espectrofotómetro lo diluimos mas, para ello cogemos 0.5 ml de esta disolución y se lleva a un volumen final de 100 ml de agua destilada.

En una cubeta de cuarzo leemos la absorbancia a una  $\lambda$  de 340 nm y al igual que en el caso anterior y considerando que el ABTS tiene  $\epsilon = 36000$ , calculamos la concentración exacta. Para calcular la concentración inicial multiplicamos la concentración por 200 en este caso, ya que se ha diluido la solución inicial. Una vez calculada la concentración de la solución inicial se considera el volumen necesario de ABTS para formar el radical  $\text{ABTS}^{*+}$ , en la concentración requerida (90  $\mu$ moles) en el medio de reacción misma metodología que para la peroxidasa.

- Tampón Glicerina- HCl. 0.1 N: Se necesita una concentración final de 50 mM y un pH de 4.5, para ello se pesa 1.877 g de glicerina y se disuelve en 500 ml de agua destilada.

Para ajustar el pH de la glicerina a 4.5 se utilizara HCl. 0.1 N.

- Trolox: Preparación igual que para el método FRAP.

El radical  $\text{ABTS}^{*+}$ , se forma al mezclar los reactivos en el siguiente orden, las cantidades de cada reactivo dependerá de la cantidad de medio de reacción que se quiera preparar.

1. Tampón glicerina-HCl.: La diferencia de los otros volúmenes.
2. ABTS: Volumen, para que en el medio de reacción haya 90  $\mu$ moles.
3. Peroxidasa: Volumen, necesario para que en el medio de reacción haya 0.25  $\mu$ moles
4. Agua oxigenada: 0.01 ml por cada 30 ml de medio de reacción.

➤ *Procedimiento:*

1. Recta de calibrado Trolox: El procedimiento es el mismo que el utilizado para el método FRAP, en éste caso solo hay que añadir 2 ml de medio de reacción en el que se ha originado el radical  $\text{ABTS}^{*+}$  y el tiempo de espera una vez que se añaden los 100  $\mu$ l de patrón son de 3 minutos.

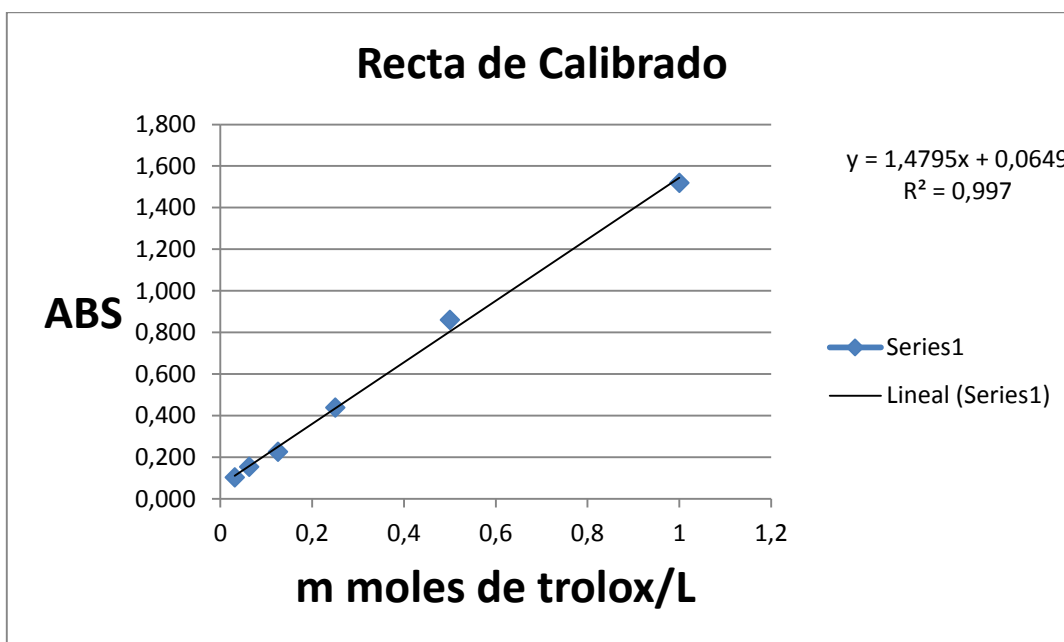


Figura II :Recta da calibrado de la capacidad antioxidante del trolox en el método ABTS<sup>++</sup>

2. Una vez que se obtiene la recta de calibrado repetir el proceso con las muestras de la miel de manera similar que lo descrito en el método FRAP.
3. El valor que se obtiene de la absorbancia de la muestra se lleva a la ecuación de la recta y así obtenemos los mmoles de trolox/L y lo dividimos entre la concentración de la muestra para obtener los  $\mu$ moles de trolox/ g de muestra.

➤ *Expresión de los resultados:* El resultado final se expresa en  $\mu$ moles de trolox por gramo de la muestra.

$$\frac{x \mu\text{moles de trolox} / \text{ml}}{[\text{Muestra}] \text{g} / \text{ml}} = \mu\text{moles de trolox/g de la muestra}$$

### 6.3 Método del Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1966)

- *Fundamento:* El ensayo Folin-Ciocalteu, ha sido utilizado durante muchos años, como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Aún así, el mecanismo básico es una reacción redox, por lo que se puede considerar como otro método de medida de la actividad antioxidante total. El método que se utiliza actualmente, es una modificación, efectuada por Singleton y Rossi, (1966).

El ensayo de los fenoles totales, se utiliza con frecuencia en el estudio de las propiedades antioxidantes de alimentos vegetales, como zumos de fruta, al tratarse de un parámetro que generalmente, muestra una estrecha correlación con los diferentes métodos de medir la actividad antioxidante. Así, cuando se evalúan, las propiedades antioxidantes de estos alimentos, el análisis de fenoles, proporciona información valiosa a la hora de seleccionar, variedades con mayor potencial antioxidante.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes.

El conjunto de compuestos fenólicos presentes en la miel se oxidan por el reactivo folin-ciocalteu, el cual, a su vez se reduce por la acción de los fenoles. Dicha reacción da una coloración azul que puede medirse a una  $\lambda$  de 760 nm.

- *Reactivos:*
- Folin-Ciocalteu
  - Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20 % peso/volumen. Para ello pesar 20 g de carbonato de sodio y enrasar hasta 100 ml con agua destilada.
  - Ácido gálico.
- *Procedimiento:*
1. Recta de calibrado con ácido gálico: Lo primero que se hace es preparar la solución de ácido gálico, para ello, pesamos 10 mg de ácido gálico y lo disolvemos en 4 ml de agua destilada, así obtenemos una concentración de 2.5 mg/ml.

A partir de esta concentración se preparan las otras 5 concentraciones 1.25 mg/ml, 0.625mg/ml, 0.3125 mg/ml, 0.15625 mg/ml, 0.078125 mg/ml.

Una vez que tengamos preparadas las concentraciones de ácido gálico, en un matraz aforado de 100 ml se añaden los siguientes reactivos en el orden indicado.

- 1 ml de ácido gálico.
- 5 ml de reactivo Folin-ciocalteu.
- 20 ml de  $\text{NaCO}_3$ .
- Agua destilada hasta enrasar.

Este proceso se realiza para cada una de las concentraciones de ácido gálico preparados anteriormente, cada muestra se realizara por duplicado. En otro matraz se prepara un blanco, en el cual se añadirán los mismos reactivos excepto 1 ml de ácido gálico. A continuación se agitan los matraces para homogenizar la reacción y se deja reposar durante 30 min. para estabilizar la reacción.

Una vez transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia a una  $\lambda$  760 nm. Se utilizaran cubetas de cuarzo de 10 mm, primero se mide el blanco y luego cada una de las diferentes concentraciones de ácido gálico. Así se obtiene la recta de calibrado y la ecuación de la recta.

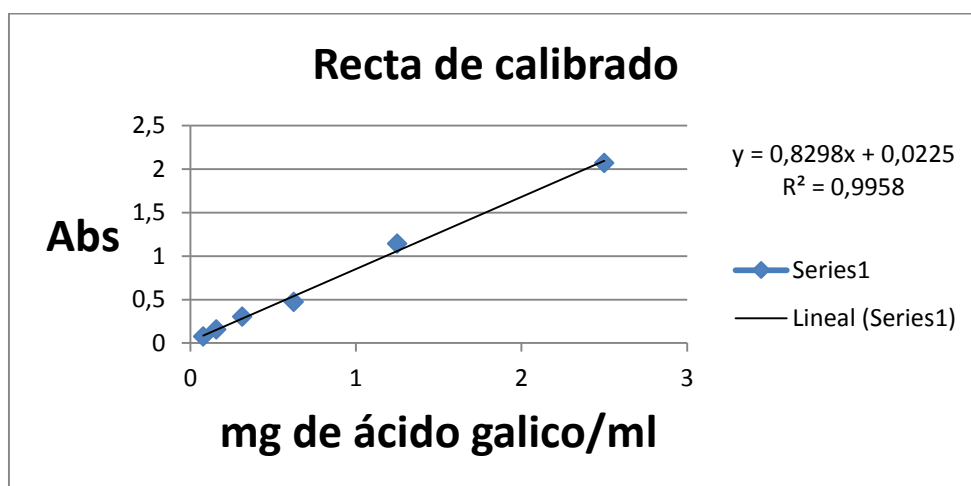


Grafico III: Recta de calibrado de ácido gálico mediante el método del folin-ciocalteu

2. Una vez obtenida la recta de calibrado se repite el proceso con cada una de las muestras de la miel, la única diferencia es que en vez de añadir 1 ml de ácido gálico se añade 1 ml de muestra de miel
3. Con los valores que se han obtenido de las muestras se lleva a la ecuación de la recta y obtenemos los mg de ácido gálico por ml, este valor lo dividimos entre la concentración de la muestra y obtenemos los mg de ácido gálico por g de la muestra.

- *Expresión de los resultados:* El resultado final se expresa en mg de ácido gálico por gramos de muestra.

$$\frac{X \text{ mg de ácido gálico} / \text{ml}}{[\text{Muestra}] \text{ g} / \text{ml}} = \text{mg de ácido gálico} / \text{g de la muestra.}$$

#### 6.4 Inhibición del pardeamiento enzimático (Vela y col. 2007)

- *Fundamento:* Determinar la eficacia de las mieles en la inhibición de polifenoloxidasas (PPO). Se llevaron a cabo ensayos de inhibición PPO siguiendo una adaptación del método propuesto por Omidiji y Okpuzor, (1996).

Se realizó el ensayo de inhibición de la polifenoloxidasas en un puré de manzana (10 g), al que se añadieron, en una concentración de un 2% (w/w) tres de las siete mieles en las que se habían analizado previamente la actividad antioxidante para evaluar la capacidad de las mieles para evitar el pardeamiento enzimático. Paralelamente se realizó el mismo ensayo añadiendo al puré de manzana ácido ascórbico, como antioxidante químico. De igual forma se llevó a cabo un ensayo para determinar el control negativo (puré de manzana sometido a ebullición) y el control positivo (puré de manzana sin adición de antioxidante ni miel).

- *Reactivos:*
- Ácido ascórbico.
  - Metanol.

➤ *Procedimiento:*

1. Preparación del puré de manzana: El puré se realizó con manzanas royal gala, previamente peladas y troceadas, utilizando una batidora convencional.
2. Preparación de las muestras: Se preparan seis muestras cada una de ellas se realiza por duplicado:
  - Control positivo: Se le añaden solamente 10 g de manzana. Esta muestra será el valor más alto del pardeamiento y con respecto a ello se calcularán los porcentajes de inhibición.
  - Control negativo: Se le añaden solamente 10 g de manzana pero se lleva a un baño maría con agua hirviendo durante 10 minutos para inactivar la polifenoloxidasas. Esta muestra será el valor más bajo del pardeamiento y se considera el 100 % de inhibición.
  - Muestra de ácido ascórbico: En esta muestra se añaden 10 g de puré de manzana y 1 % de ácido ascórbico.
  - Muestras de miel: Se añaden 10 g de puré de manzana y 2% de miel de eucalipto, castaño o roble.
3. Una vez que se preparan las muestras se incuban durante 1 hora tiempo necesario para que se desarrolle el pardeamiento.
4. Transcurrido ese tiempo se le añade a cada muestra 20 ml de metanol acuoso en una proporción (1:1).
5. Homogenizar las muestras y filtrar con filtros de lana de vidrio.
6. Las muestras una vez filtradas se centrifugan a 8000 rpm durante 10 minutos.
7. Medir la absorbancia de las muestras a una  $\lambda$  de 420 nm, utilizando como blanco el metanol acuoso.

➤ *Expresión de los resultados:* % de inhibición del pardeamiento de la muestra

- $\text{Abs control (+)} - \text{Abs control (-)} = X$  (100% inhibición del pardeamiento)
- $\text{Abs control (+)} - \text{Abs muestra miel} = Y$

$$\frac{X}{Y} = \frac{100}{Z} \rightarrow Z \% \text{ de inhibición del pardeamiento de la muestra}$$

### 6.5 Tratamiento estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo utilizando el programa SPSS versión 22. Para comprobar si había diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor teniendo en cuenta las diferencias entre las medias de los grupos de mieles a un nivel de significación del 5% ( $p < 0.05$ ).



## **IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 7 Evaluación de la capacidad antioxidante de las mieles

Uno de los principales objetivos de este trabajo es evaluar la capacidad antioxidante de diferentes mieles según su origen botánico. Para ello, se han empleado dos métodos distintos un primer método basado en la capacidad para reducir iones metálicos (FRAP), y un segundo método basado en la captación de radicales libres (ABTS<sup>•+</sup>).

Como se ha comentado anteriormente, el método FRAP evalúa la reducción del Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> por la acción de un antioxidante (muestra de miel), provocando un cambio de coloración, pasando de un compuesto incoloro a un compuesto azulado, con una  $\lambda$  máxima de 593 nm. Cuanto más alta sea la intensidad de la coloración mayor capacidad antioxidante presentará la muestra. La cuantificación de la capacidad antioxidante fue realizada por comparación con una recta de calibración elaborada con TROLOX como patrón estándar. Fue necesario realizar esa recta de calibrado cada día de trabajo obteniéndose coeficientes de correlación de  $R^2 > 0.99$  (ANEXO I).

Por el contrario, en el otro método lo primero que se forma es el radical ABTS<sup>•+</sup>, por oxidación del ABTS junto con agua oxigenada y peroxidasa. Posteriormente, al añadir el antioxidante (muestra de miel), se produce la captación del radical ABTS<sup>•+</sup> provocando un descenso en la coloración, es decir este método lo que mide es el descenso de coloración del radical ABTS<sup>•+</sup> que será proporcional a la capacidad antioxidante, y que se podrá medir a una  $\lambda = 414$  nm. Al igual que en el método FRAP la cuantificación se lleva a cabo por la comparación con la curva de calibrado TROLOX realizada diariamente y en las que se obtuvieron coeficientes de correlación de  $R^2 > 0.99$  (ANEXO I).

En la tabla IV quedan reflejados los datos obtenidos de la capacidad antioxidante (media  $\pm$  desviación estándar de las tres repeticiones) de las siete muestras de miel analizadas, tanto por el método FRAP, como por el método ABTS<sup>•+</sup>, expresados en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox (TE)/ g de muestra.

Tabla IV Datos de la capacidad antioxidante de las mieles (µmoles equivalente de trolox/ g de muestra)

Tipos de mieles	FRAP	ABTS <sup>++</sup>
Comercial	0.76±0.08	0.55±0.07
Romero	0.07±0.01	0.09±0.01
Azahar	0.14±0.01	0.09±0.01
Eucalipto	0.21±0.03	0.26±0.01
Tomillo	0.89±0.03	0.92±0.03
Castaño	1.51±0.05	0.98±0.03
Roble	3.01±0.24	2.73±0.49

Como se puede observar en la tabla IV, los valores del FRAP oscilaban entre los 0.07 µmoles de Trolox/g de la miel de romero (mono-floral), hasta los 3.01 µmoles de trolox/ g de la miel de roble (miel de mielada), siendo estos ligeramente superiores a los obtenidos por el método ABTS<sup>++</sup>. Ambos métodos siguen la misma tendencia, ya que, la capacidad antioxidante de las mieles va aumentando en función del color (apreciado de manera visual, ya que no se ha hecho ningún estudio del color de las mieles) y del origen botánico, parámetros que a su vez están relacionados con el contenido fenólico de las mieles (Aljadi y Kamaruddin, 2004; Berretta y col., 2005). Así por ejemplo los valores más bajos están presentes en las mieles más claras como son las de romero (0.07 y 0.09 respectivamente) y las de azahar (0.14 y 0.09 respectivamente) y los valores más altos se encuentran en las mieles más oscuras como el castaño ( 1.51 y 0.98 respectivamente) y el roble ( 3.01 y 2.73 respectivamente). Cabe destacar, como ya se indico en el apartado (5.1), que estas dos mieles tienen un origen botánico diferente al resto de las mieles, ya que, son mieles de mielada mientras que las otras son mieles mono-florales.

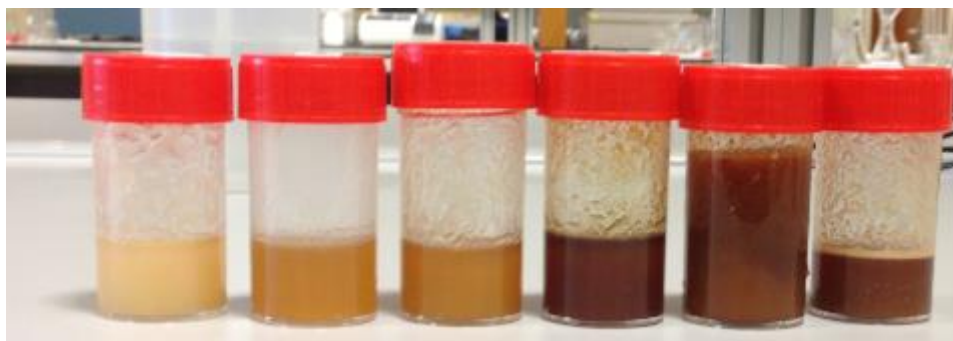


Imagen I: Muestras de mieles de origen botánico certificado

Es importante señalar que solo las mieles de castaño y de roble tienen una actividad superior al trolox 1 mM que es el patrón que se suele considerar a efectos de comparación (Valor TEAC). También se observa que los análisis realizados en la miel comercial (miel de flores-Mil flores), presenta valores intermedios en ambos métodos respecto al resto de las muestras de mieles.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo no se pueden comparar directamente con muchos de los descritos en otros estudios, debido a que existe una gran variabilidad a la hora de expresar los resultados de la capacidad antioxidante. Para el método ABTS<sup>•+</sup> algunos autores lo expresan como porcentaje RSA (actividad de eliminación de radicales) ó también lo expresan como Ce<sub>50</sub> (Concentración necesaria para disminuir la concentración inicial del radical en un 50 %), para el método FRAP muchos autores lo expresan en mM de Fe<sup>2+</sup>.

A pesar de ello, se puede concluir que los resultados obtenidos en este estudio van acordes con otros estudios realizados en mieles españolas (Rodríguez - Flores y col., 2015), mieles Africanas (Serem y Bester, 2012), mieles serbias (Gorganovic y col., 2013), mieles checas (Lachman y col., 2010), mieles portuguesas (Ferreiras y col., 2009) y en mieles eslovenas ( Bertoncelj y col., 2007), ya que, todos los autores consultados señalan que las mieles que presentan una mayor capacidad antioxidante son las mieles que tienen un color más oscuro y respecto al origen botánico son las mieles de mielada frente a las mieles florales. Tan sólo Rosa y col., (2011) evaluando la capacidad antioxidante de siete muestras de mieles italianas dieron resultados superiores en la miel de madroño (mono-floral) que las mieles de mielada. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la miel de madroño, a pesar de tratarse de una miel monofloral, es una miel especialmente oscura y rica en polifenoles y con una marcada actividad antioxidante similar a las mieles de mielada ( Alves y col., 2013).

En un estudio realizado por Wilczyriska, (2012) sobre mieles polacas, donde se evaluó la capacidad antioxidante de las mieles por el método DPPH<sup>•</sup> ( Método similar al ABTS<sup>•+</sup>), los resultados obtenidos oscilaban entre 0.9 mmol trolox/kg para la miel de acacia, y 1.42 mmol de trolox/ kg para la miel de brezo. Estos valores fueron, en general, superiores a los obtenidos para nuestro estudio, dando resultados similares a los de la miel de tomillo (0.92  $\mu$ moles de Trolox / g, Tabla IV), siendo la miel de acacia de origen mono-floral al igual que la miel de tomillo pero mucho más clara. La actividad antioxidante de la miel de brezo fue superior a la obtenida en nuestro trabajo

para la miel de castaño (0.98  $\mu\text{moles}$  de Trolox/ g, Tabla IV), a pesar que la miel de castaño es una miel de mielada y la miel de brezo mono-floral.

Escuredo y col., (2013) en un estudio sobre mieles portuguesas observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de la miel de castaño, con la miel de brezo, dando una capacidad antioxidante la miel de castaño RSA= 53.5 % y la miel de brezo RSA= 40.9 %.

Alves y col., (2013) evaluaron la capacidad antioxidante por el método FRAP de 21 muestras de mieles de diferentes zonas de Portugal, los resultados oscilaban entre 1759.4 mM  $\text{Fe}^{2+}$  en miel de brezo a 570 mM  $\text{Fe}^{2+}$  en miel de tomillo. Aunque los resultados como se ha indicado anteriormente, no son directamente comparables a los obtenidos en nuestro trabajo se confirma que la actividad antioxidante de las mieles va aumentando a medida que lo hace el color. Resultados parecidos han sido descritos en mieles procedentes del amazonas, norte de Brasil ( Almeida de Silva, 2012).

Serem y Bester, (2012) en mieles del Sur de África obtuvieron valores de la capacidad antioxidante que oscilaban entre 0.42  $\mu\text{moles}$  de Trolox/ g y 3.72  $\mu\text{moles}$  de Trolox/ g. Estos valores fueron similares a los obtenidos Berretta y col., (2005) donde evaluaron la capacidad antioxidante de diferentes mieles, entre las que había mieles comerciales y tres mieles tropicales de Burkina Faso.

Gorganovic y col., (2013) evaluaron la capacidad antioxidante por el método FRAP de siete muestras de mieles, de las cuales tres eran mieles comerciales. Los resultados fueron acordes a los obtenidos en este estudio señalando valores comprendidos entre (4.05  $\mu\text{moles}$  de Trolox/g y 0.04  $\mu\text{moles}$  de Trolox/g.).

Los valores más altos correspondieron a la miel de pino, que es una miel de mielada y de color más oscuro que la miel de roble (3.01  $\mu\text{moles}$  de Trolox/ g, Tabla IV), mientras que para la miel de acacia obtuvieron valores de 0.26  $\mu\text{moles}$  de trolox/g, similares a los resultados obtenidos para la miel de eucalipto en nuestro caso (0.21  $\mu\text{moles}$  de trolox/ g. Tabla IV).

Las mieles comerciales presentaban los valores más bajos de capacidad antioxidante, excepto la miel de mielada de pino que como se ha mencionado anteriormente era la miel que tenía mayor capacidad antioxidante. Este hecho llevó a los autores a concluir que someter a un tratamiento térmico a las mieles no ejercía una gran influencia sobre su actividad antioxidante, siendo el origen botánico de las mieles lo que más afecta.

Escriche y col.,(2014) investigaron, en cuatro mieles españolas el impacto que tenían sobre la capacidad antioxidante un tratamiento térmico industrial. En contra de lo que quizá fuese esperable, la capacidad antioxidante de las mieles que sufrían un tratamiento térmico aumentaba un 4 % respecto a la actividad antioxidante de las mieles que no sufrían tratamiento térmico.

En nuestro caso, este hecho podía explicar la actividad antioxidante de la miel de mil flores ya que las mieles monoflorales, a pesar de ser también comerciales, están sometidas a procesos térmicos más suaves para preservar intactas sus características organolépticas.

Resultados similares habían sido descritos por Wang y col., (2004) que observaron que el impacto del tratamiento térmico en las actividad antioxidante va a depender no sólo de la temperatura sino también del tipo de miel y de la composición química de la miel (pigmentos, compuestos fenólicos, etc.), que varía entre mieles de diferente fuente floral. Por ejemplo, la miel de trébol, una miel clara no varió su capacidad antioxidante con el tratamiento térmico, mientras que la miel de trigo sarraceno una miel oscura su capacidad antioxidante disminuyó un 33.4 % respecto a la miel de sarraceno sin tratamiento térmico. Estos datos no se pueden extrapolar a nuestro estudio porque nosotros no medimos la capacidad de la miel comercial antes del tratamiento térmico, pero podemos llegar a la conclusión que el tratamiento térmico no es un factor determinante en la capacidad antioxidante.

Como se ha indicado anteriormente, aunque la actividad antioxidante fue evaluada por dos métodos distintos la tendencia encontrada en ambos casos fue similar. En la figura III, podemos ver de forma gráfica la relación entre los dos métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de las mieles.

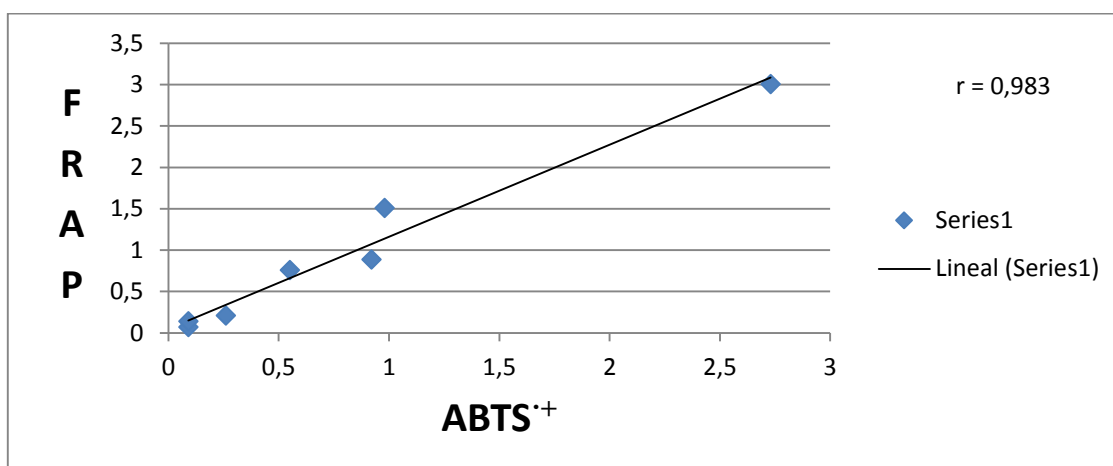


Figura III: Relación entre el método FRAP y el método ABTS<sup>•+</sup>

El índice de relación de pearson entre el método FRAP y el método ABTS<sup>•+</sup> para este estudio fue ( $r=0.983$ ) (Tabla VII, pg.81 ), similar al obtenido en los estudios de Lachman y col., (2010) para mieles checas ( $r_{FRAP/ABTS}=0.937$ ).

Este índice, sin embargo, es superior al descrito por Berretta y col., (2012) donde  $r_{FRAP/DPPH}=0.889$ , esto según indican los autores podría explicarse debido a que tuvieron dos resultados anómalos en dos muestras de mieles en el método DPPH•. Alves y col., (2013) para mieles portuguesas obtuvieron un índice de correlación  $r_{FRAP/DPPH}=0.747$  y Gorganovic y col., (2012) para mieles serbias  $r_{FRAP/DPPH}=0,892$ . El mayor coeficiente de correlación encontrado en nuestro estudio puede deberse a que en este estudio se ha utilizado el método ABTS<sup>•+</sup>, mientras que en los otros estudios se ha utilizado el método DPPH•, a pesar de que ambos métodos se basan en la capacidad del antioxidante para captar un radical. Cabe destacar que en estudios donde se han aplicado ambos métodos, los datos de la capacidad antioxidante de las mieles fueron mayores por el método ABTS<sup>•+</sup> que por el método DPPH• (Lachman y col., 2010).

En nuestro estudio la capacidad antioxidante de las mieles fue mayor por el método FRAP que por el método ABTS<sup>•+</sup>, esto es contradictorio a lo obtenido por otros autores que utilizando ambos métodos describen una mayor capacidad antioxidante por el método ABTS<sup>•+</sup> que por el método FRAP (Lachman y col.,2010).

En el Figura IV, se puede observar de forma más grafica la evolución de la capacidad antioxidante de las mieles en función y del origen botánico de las mismas.

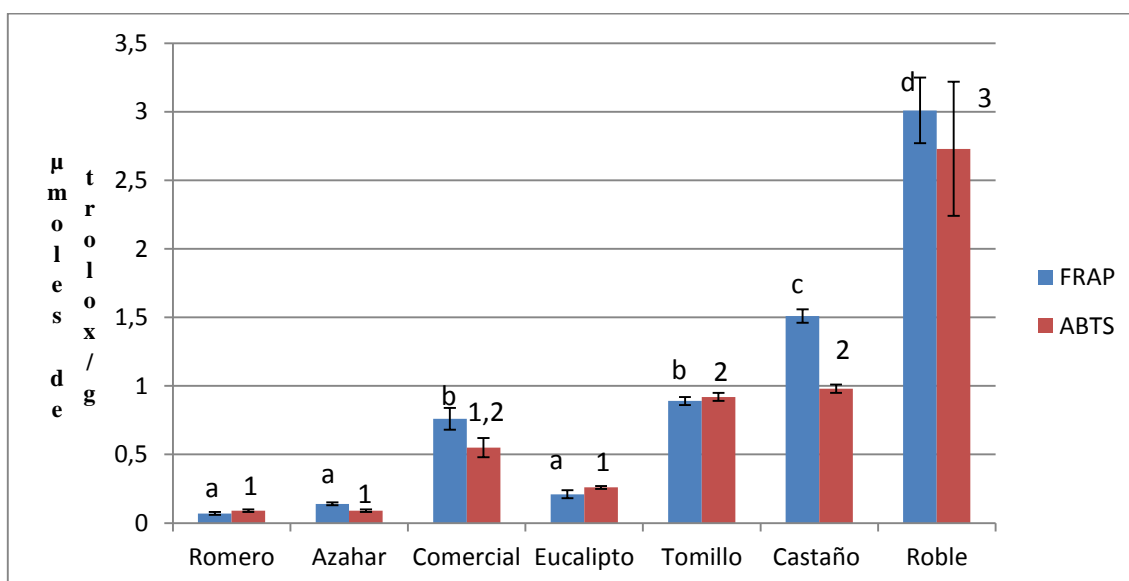


Figura IV: Capacidad antioxidante de las mieles: FRAP y ABTS<sup>++</sup>

Los grupos obtenidos en el análisis ANOVA con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$  para  $n=3$  se representan en la tabla con letras para el método FRAP y con números para el método ABTS.

En nuestro caso, cuando se hace el estudio estadístico ANOVA de un factor se establecen 4 grupos diferenciados en el método FRAP y 3 en el ABTS. En el caso del FRAP un primer grupo lo constituyen las mieles de romero, azahar y eucalipto, un segundo grupo que engloba a las mieles comercial y de tomillo y las mieles de castaño y roble (grupos 3 y 4) que son distintas a todas las demás y distintas entre sí. Cuando lo que se compara son los resultados obtenidos en el método ABTS, los tres grupos están constituidos por las mieles de romero, azahar, eucalipto y comercial (grupo 1), comercial tomillo y castaño (grupo 2) y el roble (grupo 3).

En un estudio realizado por Das y col., (2015) sobre siete muestras de miel de sésamo, concluyeron que hay una correlación del color (medida de la intensidad del color a una  $ABS_{450}$ ) con la capacidad antioxidante, debido a la presencia de pigmentos (carotenoides, flavonoides, etc.), que presentan capacidad antioxidante. Existiendo una correlación positiva del color con el método FRAP  $r=0.931$  y con el DPPH (Método similar al ABTS<sup>++</sup>) de  $r=0.878$ . Correlaciones similares habían sido descritas anteriormente  $r_{color/FRAP}=0.918$  (Serem y Bester, 2012) y  $r_{color/DPPH}=0.884$  Berretta y col., (2005).



Son numerosos, por tanto, los estudios experimentales en los que han demostrado que el color de la miel es controlado por diversos componentes químicos, que incluyen carotenoides y flavonoides, y que dichos componentes juegan un papel significativo en la actividad antioxidante de la miel (Escriche y col., 2014; Serem y Bester, 2012).

Si comparamos la actividad antioxidante de las mieles analizadas con otros productos naturales como uvas o extractos vegetales, vemos que la miel suele tener una capacidad antioxidante menor a la de estos productos. En un estudio realizado por Peinado y col., (2009) evaluaron la capacidad antioxidante por el método ABTS<sup>•+</sup> para uva Pedro Ximénez en diferentes etapas del proceso de secado, en el momento de la recolección la actividad antioxidante fue de 0.9 mmoles de Trolox/ kg, estos datos son superiores a las mieles de origen monofloral, pero inferior a la capacidad antioxidante que presentan las mieles de mielada en nuestro estudio, sin embargo a los siete días de la recolección la actividad antioxidante de las uvas aumento hasta 6.5 mmoles de Trolox/ kg muy superiores a los datos obtenidos en nuestro estudio.

Skotti y col., (2014) evaluaron la capacidad antioxidante de diferentes extractos vegetales, obteniendo valores muy superiores a los obtenidos para las mieles en este estudio, así por ejemplo, el orégano 3.35  $\mu$ mol de Trolox/ ml y bálsamo de limón 6.59  $\mu$ mol de Trolox/ml.

## 8. Compuestos Fenólicos de las mieles

Otro de los parámetros que se evaluó en las mieles fue el contenido total de compuestos fenólicos, con el objetivo de ver si había una correlación de los compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante.

Como se ha indicado en la metodología para realizar el estudio de los compuestos fenólicos se siguió el método de Folin-ciocalteu ( Singleton y Rossi, 1966), utilizando como patrón ácido gálico ( $R^2=0.995$ , ANEXOII).

En la tabla V se muestran los datos de los compuestos fenólicos totales ( media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones) de las siete muestras de miel expresados en mg de ácido gálico/ g de la muestra.

**Tabla V: Valores de compuestos fenólicos totales (mg AG/g de miel)**

Tipos de mieles	mg de ácido gálico/g de miel
Comercial	0.58 $\pm$ 0.01
Romero	0.33 $\pm$ 0.01
Azahar	0.33 $\pm$ 0.01
Eucalipto	0.88 $\pm$ 0.02
Tomillo	1.74 $\pm$ 0.01
Castaño	2.49 $\pm$ 0.02
Roble	2.77 $\pm$ 0.01

Como se puede observar en la tabla V el contenido en compuestos fenólicos oscilaba entre los 0.326 mg AG/g de la miel de romero a 2.756 mg AG/ g de la miel de roble. El contenido fenólico de las mieles fue aumentando en función del color, mieles oscuras> mieles claras; el orden fue romero<azahar<comercial<eucalipto<tomillo<castaño<roble. Estos resultados son acordes a los descritos para mieles españolas (Rodríguez-Flores y col.,2015), africanas (Serem y Bester, 2012), mieles serbias (Gorganovic y col., 2013), mieles portuguesas (Alves y col., 2013), mieles cubanas (Álvarez - Suarez y col., 2010), mieles checas (Lachman y col.,2010) y mieles eslovenas (Bertoncelj y col., 2007).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para las mieles de mielada, 2.485 mg AG/g para la miel de castaño y 2.756 mg AG/ g para la miel de roble, fueron superiores a los descritos por otros autores para mieles de mielada de la península ibérica (Rodríguez-Flores y col.,2015). Escuredo y col., (2013) por su parte evaluaron el contenido de fenoles totales en diferentes mieles portuguesas entre las que había una miel de castaño y otra de eucalipto. Los resultados descritos para la miel de castaño 131.8 mg AG/ 100 g, fueron inferiores a los descritos en este estudio (2.49 mg AG/g, Tabla V), mientras que los obtenidos para la miel de eucalipto 78.4 mg AG/100 g fueron similares(0.86 mg AG/g, Tabla V).

Por otra parte, nuestros datos también fueron superiores a los descritos en mieles florales serbias (Cadanovic-Brunet y col., 2014) donde obtuvieron valores de 27.44 mg AG/100 g para la miel de tilo y de 19.78 mg AG/100 g para la miel de Homolje. Estos dos tipos de mieles son mieles florales de color amarillo muy parecidas en el color a la miel de azahar utilizada para este estudio y para la cual en nuestro caso se obtuvo un contenido en compuestos fenólicos de 0.33 mg AG/g (Tabla V).

Alves y col., (2013) evaluaron el contenido de fenoles totales de 21 muestras de mieles de diferentes zonas de Portugal, entre las muestras había mieles de romero, eucalipto y tomillo. Las mieles de romero presentaban los valores más bajos de fenoles totales, mientras que las mieles de eucalipto y tomillo dieron valores intermedios. Estos autores encuentran una tendencia similar a la de nuestro estudio pero los valores de las diferentes muestras de miel de romero analizadas 700 mg AG/Kg, eran superiores a los obtenidos nuestro caso para la miel de romero 0.33 mg AG/ g (Tabla V), por otra parte, los valores de miel de tomillo descritos en nuestro trabajo son similares a los descritos por Ferreira y col., (2009) para mieles de romero de Portugal. Por el contrario los valores de la miel de tomillo 1.77 mg de AG/ g (Tabla V) fueron superiores a los obtenidos por Alves y col. que describen valores de 800 mg AG/Kg.

Los resultados obtenidos por Serem y Bester, (2012) para el contenido de fenoles totales en mieles africanas fueron acorde con los obtenidos en nuestro estudio y oscilaban entre 68.85 mg AG/ 100 g y 167.69 mg AG/ 100 g, similares a los descritos por Berreta y col., (2005) para mieles de Burkina Faso y para mieles de Argelia ( Silva y col., 2009).

En un estudio en el que se evaluó el contenido en fenoles totales de diferentes mieles de Zambia de origen floral se señalaban resultados que variaban entre 479.2 mg AG/ Kg y 1383,9 mg de AG/ Kg (Niawali y col., 2015) muy similares a los descritos en nuestro trabajo. Parecidos resultados han sido descritos para mieles floreales Taiwanesas (Liu y col., 2013).

Por el contrario, los contenidos de fenoles totales de diferentes mieles monoflorales del amazonas fueron muy superiores, oscilaban entre 17 mg AG/ g a 66 mg AG/ g, a los resultados obtenidos para las siete muestras de mieles evaluadas en nuestro estudio, aunque el comportamiento de las mieles era similar ya que aquellas mieles que tenían un mayor contenido en fenoles presentaban una mayor capacidad antioxidante (Almeida da Silva y col., 2013). Este aumento en la cantidad de fenoles en las mieles puede deberse a las diferencias climatológicas entre ambas zonas, debido a la alta humedad en la zona amazónica.

En todos los estudios señalados los polifenoles totales aumentaban en función del color de las mieles y del origen botánico, y mieles con un alto contenido en fenoles presentaban una mayor capacidad antioxidante. Tan sólo en el estudio de Rosa y col., (2011), ya comentado anteriormente describen datos contradictorios al resto de los estudios, puesto que, según estos autores la miel de madroño (monofloral) presenta una cantidad mayor de compuestos fenólicos que las mieles de mielada, aunque sus resultados son acordes, como se ha comentado ya en el epígrafe anterior, a los obtenidos para la capacidad antioxidante aquellas mieles que tienen mayor cantidad de fenoles presentan una mayor capacidad antioxidante. También, influyen otros factores en el contenido de compuestos fenólicos totales en las mieles como pueden ser; la elaboración, manipulación y almacenamiento (Turcomanos y col., 2006; Álvarez-Suarez y col., 2010; Liu y col., 2013).

En este trabajo el estudio de los compuestos fenólicos se ha utilizado para ver hasta qué punto hay una correlación positiva entre la capacidad antioxidante encontrada en la miel y su contenido en compuestos fenólicos, o si existen otros compuestos no analizados en este trabajo que también puede influir en dicha actividad.

En el figura V se puede observar de forma gráfica la evolución de los compuestos fenólicos de las diferentes muestras de mieles en función del origen botánico. El contenido en fenoles de las mieles en relación al origen botánico siguió el orden: mieles de mielada> mieles mono-florales y en relación al color mieles oscuras> mieles claras.

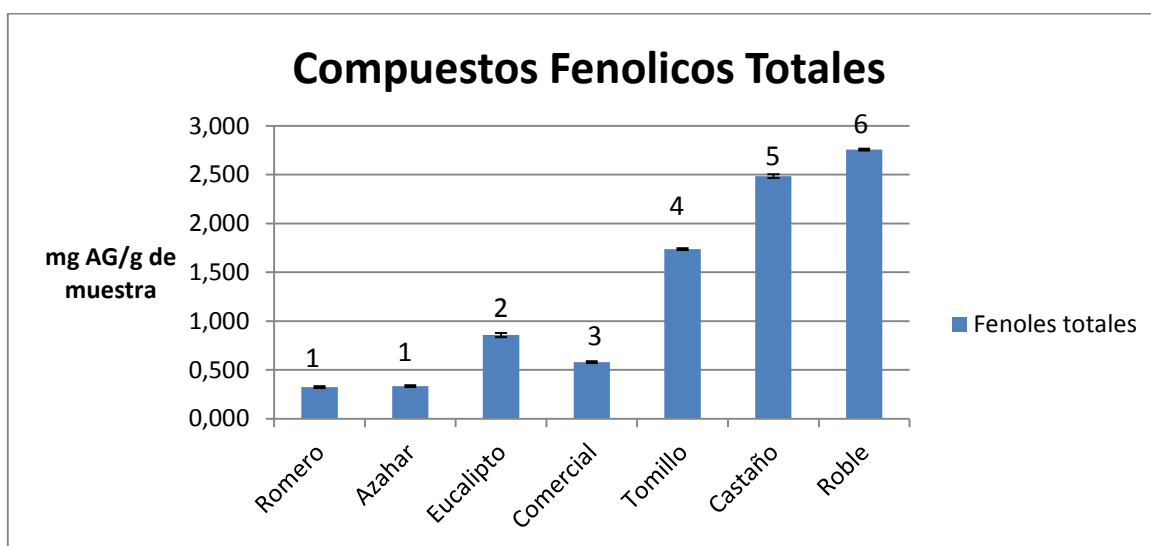


Figura V: Compuestos fenólicos totales

Los grupos obtenidos en el análisis ANOVA con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$  para los fenoles totales se representan en la tabla con números.

En nuestro caso, cuando se hace el estudio estadístico ANOVA, para los fenoles totales todas las mieles son diferentes unas de otras excepto las mieles de romero y azahar que se pueden agrupar en un mismo conjunto, en el análisis se obtienen 6 grupos diferenciados. El primer grupo lo forman la miel de tomillo y azahar y los otros 5 grupos para cada una de las mieles analizadas.

En el estudio realizado por Das y col., (2015) comentado anteriormente llegaron a la conclusión que el contenido en polifenoles de las mieles están altamente relacionado con el color de dichas mieles, observaron una alta relación positiva entre ambos parámetros, ( $r=0.942$ ).

De la misma manera Ferreira y col., (2009) llegaron a la conclusión de que el aumento en la intensidad del color está directamente relacionado con un aumento en las propiedades antioxidantes y en los contenidos fenólicos de las muestras de mieles.

En el grafico VIII se muestra la relación entre la capacidad antioxidante y los polifenoles totales de las diferentes mieles.

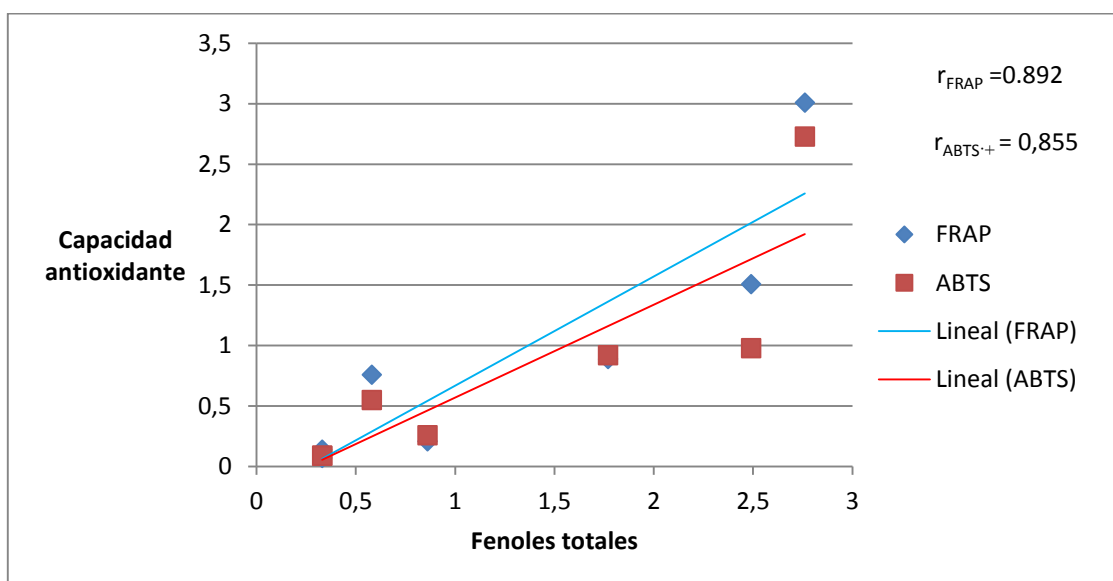


Figura VI: Relación entre la capacidad antioxidante y los polifenoles totales.

Según Vela y col. 2007 altos contenidos en polifenoles indican alta capacidad antioxidante. Como se puede observar en las figuras VI, esta relación se confirma en nuestro estudio cuanto mayor es la capacidad antioxidante de las mieles mayor es el contenido en compuestos fenólicos que presenta dicha miel, excepto en la miel comercial (miel mil flores), que teniendo una mayor capacidad antioxidante que la miel de eucalipto presenta un contenido en compuestos fenólicos inferior a la miel de eucalipto. Este hecho podía corroborar lo indicando anteriormente referente al posible aumento de la capacidad antioxidante debido a un tratamiento térmico intenso (Escriche y col., 2014).

La relación entre el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de las mieles se determinó por el coeficiente de correlación de Pearson (Tabla VII, pg. 81), así tenemos que para el método FRAP tenemos un índice de  $(r=0.892)$  mientras que para el método  $ABTS^{++}$  presenta una correlación  $(r=0.855)$ . Aunque aparentemente bajos, estos valores fueron superiores, sin embargo, a los obtenidos en otros estudios: Alves y col., (2013) para mieles portuguesas donde obtuvieron un índice de relación  $(r_{DPPH/PT}= 0.831)$  y  $(r_{FRAP/PT}=0.818)$ ; Cadanovic-Brunet y col., (2014) para mieles serbias  $(r_{DPPH/PT}= 0.845)$ ; Serem y Bester, (2012) para mieles Africanas  $(r_{DPPH/PT}= 0.72)$ ; Lachman y col., (2010) para mieles checas  $(r_{FRAP/PT}= 0.8522)$ ; Wilczyńska, (2012) para mieles polacas  $(r_{ABTS/PT}= 0.88)$ ; Niawali y col., (2015) para mieles de Zambia  $(r_{FRAP/PT}= 0.859)$ .

Sin embargo, los datos obtenidos en nuestro estudio sobre la relación del contenido en fenoles y la capacidad antioxidante fue inferior al obtenido, Rosa y col., (2011) para mieles italianas donde tienen un índice de relación ( $r_{\text{FRAP/PT}} = 0.9636$ ) y ( $r_{\text{ABTS/PT}} = 0.8920$ ); Bertoncelj y col., (2007) para mieles eslovacas ( $r_{\text{FRAP/PT}} = 0.966$ ) y ( $r_{\text{DHHP/PT}} = 0.932$ ).

El hecho de no encontrar correlaciones superiores puede ser debido a que en las mieles, además de los compuestos fenólicos, existen otros compuestos antioxidantes en su composición, por ejemplo, las vitaminas, como pueden ser la vitamina E y la vitamina C, a pesar de que el contenido de vitaminas en la miel varía en función del grado de filtrado de la miel, ya que son compuestos que proceden mayoritariamente de los granos de polen presentes en la miel.

El contenido de polen de las mieles también varía en función del origen floral, así por ejemplo, Seijo y col., (2011) llegaron a la conclusión, obvia, que las mieles florales tienen un mayor contenido en polen que las mieles de mielada, y que dentro de un mismo origen floral va a depender de la estación del año en la que florezcan, así tenemos una mayor cantidad de polen en aquellas mieles que se obtienen de plantas que florecen en verano que las que florecen en primavera.

Otros compuestos presentes en la composición de la miel con propiedades antioxidantes son las enzimas que sirven como antioxidantes mediante la promoción de la eliminación de oxígeno (Oszmianski y Lee, 1990).

## 9. Inhibición del pardeamiento enzimático

El tercer objetivo de este estudio, fue seleccionar aquellas dos mieles que presentaban una mayor capacidad antioxidante (castaño y roble) con el propósito de evaluar su utilización como conservante natural para medir el porcentaje de inhibición enzimática en puré de manzana. A su vez, se seleccionó un tercer tipo de miel (eucalipto), de diferente origen floral que las dos anteriores y cuya capacidad antioxidante fuera intermedia entre las siete muestras evaluadas anteriormente, para comprobar si existe correlación entre la capacidad antioxidante de las muestras y la capacidad de las mismas para inhibir el pardeamiento enzimático en puré de manzanas.

Al mismo tiempo se prepara una cuarta muestra de puré, pero en este caso utilizamos como conservante ácido ascórbico, uno de los compuestos químicos que más se usan en la industria alimentaria para la inhibición del pardeamiento enzimático, para poder comparar la eficacia de la miel en la inhibición del pardeamiento frente al ácido ascórbico.

La capacidad de inhibir el pardeamiento enzimático en puré de manzanas fue ensayada con una concentración de un 2 % de miel para cada una de las muestras a analizar. En el caso del ácido ascórbico se utiliza una concentración de un 1% (Omidiji y Okpuzor,1996).

Paralelamente se prepara un control positivo en el que no se añade nada al puré de manzana y un control negativo en el que se somete al puré de manzana a ebullición para inactivar la polifenoloxidasas.

La diferencia de absorbancia medida a una  $\lambda=420$  nm de ambos controles es considerado el 100 % de inhibición del pardeamiento enzimático.

En la tabla VI se muestran los valores obtenidos para cada una de las muestras de miel y la muestra de ácido ascórbico expresados en % de inhibición (media  $\pm$  desviación estándar de las dos repeticiones) del pardeamiento de la muestra.



Tabla VI: % de inhibición del pardeamiento en puré de manzanas

Tipo de mieles	% inhibición del pardeamiento
Ácido Ascórbico	163.3 ±23.6
Eucalipto	-87.5± 9.1
Castaño	-6.4±25.1
Roble	23.8±12.6

Como podemos observar en la tabla VI solo la miel de roble ha conseguido inhibir el pardeamiento enzimático en puré de manzana en un 23.8 %.

En la misma tabla observamos que existe mucha variación respecto a las dos repeticiones de una misma muestra de miel, esto es debido a que hubo problemas en el centrifugado de la muestra, ya que, la centrifuga de la que disponíamos solo llegaba a 8000 rpm, en lugar de las 18500 x g que utilizaron Vela y col., (2007) en su estudio y en la mayor parte de los autores consultados.

Este parámetro influye en que microscópicas partes solidas de la muestra se pudieron filtrar a las cubetas de cuarzo, produciendo una variación en la lectura de la absorbancia. De hecho, hay que señalar que en uno de los dos ensayos realizados en la miel de Castaño se obtuvo un resultado positivo respecto a la inhibición del pardeamiento enzimático, 11.38 (ANEXO III).

Por lo tanto, habría que considerar que este tipo de miel también podría ser utilizado para prevenir el pardeamiento enzimático en purés de manzana. Hay que tener en cuenta que las dos mieles que han conseguido inhibir el pardeamiento enzimático son mieles muy oscuras y al aumentar la concentración de la miel podría interferir en la medida espectrofotométrica del pardeamiento. Vela y col., (2007), llegaron a la conclusión que al aumentar la concentración de las mieles se observó un aumento en la inhibición del pardeamiento enzimático aunque no seguía un patrón estable, ya que el color oscuro de las mieles interfería en los resultados.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio siguen la misma tendencia que los obtenidos por Chen y col., (2000) para mieles de EEUU en purés de manzana, Vela y col., (2007) para mieles españolas en zumos de manzana y en puré de manzana y Nyawali y col., (2015) para mieles de Zambia en repollo blanco, ya que, todos los

autores describen que el porcentaje de inhibición enzimática es mayor en las mieles de mielada que en mieles florales.

Los resultados obtenidos para las mieles de mielada en nuestro estudio fueron similares a los descritos por Chen y col., (2000) utilizando mieles de EEUU para inhibir el pardeamiento enzimático en puré de manzanas, describiendo inhibiciones 2-45 % ó 2.5-12 unidades de dorado, si bien las mieles de origen floral también conseguían inhibir el pardeamiento enzimático, mientras en nuestro caso la miel de eucalipto no consiguió inhibir el pardeamiento enzimático, (-87.5 %) (Tabla VI).

Por el contrario nuestros resultados fueron inferiores a los descritos por Vela y col., (2007) quienes utilizaron mieles españolas de diferente origen floral dando valores del 33.7 % de las mieles florales y de un 57.9 % para mieles de mielada.

Niawali y col., (2015) evaluaron la capacidad de inhibición del pardeamiento en repollo blanco utilizando mieles de Zambia, y describiendo porcentajes de inhibición muy superiores a los descritos en este trabajo variaban entre 21-69 % más si cabe teniendo en cuenta que las mieles utilizadas por Niawali y col. eran mieles de origen floral y la miel de eucalipto de origen floral no consiguió inhibir el pardeamiento.

Oszmianski y Lee, (1990) estudiaron el efecto de la miel en la inhibición del pardeamiento enzimático en rodajas de manzana y jugos de uvas. Como agente para la inhibición del pardeamiento enzimático de rodajas de manzana además de la miel se utilizó sacarosa y agua. El porcentaje de inhibición en rodajas de manzanas después de dos horas de incubación fue de 62 % para la miel y de un 23% para la sacarosa. Estos valores fueron superiores a los de este estudio, ya que la miel de mayor porcentaje de inhibición fue la miel de roble con un 23.8 %. También trataron las rodajas de manzana con miel a diferentes concentraciones llegando a la conclusión que cuanto mayor era la concentración de miel utilizada mayor el porcentaje de inhibición enzimática.

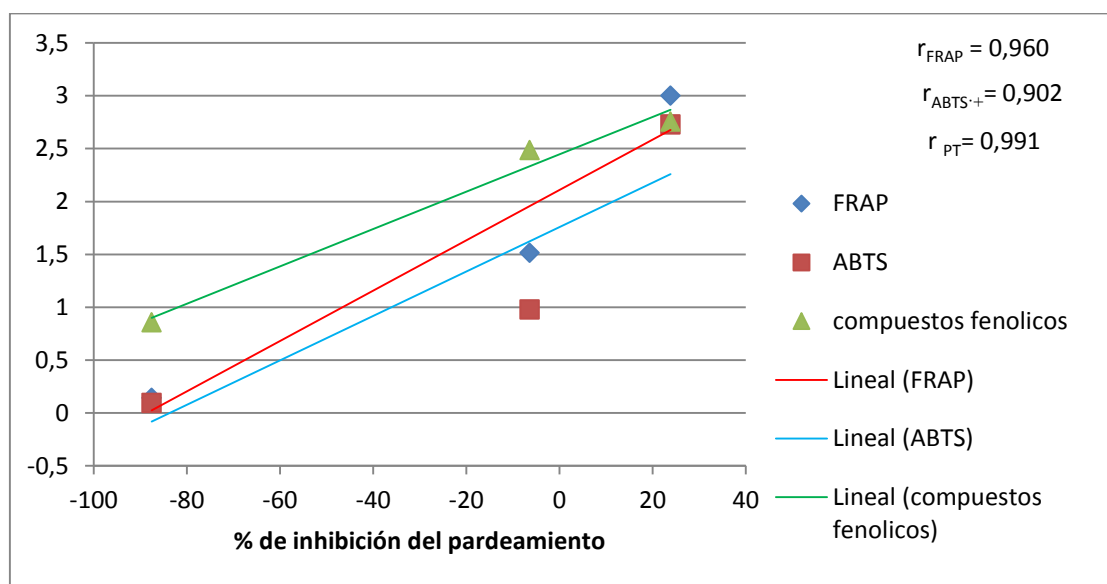
de la Rosa y col., (2011) evaluaron la inhibición del pardeamiento enzimático en zumos de manzana con extracto de miel, ácido cafeico, cisteína y 4-hexilresorcinol. El extracto de miel fue uno de los compuestos más eficaces consiguiendo una inactivación de la polifenoloxidasas de forma rápida. Hay que considerar que no se utilizó la miel como tal sino un extracto de miel rico en polifenoles, dicho extracto se utilizó en menores concentraciones que las utilizadas en el estudio de Chen y col., (2000) para las mieles.

La eficacia de las mieles en la inhibición del pardeamiento enzimático va a depender del origen botánico y del color de las mieles, es decir, cuanto más alta sea la capacidad antioxidante de las mieles más eficaz será la miel en la inhibición del pardeamiento enzimático. Sin embargo, a pesar de que con la utilización de mieles de mielada se consigue inhibir el pardeamiento enzimático de purés de manzana, su eficacia como conservante natural en este campo está muy alejada de otros conservantes como por ejemplo, el ácido ascórbico que como vemos en la tabla VI tienen un porcentaje de inhibición del pardeamiento bastante alto (163.3 %) dando incluso mejores resultados que el control (-). Este valor tan elevado se puede justificar por el alto porcentaje de ácido ascórbico utilizado en la muestra, ya que, en este estudio hemos utilizado 1 % de ácido ascórbico (Omidiji y Okpuzor, 1996) mientras que en los estudios realizados por Chen y col., (2000) y Vela y col., (2007) utilizaron un porcentaje diez veces menor, es decir, 0,1 % de la muestra.

En el estudio de Chen y col., (2000) utilizando como conservante natural ácido ascórbico la inhibición del pardeamiento enzimático aumento en 15 unidades de dorado respecto a los resultados obtenidos para la miel, sin embargo cuando utilizaron los dos conservantes a la vez el aumento de la inhibición fue de 20 unidades de dorado, confirmando un efecto sinérgico de los mismos.

Lo que se confirma en nuestro estudio es que existe una relación positiva entre la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales de las mieles con el porcentaje de inhibición del pardeamiento en purés de manzana. Cuanto más altos sean los valores de la capacidad antioxidante y de polifenoles totales mayor será el porcentaje de inhibición del pardeamiento. También hay relación con el origen floral de las mieles porque las únicas mieles que han conseguido inhibir el pardeamiento enzimático son las mieles de miel

En el figura VII vemos de forma grafica la relación positiva entre la capacidad antioxidante y polifenoles totales con el porcentaje de inhibición de las muestra de miel.



**Grafico VII: Relación entre la capacidad antioxidante y polifenoles totales con el % de inhibición del pardeamiento**

En la tabla VII se muestran los coeficientes relación de pearson entre los diferentes parámetros analizados en las mieles.

**Tabla VII: Coeficiente de relación de pearson**

	% inhib	PT	ABTS**	FRAP
FRAP	0,960	0,892	0,983	
ABTS**	0,902	0,855		
PT	0,991			
% inhib				

Dato: PT Polifenoles Totales

A pesar de que, como hemos comentado antes, los resultados obtenidos de inhibición de pardeamiento han sido inferiores a los descritos por otros autores, el coeficiente de correlación entre los polifenoles totales y el % de inhibición enzimática ( $r = 0.991$ ) fueron superiores a los descritos por Vela y col., (2007) donde describieron una correlación de ( $r = 0.347$ ).

En el estudio realizado por Nyawali y col., (2014), citado anteriormente, se observó una relación lineal entre la reducción del pardeamiento enzimático y los parámetros del color. Llegando a la conclusión que dos de los tres parámetros del color analizados ( $L^*$ ; luminosidad y  $a^*$ ; enrojecimiento de la miel) afectaban en la inhibición del pardeamiento. La reducción del pardeamiento enzimático aumentaba a medida que disminuía la luminosidad ( $L^*$ ) y aumentaba con el enrojecimiento de la miel ( $a^*$ ), mientras que para el tercer parámetro del color analizado  $b^*$  (color amarillo), no se encontraron efectos significativos en el pardeamiento. Estos resultados muestran que tanto la luminosidad, como el enrojecimiento marcan la capacidad de una miel para inhibir el pardeamiento enzimático.

En nuestro estudio sin haber evaluado los parámetros del color de las diferentes mieles estudiadas se puede llegar a la misma conclusión que en el estudio realizado por Nyawali y col., (2012) cuanto más oscuras sean las mieles mayor será el porcentaje de inhibición del pardeamiento enzimático.

## **V CONCLUSIONES**

Una vez analizados los resultados de este estudio se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la capacidad antioxidante y polifenoles totales de las mieles

- No se encuentran diferencias significativas entre los dos métodos empleados para medir la capacidad antioxidante. Aunque los valores varían en función del método que se utilice, la capacidad antioxidante de las mieles por ambos métodos siguen la misma tendencia.
- Tanto el método FRAP como el método ABTS<sup>+</sup> se pueden considerar métodos válidos para determinar la capacidad antioxidante de la miel y se obtiene un adecuado coeficiente de correlación entre ambos métodos.
- Tanto la actividad antioxidante de las mieles como su contenido en polifenoles totales varía en función de su origen botánico. Los grupos significativamente diferentes están correlacionados con el color de las mieles.
- La miel de roble, la única que puede considerarse estrictamente mielada, es significativamente diferente a todas las demás en todos los parámetros analizados.
- La correlación positiva que presenta la capacidad antioxidante y el contenido en fenoles totales ( $r=0.892$ ) evidencia la capacidad que tiene esta familia de compuestos para ejercer una acción antioxidante.

2. Respecto a la Inhibición del pardeamiento enzimático

- De las tres mieles utilizadas sólo las mieles de mielada conseguían inhibir el pardeamiento enzimático en purés de manzana. A pesar de ello, su eficiencia está muy alejada de otros conservantes naturales como el ácido ascórbico, utilizado en este trabajo.
- El porcentaje de inhibición del pardeamiento enzimático en puré de manzanas está relacionado con el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las mieles, cuanto más elevados sean los valores de estos parámetros más elevado el porcentaje de inhibición enzimática

## VI BIBLIOGRAFÍA



- Aguilera, G.; Gil, F.; González, A.; Nieves, B.; Rojas, Y. y Vit. P. (2006). ¿Por qué se estudia la actividad antibacteriana de las mieles?. En: Iniciación a la Apiterapia. APIBA-CDCHT; Mérida, Venezuela; 32 pp.
- Alcalá, M. (1977). Actividad de agua de la miel y crecimiento de microorganismos osmotolerantes. Trabajos científicos de la universidad de Córdoba, 20, 1-19.
- Aljadi, A.M. y Kamaruddin, M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant and capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chemistry. 85, 513-518.
- Almeida da Silva, I.A.; Sarmiento da Silva, T.M.; Camara, C.A.; Queiroz, N., Magnani, M. y Santos de Novais, J. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. Food Chemistry. 141, 3552-3558.
- Al- Mamary, M.; Al-Meeri, A. y Al-Habori, M.(2002). Antioxidant activities and total phenolic of different types of honey. Nutrition Research. 20, 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J.M.; Tulipani, S., Díaz, D.; Estevez, Y. y Romandini, S. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with colour, polyphenol content and other chemical compounds. Food and Chemical Toxicology. 48, 2490-2499.
- Alves, A.; Ramos, A.; Margaride Gonsalves, M.; Bernardo, M. y Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content on Portuguese monofloral honeys. Journal of Food Composition and Analysis. 30, 130-138.
- Anklam, E. (1998). A review analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry. 63, 549-562.
- Auroma, O.I. (1999). Free radicals, antioxidant international nutrition. Asia Pacific J. Clin. Nutr, 8, 53-63.
- Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O. y Baker, R.A. (1995). Edibles coatings for lightly processed fruits and vegetables. Hortscience. 30,35-38.

- Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.O.; Chen, X. y Hagenmaier, R.D. (1996). Improving storage-life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*. 9, 151-163.
- Bello Gutiérrez, J. (2000). *Ciencia de la Bromatología. Principios generales de los alimentos*. Ed. Díaz de Santos. Madrid.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997) *Química de los alimentos* (2º edición). Acirbia, S.A. Zaragoza.
- Benzie Iris, F.F. y Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of " antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
- Berretta, G.; Granata, P.; Ferrero, M.; Orioli, M. y Facino, R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytical Chemical Acta*. 533, 185-191.
- Bertoneclj, J.; Dobersek, U.; Jamnik, M. y Golob, T. (2007). Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honeys. *Food Chemistry*. 105, 822-828.
- Bisbi, R.H.; Booke, R. y Navaratnam, S. (2008). effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Science direct*, 108, Pg: 1002-1007.
- Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Food science and technology*, 30. pg: 748-753.
- Bogdanov, S. (2002). *Harmonised methods of the international honey Commission: Introduction and General Comments on the Methods*, Switzerland.
- Bogdanov, S.; Ruoff, K. y Persano Oddo, L. (2004). Physico-Chemical methods for the characterization of unifloral honey: A review. *Apidologia*, 35, S4-S17.
- Campos, G.M. (1987). Contribuição para o estudo do mel, polen, geleia real e propolis. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, 11 (2), 17-47.
- Canadanovic-Brunet, J.; Cetkovic, G.; Tumbas Saponjac, V.; Stajcic, S.; Vulic, J.; Djilas, S.; Stajner, D. y popovic, B. (2014). Evaluation of phenolic content antioxidant activity and sensory characteristics of Serbian honey- based product. *Industrial Crops and Products*. 62, 1-7

- Cano, P.; Marin, M.A. y Fuster, C. (1990). Effects of some thermal treatments of polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 51, 223-231.
- Cheftel, J.C. y Cheftel, F. (1976). Pardeamiento enzimático y tratamientos físicos en introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Editorial Acribia. España.
- Chen, L.; Mehta, A.; Berenbaum, M.; Zangerl, A.R. y Engeseth, N.J. (2000). Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruits and vegetables homogenates. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4997-5000.
- Cherchi, A.; Porcu, M. y Tuberoso, G. (1994). Influenza dell'invecchiamento sulla qualità de miele. XVI Congresso Nazionale di Merceologia, Pavia, 310-319.
- Código alimentario español. (1967).
- Crane, E. (1975). Honey: A Comprehensive survey. International bee Research Association (IBRA). Ed. Heinemann. (Londres).
- Das, A.; Datta, S.; Mukherjee, S.; Bose, S. y Ghosh, S. (2015). Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of sesamum indicum honey containing phenolic compounds and lignans. *Food Science and Technology*. 61, 240-250.
- de Ancos, B.; Cano, P.; Hernández, A. y Monreal, M. (1999). Effects of microwave heating on pigment composition and colour of fruits purees. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 663-670.
- Delange, R.J. and Glazer, A.N. (1989). Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry* 177: 300–306.
- Dorantes-Álvarez, L. y Chiralt, A (2000). Color of minimally fruits and vegetables and affected as some chemical biochemical changes
- Dold, H.; Du, D.H. y Dziao, S.T. (1937). Nachweis antibakterieller hitzeund lichtempfindlicher hemmungsstoffe (inhibine) im naturhonig blütenhonig. *Z. Hyg. infektionskr*, 120, 155-167.

- Duthie, G.G.; Duthie, S.J. y Kyle, J.A.M. (2000). plant polyphenol in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidant. *Nutrition research Reviews*, 13, 79-106.
- Eduarda María Flora Zandamela Mungoi. (2008). Tesis Doctoral. Caracterización fisicoquímica y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Barcelona.
- Escuredo, O.; Míguez, M.; Fernández - González, M. y Seijo, M.C. (2013). Nutritional Value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area *Food Chemistry*. 138, 851-856.
- Esteban -Quilez, M.A. y Marcos Barradas, A. (1996). Water activity of honey and the growth of osmotolerant yeast (in Spain). *Anales de Bromatología*, 28, 33-34.
- Escriche, I.; Kadar, B.; Juan-Borrás, M. y Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*. 142, 135-143.
- Estevinho, L.; Pereira, A.P.; Moreira, L.; Dias, L.G. y Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and chemical Toxicology*. 46, 3774-3779.
- Ferreiras, I.; Aires, E.; Barreira, J. y Estevinho, L. (2009). Antioxidant activity of portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. 114, 1438-1443.
- Frankel, S.; Robinson, G.E. y Berenbaun, M.R. (1998). "Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys", *Journal of Apicultural Research* 37:27-31.
- Frias, I. y Hardisson, A. (1992). Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel: humedad, acidez e índice de formol, hidroximetilfurfurano e índice de diastasa. *Alimentaria*, mayo, 71-74.
- García, M.Y. y Zago, K. (2006). ¿Podemos obtener vitaminas de los productos de la colmena?. 16-17 pp. En: *Iniciación a la Apiterapia*. APIBA-CDCHT Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela; 32 pp.
- Gil, M.I.; Ferreres, F.; Ortiz, A.; Subra, E. y Tomás -Barberan, F.A. (1995). Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43, 2833-2838.

- Gorganovic, S.Z.; Álvarez - Suarez, J.M.; Novakovic, M.M.; Pastor, F.T., Pezo, L.; Battino, M. y Suznjevic, D.Z. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*. 30, 13-18.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3 Ed. Oxford University Press, New York.
- <http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/legislacion/subdetalle/miel.shtm>. (Consultada Diciembre 2014).
- Ignat, I.; Volf, I. y Popa, I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *food Chemistry*. 126, 1821-1835.
- Jasicka-Misiak, I.; Poliwoda, A.; Derén, M. y Kafarski, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral original two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*. 131, 1149-1156.
- Jiménez, M.; Mateo, J.J.; Huerta, T. y Mateo, R. (1994). Influence of the storage conditions on some physicochemical and mycological parameters of honey. *journal science food agriculture*, 64, 67-74.
- kähkönen, M.P y Heinonen, M. (2003). Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglicones. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 53, 628-633.
- Krauze, A. y Krauze, J. (1991). Changes in chemical composition of store honeydew honeys. *Acta alimentaria Polonica*, Vol XVII/ XLI, nº2, 119-125.
- Lachman, J.; Orsak, M.; Hejtmankova, A. y Kovarova, E. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolic of select Czechs honeys. *Food Science and Technology*. 43, 52-58.
- Larson, RA. (1998). The antioxidants of higher plants. *Photochemistry*. 27: 969-978
- Laurila, E.; Kervinen, R.; Ahvenainen, R. (1998). The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest new and information*. 9, 53-66.
- Leveau, J.Y. y Bouix, M. (1979). Study of the extreme growth conditions for osmophilic yeast (in French). *Industries alimentaires et agricoles*, 96, 1147-1150.

- Liu, J.R.; Ye, Y.L.; Lin, T.H.; Wang, Y.W. y Peng, C.C. (2013). Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chemistry*. 139, 938-943.
- Lopez-Alarcon, C. y Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural product: A review of chemical and cellular-based assays. *Analytical Chemical Acta*. 763, 1-10.
- Louveaux, J. (1985). Le miel. *Cah. Nutr. Diét.*, XX, 1, 57-70.
- Martínez, C.M., Sánchez. (2001). Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. En *Nutrición clínica: Implicaciones del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales*. 1 ed. Mc Graw-Hill. Madrid.
- Martos, I.; Ferreres, F.; Yao, L.; D'Arcy, B.; Caffin, N. y Tomás-Barberán, F.A. (2000). Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4744-4748.
- McEvily, A.J.; Iyengar, R. y Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in food science and nutrition*. 32, 253-273.
- McHugh, T.H. y Senesi, E. (2000). Apple Wraps. A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*. 65, 480-485.
- Montes, A.L. (1966). *Bromatología II*. Ed. Universitaria, Buenos Aires.
- Nyawali, B.; Chungo, D.; Chisha-Kasumu, E.; Vinya, R.; Chileshe, F. y Ng'andwe, P. (2014). Enzymatic browning reduction in white Cabbage (*Brassica oleracea*) using honey: Does honey color matter?. *Food Science and Technology*. 1-7.
- Nicolas, J.J., Richart-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. y Aubert S.I. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*. 34, 109-157.
- Olivas, G.I.; Rodríguez, J.J. y Barbosa-Canovas, G.V. (2002). Effect on polysaccharide and polysaccharide-fatty acid based edible films on coated pear wedges during refrigeration storage. *Annual Meeting and Food Expo-anaheim, California*, 30G-30.

- Oszmianski, J. y Lee, C.Y. (1990). Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 38, 1892-1895.
- Parker, D.V. (1999). Nutrition antioxidant and disease prevention: Mechanisms of action in: *Antioxidants in human health and disease*. Ed. T.K., Canadá. 1-13.
- Pérez Cabrera, L.E. (2002). Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo enzimático en pera (Variedad *Blanquilla*) mínimamente procesada. Tesis Doctoral. Universidad politécnica de Valencia. Valencia.
- Perez-Arquillué, C.; Conchello, P.; Ariño, A.; Ucar, A. y Herrera, A. (1990). Estudio de algunos parámetros fisicoquímicos en mieles mono-florales de Zaragoza. *Alimentaria*, Junio. 59-61.
- Piana, G.; Ricciardelli, G. y Isola, A. (1989). La miel. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid. 21-45.
- Pietta, P. (1999). Dietary flavonoids and antioxidant protection. *Natural Antioxidant and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. 137-140.
- Posada, M.; Pineda, V. y Agudelo, G.M. Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas. El chocolate y su contenido de antioxidantes. Universidad de Antioquia (Colombia).
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- Rice-Evans, C. (1999). 16 – Screening of Phenolic and Flavonoids for Antioxidant Activity. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. 239-253.
- Rodríguez, P. J.M., Menéndez, L.J.R. y Trujillo, L.Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cubana Med. Mil.* 30, 36-44.
- Rodríguez Flores, M.S.; Escuredo, O. y Seijo, M.C. (2015). Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrinaica* honeydew honeys. *Food Chemistry*. 166, 101-106.
- Rocha, A.M.C.N. y Morais, A.M.M.B. (2001). Influence and controlled atmosphere storage on polyphenoloxidase activity in relation to colour changes of minimally processed *Jonagoret* apple. *International Journal of Food Science and Technology*. 39, 425-432.

- Rosa, A.; Giovanni Tuberoso, C.I.; Atzeri, A. y Melis, M.P. (2011). Antioxidant profile of strawberry tree honey and its market homogenized acid in several model of oxidative stress. *Food Chemistry*. 129, 1045-1053.
- Rüegg, M. y Blanc, B. (1981). The water activity of honey and related sugar solutions. *Lebensm Wiss Technol*, 14, 1-6.
- Sapers, G.M. y Ziolkowski, M.A. (1987). Comparison of erithorbic and ascorbic acids as inhibitors of enzymatic browning in apple. *Journal on Food Science*. 52, 1732-1733.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical Scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*. 8:121.
- Sancho, M.T.; Muniategui, S.; Huidobro, J.F.; y Simal, J. (1991). Mieles del País Vasco I: pH y tipos de acidez. *Anales de la Bromatología*.
- Sanz, B y Trigueros, A. (1970). Composición y química y aspecto polínico de las mieles españolas. *Anales de bromatología*. XXII, 307-406.
- Seijo, M.C.; Escuredo, O. y Fernández - González, M. (2011). Fungal diversity in honeys from northwest Spain and their relationship to the ecological origin of the product.
- Serem, J.C. y Bester, M.J. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*. 133, 1544-1550.
- Serra, J. y Ventura, F. (1995). Characterization of citrus honey (*Citrus Spp.*) produced in Spain. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 43, 2053-205.
- Singleton, V.L. y Rossi, J. Jr. (1966). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *America Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
- Son, M.S.; Moon, K.C. y Lee, C.Y. (2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*. 73, 23-30.
- Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A., Auroma, O.I. y Bahorun, T. (2005). phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 579, 200-213.



- Teissedre, P.L. y Landrault, N. (2000). Wine phenolic: Contributions to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*. 33,461-467.
- Tomás-Barberan, F.A. y Espin, J.F. (2001). Phenolic compounds and relates enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 853-876.
- Tomás- Barbera, F.A.; Martos, I.; Ferreras, F.; Radovic, B.S. y Anklam, E. (2001). HPLC flavonoids profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 485-496.
- Torres, J.A. y Karel, M. (1985). Microbial stabilization moisture food surfaces III effects of surfaces pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analoge. *Journal of Food Processing and preservation*. 9, 107-119.
- Thomas, J.A. (2002). Estrés oxidativo y defensa antioxidante. En: *Nutrición en salud y enfermedad*. 9 ed. Mc Graw-Hill. Mexico.
- Tsiapara, A.V.; Jaakkola, M.; Chinou, I.; Graikou, K. y Tolonen, T. (2009). Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chemistry*. 116, 702-708.
- Turcomanos, M.; Sari, F.; Poyrazoglu, E.S. y Velioglu, Y.S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95,653-657.
- Valenzuela, A. (1999). Estrés oxidativo, una enfermedad de nuestro tiempo: El beneficio de la suplementación de la dieta con sustancias antioxidantes. Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos- Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- Valero-Ruiz, E. (1993). Caracterización cinética de la polifenoloxidasas de uva airén. Servicio de publicaciones de la universidad de Castilla La Mancha..
- Vela, L.; de Lorenzo, C. y Pérez, R.A. (2007). Antioxidant activity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and the other physicochemical properties. *Journal of the Science of food and agriculture*. 87, 1069-1075.

- Walker, J.R.L y McCallion, R.F. (1980). The selective inhibition of ortho and para-diphenol oxidases *Phytochemistry*. 19, 373-376.
- Wang, X.H.; Gheldof, N. y Engeseth, N.J. (2004). Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*. 69, 96-101.
- Weemaes, C.A.; Ludikhuyze, L.R.; Van de Broeck, I. y Hendrickx, M.E. (1999). Benzoic acid, glutathione, EDTA, 4-hexylresorcinol and sodium chloride on the pre-irradiation inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 3526-3530.
- Wilczynska, A. (2012). Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolic of honey. *Food Science and Technology*. 57, 767-764.
- Wolfe, K.L. y Liu, R.H. (2008). Structure- activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56. Pg: 8404-8411.
- White, J.W. Jr.; Riethof, M.L.; Subers, M.H. y Kuschnir, I. (1962). Composition of American honeys. *Techn. Bull. U.S. Dep. Agric.*, 1261.I.
- White, J.W, Jr. (1978) Honey. *Advances in food research*. Ed. Board. Academic Press. New York, San Francisco, London. 24, 287-335.
- White, J.W (1980). Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 63, 11-18.
- Yang, B.; Chen, F., Hua, Y.; Huang, S.S.; Lin, S., Wen, L. y Jiang, J. (2012). Prooxidant activities of quercetin, p-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure- activity relationship. *Food Chemistry*, 131, Pg: 508-512.
- Young, I.S. (2001). antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol*, 54, 176-186.
- Zamora, M.C. y Cherife, J. (2005). Determination of water activity change due to crystallization in honey from Argentina. *Food Control* in press.

## **ANEXO I**

## 1. Datos de la capacidad antioxidante

### 1.1 Método FRAP

Tabla A1: Absorbancia Trolox para la miel comercial

	blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Promedio
1 mM	-0,115	0,980	1,095	1,101
	-0,116	0,993	1,109	
	-0,113	0,985	1,098	
0,5 mM	-0,115	0,454	0,569	0,573
	-0,112	0,482	0,594	
	-0,113	0,443	0,556	
0,25 mM	-0,114	0,227	0,341	0,343
	-0,106	0,240	0,346	
	-0,115	0,228	0,343	
0,125 mM	-0,113	0,064	0,177	0,174
	-0,113	0,055	0,168	
	-0,095	0,081	0,176	
0,0625 mM	-0,113	-0,025	0,088	0,087
	-0,112	-0,026	0,086	
	-0,114	-0,028	0,086	
0,0312 mM	-0,110	-0,075	0,035	0,041
	-0,110	-0,064	0,046	
	-0,114	-0,071	0,043	

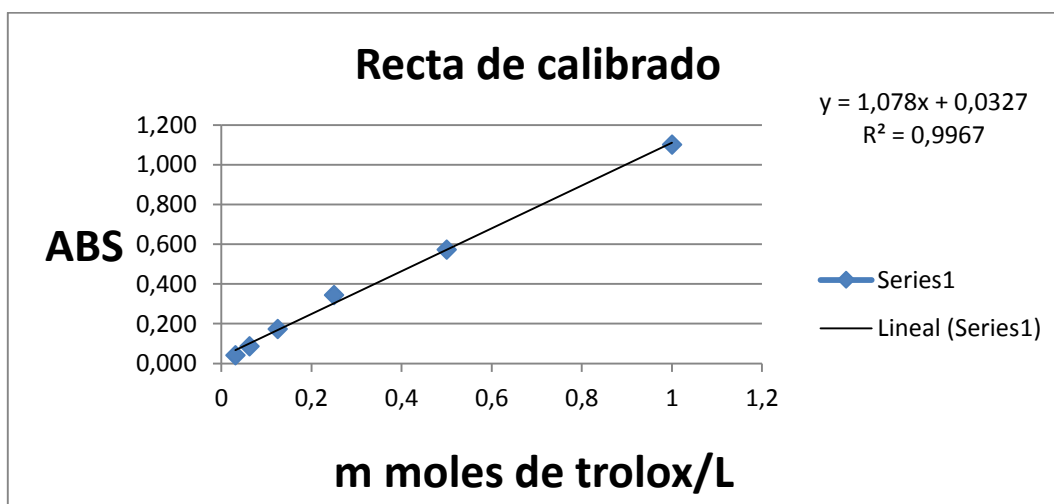


Grafico A1: Recta de calibrado Trolox: miel comercial

Tabla A2: Absorbencia de la miel comercial

	Miel comercial_Miel de flores			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media Abs real
0,52 g/ml	-0,114	0,301	0,415	0,413
	-0,113	0,297	0,410	
	-0,114	0,299	0,413	
0,46g/ml	-0,112	0,278	0,39	0,387
	-0,112	0,273	0,385	
	-0,110	0,275	0,385	
0,44 g/ml	-0,109	0,274	0,383	0,385
	-0,113	0,276	0,389	
	-0,111	0,271	0,382	

Tabla A3: Capacidad antioxidante de la miel comercial

Miel comercial_Miel de flores		
μM de trolox/ml	μM de Trolox/g	Desviación estándar
0,353	0,679	0,085
0,329	0,715	
0,327	0,874	
<b>Media</b>	0,756	

Tabla A4: Absorbancia TROLOX para miel de romero y azahar

	blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Promedio
1 mM	-0,001	1,019	1,020	1,025
	-0,016	1,015	1,031	
	-0,007	1,016	1,023	
0,5 mM	-0,009	0,305	0,314	0,565
	-0,007	0,821	0,828	
	-0,007	0,546	0,553	
0,25 mM	-0,005	0,354	0,359	0,339
	-0,006	0,325	0,331	
	-0,006	0,321	0,327	
0,125 mM	-0,005	0,175	0,180	0,213
	-0,007	0,232	0,239	
	-0,006	0,213	0,219	
0,0625 mM	-0,007	0,085	0,092	0,102
	-0,001	0,107	0,108	
	-0,006	0,101	0,107	
0,0312 mM	-0,007	0,038	0,045	0,050
	-0,007	0,045	0,052	
	-0,007	0,046	0,053	

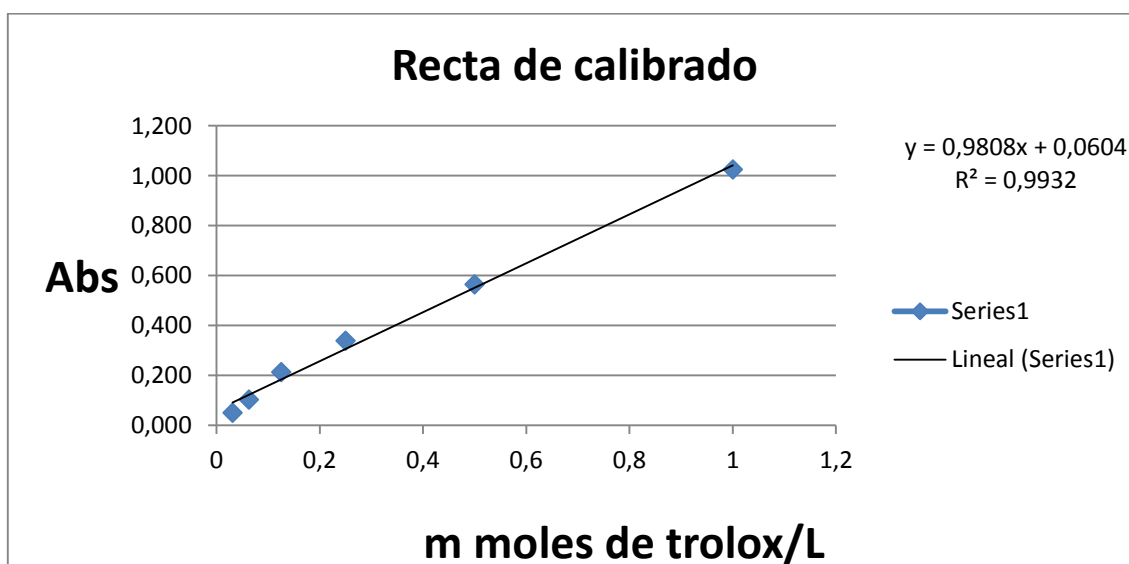


Gráfico A2: Recta de Calibrado TROLOX: miel de romero y azahar

Tabla A5: Absorbancia de miel de romero

	Miel de romero			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media Abs real
5,72 g/ml	-0,009	0,459	0,468	0,467
	-0,009	0,460	0,469	
	-0,009	0,454	0,463	
5,28 g/ml	-0,014	0,356	0,37	0,406
	-0,015	0,361	0,376	
	-0,014	0,458	0,472	
6,23 g/ml	-0,014	0,429	0,443	0,541
	-0,003	0,520	0,523	
	-0,013	0,643	0,656	

Tabla A6: Capacidad antioxidante de la miel de romero

Miel de romero		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,405	0,071	0,005
0,344	0,065	
0,479	0,077	
<b>Media</b>	0,071	

Tabla A6: Absorbencias miel de azahar

	Miel de azahar			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media Abs real
3,46 g/ml	-0,012	0,516	0,528	0,530
	-0,009	0,542	0,551	
	-0,008	0,504	0,512	
3,25 g/ml	-0,009	0,532	0,541	0,492
	-0,009	0,454	0,463	
	-0,012	0,461	0,473	
2,75 g/ml	-0,009	0,482	0,491	0,488
	-0,007	0,480	0,487	
	-0,004	0,483	0,487	

Tabla A7: Capacidad antioxidante de la miel de azahar

Miel de azahar		
$\mu\text{M}$ de trolox/ml	$\mu\text{M}$ de trolox/g	Desviación estándar
0,479	0,138	0,010
0,440	0,136	
0,436	0,159	
<b>Media</b>	0,144	

Tabla A8: Absorbancia TROLOX mieles eucalipto, tomillo, castaño y roble

	blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Promedio
1 mM	0,008	1,126	1,118	1,113
	0,012	1,123	1,111	
	0,011	1,120	1,109	
0,5 mM	0,011	0,598	0,587	0,632
	0,013	0,657	0,644	
	0,012	0,676	0,664	
0,25 mM	0,013	0,381	0,368	0,380
	0,014	0,417	0,403	
	0,013	0,383	0,370	
0,125 mM	0,014	0,206	0,192	0,186
	0,014	0,211	0,197	
	0,015	0,184	0,169	
0,0625 mM	0,015	0,113	0,098	0,086
	0,014	0,105	0,091	
	0,018	0,087	0,069	
0,0312 mM	0,014	0,054	0,040	0,038
	0,017	0,060	0,043	
	0,016	0,048	0,032	



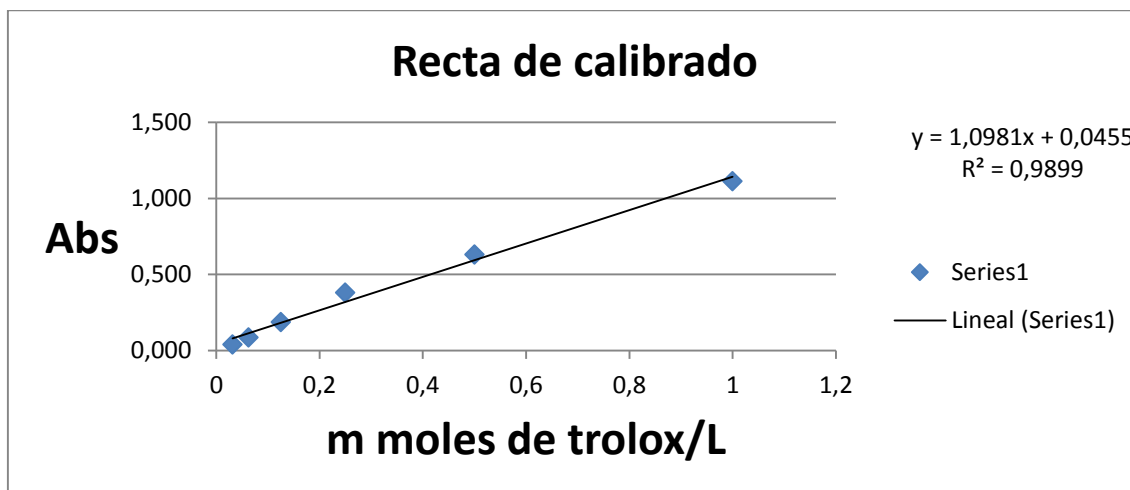


Grafico A3: Recta de calibrado TROLOX mieles de eucalipto, tomillo, castaño y roble

Tabla A9: Absorbancia miel de eucalipto

	Eucalipto			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media Abs real
4,8 g/l	0,024	0,883	0,859	0,935
	0,026	0,999	0,973	
	0,021	0,995	0,974	
3,72 g/l	0,019	0,932	0,913	0,909
	0,021	0,93	0,909	
	0,02	0,924	0,904	
3,18 g/l	0,022	0,888	0,866	0,861
	0,021	0,878	0,857	
	0,02	0,881	0,861	

Tabla A10: Capacidad antioxidante de la miel de eucalipto

Eucalipto		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,811	0,169	0,027
0,787	0,211	
0,743	0,234	
<b>Media</b>	0,205	

Tabla A11: Absorbancia de la miel de tomillo

	Tomillo			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media Abs real
1,06 g/l	0,022	1,012	0,99	1,038
	0,023	1,098	1,075	
	0,023	1,073	1,050	
0,95 g/l	0,023	0,998	0,975	0,975
	0,023	0,997	0,974	
	0,025	1,002	0,977	
0,92 g/l	0,022	0,987	0,965	0,971
	0,025	0,992	0,967	
	0,014	0,995	0,981	

Tabla A12: Capacidad antioxidante de la miel de tomillo

Tomillo		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,905	0,853	0,026
0,847	0,892	
0,843	0,917	
<b>Media</b>	0,887	

Tabla A13: Absorbancia miel de Castaño

	Castaño			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media Abs real
0,58 g/l	0,017	0,935	0,918	0,967
	0,017	0,976	0,959	
	0,018	1,041	1,023	
0,53 g/l	0,018	0,938	0,92	0,932
	0,017	0,972	0,955	
	0,016	0,937	0,921	
0,46 g/l	0,030	0,865	0,835	0,836
	0,018	0,863	0,845	
	0,016	0,845	0,829	

Tabla A14: Capacidad antioxidante de la miel de castaño

Castaño		
$\mu\text{M}$ de trolox/ml	$\mu\text{M}$ de trolox/g	Desviación estándar
0,839	1,447	0,049
0,808	1,524	
0,721	1,567	
<b>Media</b>	1,513	

Tabla A15: Absorbancia miel de roble

	roble			
	Blanco cubeta	Abs 6	Diferencia	Media abs real
0,30 g/l	0,020	0,945	0,925	0,932
	0,022	0,956	0,934	
	0,02	0,957	0,937	
0,26 g/l	0,022	0,934	0,912	0,913
	0,032	0,945	0,913	
	0,024	0,939	0,915	
0,24 g/l	0,023	0,928	0,905	0,907
	0,025	0,929	0,904	
	0,022	0,933	0,911	

Tabla A16: Capacidad antioxidante de la miel de romero

Roble		
$\mu\text{M}$ de trolox/ml	$\mu\text{M}$ de trolox/g	Desviación estándar
0,808	2,693	0,237
0,791	3,042	
0,785	3,270	
<b>Media</b>	3,001	

## 1.2 Método ABTS<sup>•+</sup>

Tabla A17: Absorbancia TROLOX miel comercial

	blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Promedio
1 mM	1,492	-0,021	1,513	1,512
	1,487	-0,029	1,516	
	1,494	-0,013	1,507	
0,5 mM	1,494	0,562	0,932	0,894
	1,488	0,617	0,871	
	1,489	0,609	0,880	
0,25 mM	1,489	1,048	0,441	0,455
	1,492	1,044	0,448	
	1,494	1,018	0,476	
0,125 mM	1,486	1,281	0,205	0,203
	1,489	1,294	0,195	
	1,485	1,277	0,208	
0,0625 mM	1,492	1,315	0,177	0,161
	1,486	1,323	0,163	
	1,482	1,338	0,144	
0,0312 mM	1,478	1,389	0,089	0,100
	1,487	1,385	0,102	
	1,476	1,367	0,109	

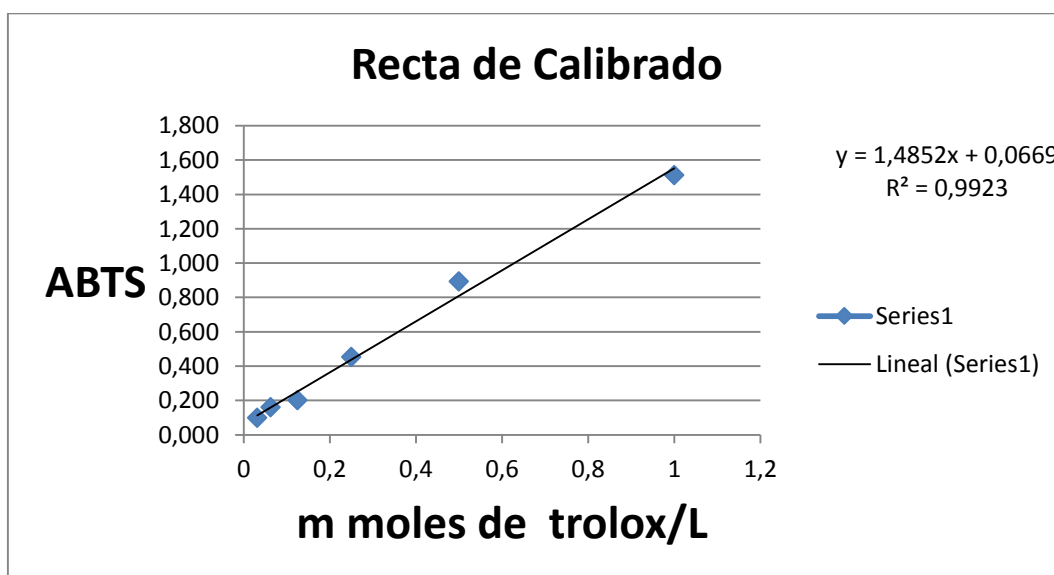


Tabla A4 Recta Calibrado TROLOX miel comercial

Tabla A18: Absorbancia miel comercial

	Miel Comercial_ Miel de flores			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media Abs real
0,68 g/l	1,485	0,912	0,573	0,545
	1,486	0,972	0,514	
	1,478	0,929	0,549	
0,56 g/l	1,490	0,931	0,559	0,553
	1,485	0,939	0,546	
	1,488	0,935	0,553	
0,54 g/l	1,485	0,945	0,540	0,542
	1,491	0,947	0,544	
	1,486			

Tabla A18: Capacidad antioxidante de la miel comercial

Miel comercial_ Miel de flores		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,323	0,475	0,066
0,328	0,585	
0,321	0,594	
<b>Media</b>	0,551	

Tabla A19: Absorbancia TROLOX para miel romero, azahar y eucalipto

	blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Promedio
1 g/l	1,492	-0,031	1,523	1,519
	1,487	-0,029	1,516	
	1,494	-0,023	1,517	
0,5 g/l	1,494	0,662	0,832	0,861
	1,488	0,617	0,871	
	1,489	0,609	0,880	
0,25 g/l	1,489	1,068	0,421	0,438
	1,492	1,074	0,418	
	1,494	1,018	0,476	
0,125 g/l	1,486	1,271	0,215	0,226
	1,489	1,274	0,215	
	1,485	1,237	0,248	
0,0625 g/l	1,492	1,345	0,147	0,155
	1,486	1,333	0,153	
	1,482	1,318	0,164	
0,03125 g/l	1,478	1,379	0,099	0,103
	1,487	1,385	0,102	
	1,476	1,367	0,109	

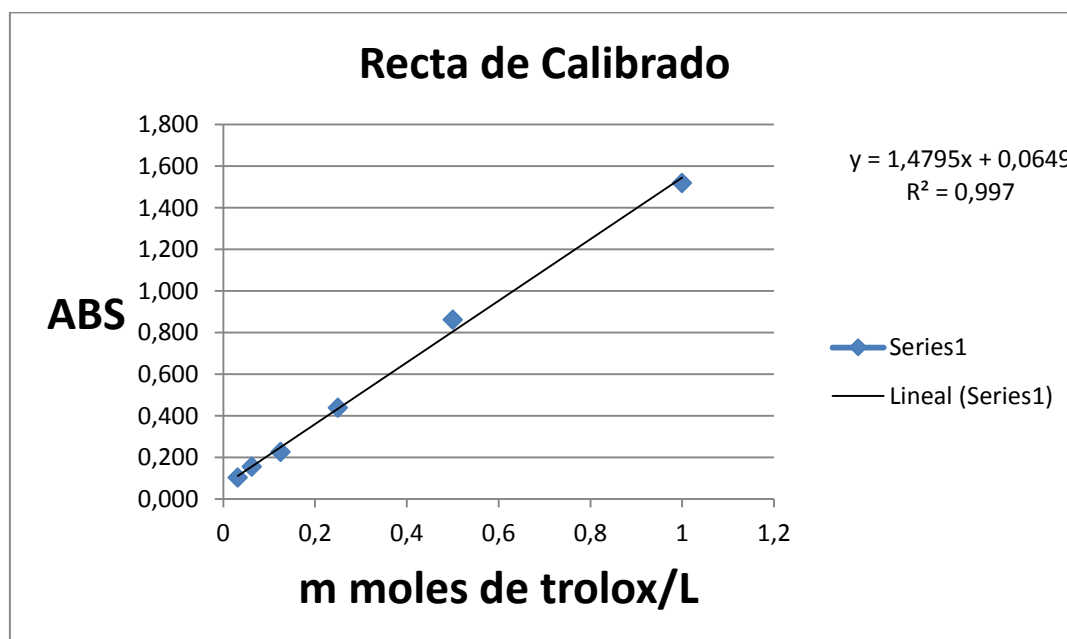


Grafico A5: Recta calibrado TROLOX miel de romero, azahar y eucalipto

Tabla A20: Absorbancia miel de romero

	Romero			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media Abs real
2,98 g/l	1,497	1,023	0,474	0,462
	1,486	1,033	0,453	
	1,486	1,028	0,458	
2,71 g/l	1,492	1,074	0,418	0,423
	1,491	1,062	0,429	
	1,486	1,064	0,422	
2,38 g/l	1,481	1,089	0,392	0,406
	1,481	1,065	0,416	
	1,486	1,076	0,410	

Tabla A21: Capacidad antioxidante de la miel de romero

Miel de romero		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,269	0,090	0,004
0,243	0,090	
0,231	0,097	
<b>Media</b>	0,092	

Tabla A22: Absorbancia miel de azahar

	Azahar			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media Abs real
2,26 g/l	1,489	1,115	0,374	0,381
	1,484	1,101	0,383	
	1,493	1,107	0,386	
2,19 g/l	1,494	1,117	0,377	0,377
	1,488	1,109	0,379	
	1,485	1,109	0,376	
2,17 g/l	1,484	1,189	0,295	0,341
	1,488	1,116	0,372	
	1,489	1,133	0,356	

Tabla A23: Capacidad antioxidante miel de azahar

Miel de azahar		
$\mu\text{M}$ de trolox/ml	$\mu\text{M}$ de trolox/g	Desviación estándar
0,214	0,095	0,006
0,212	0,097	
0,187	0,086	
<b>Media</b>	0,093	

Tabla A24: Absorbancia miel de eucalipto

	Eucalipto			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media abs real
2,13 g/l	1,488	0,557	0,931	0,927
	1,492	0,541	0,951	
	1,487	0,589	0,898	
2,10 g/l	1,491	0,592	0,899	0,866
	1,493	0,636	0,857	
	1,489	0,646	0,843	
2,05 g/l	1,492	0,656	0,836	0,825
	1,486	0,654	0,832	
	1,488	0,680	0,808	

Tabla A25: Capacidad antioxidante miel de eucalipto

Miel de eucalipto		
$\mu\text{M}$ de trolox/ml	$\mu\text{M}$ de trolox/g	Desviación estándar
0,583	0,274	0,012
0,542	0,258	
0,515	0,251	
<b>Media</b>	0,261	



Tabla A26: Absorbancia trolox para miel de tomillo, castaño y roble

	blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Promedio
1 g/l	1,498	-0,035	1,533	1,534
	1,502	-0,030	1,532	
	1,505	-0,033	1,538	
0,5 g/l	1,507	0,606	0,901	0,915
	1,506	0,616	0,890	
	1,502	0,549	0,953	
0,25 g/l	1,500	0,941	0,559	0,557
	1,499	0,944	0,555	
	1,498	0,940	0,558	
0,125 g/l	1,509	1,240	0,269	0,274
	1,506	1,242	0,264	
	1,504	1,215	0,289	
0,0625 g/l	1,498	1,345	0,153	0,149
	1,505	1,358	0,147	
	1,502	1,355	0,147	
0,03125 g/l	1,504	1,399	0,105	0,105
	1,501	1,398	0,103	
	1,497	1,391	0,106	

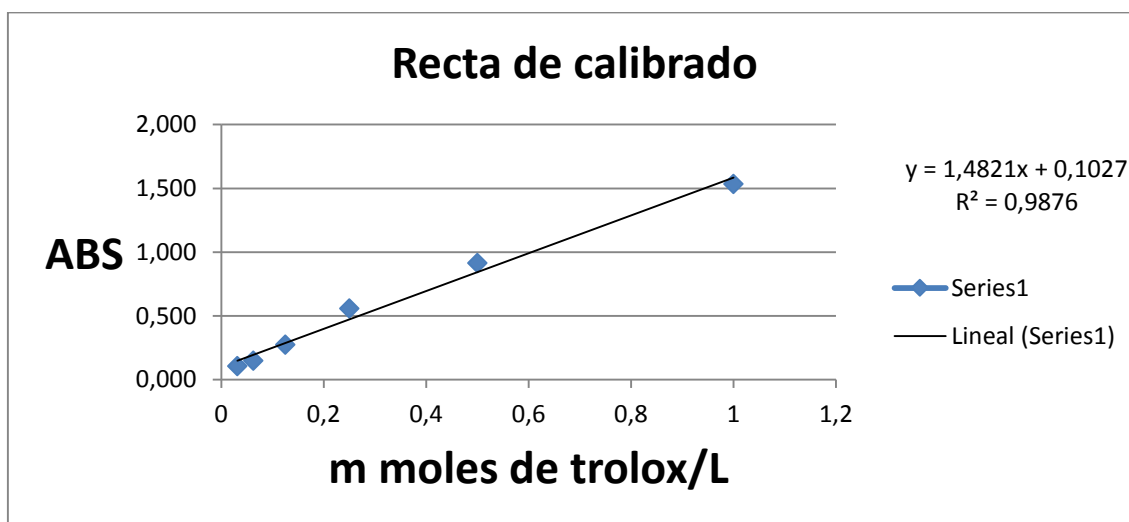


Grafico A6: Recta calibrado Trolox para miel de tomillo, castaño y roble

Tabla A27: Absorbancia miel de tomillo

	tomillo			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media Abs real
0,71 g/l	1,493	0,391	1,102	1,087
	1,499	0,389	1,110	
	1,489	0,441	1,048	
0,68 g/l	1,491	0,462	1,029	1,037
	1,493	0,449	1,044	
	1,495	0,456	1,039	
0,66 g/l	1,496	0,551	0,945	0,962
	1,489	0,519	0,970	
	1,494	0,522	0,972	

Tabla A28: Capacidad antioxidante miel de tomillo

Miel de tomillo		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,664	0,936	0,030
0,631	0,928	
0,581	0,880	
<b>Media</b>	0,915	

Tabla A29: Absorbancia miel de castaño

	castaño			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media Abs real
0,51 g/l	1,489	0,545	0,944	0,868
	1,491	0,649	0,842	
	1,495	0,676	0,819	
0,50 g/l	1,498	0,725	0,773	0,816
	1,492	0,702	0,79	
	1,497	0,612	0,885	
0,48 g/l	1,495	0,738	0,757	0,782
	1,499	0,657	0,842	
	1,494	0,748	0,746	

Tabla A30: capacidad antioxidante miel de castaño

Miel de castaño		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,517	1,014	0,032
0,482	0,964	
0,459	0,955	
<b>Media</b>	0,978	

Tabla A31: Absorbancia miel de roble

	roble			
	Blanco cubeta	Abs 3	Diferencia	Media abs real
0,34 g/l	1,488	0,195	1,293	1,293
	1,492	0,198	1,294	
	1,496	0,205	1,291	
0,32 g/l	1,498	0,197	1,301	1,307
	1,491	0,179	1,312	
	1,493	0,185	1,308	
0,25 g/l	1,495	0,169	1,326	1,319
	1,495	0,175	1,320	
	1,493	0,181	1,312	

Tabla A32: Capacidad antioxidante de miel de roble

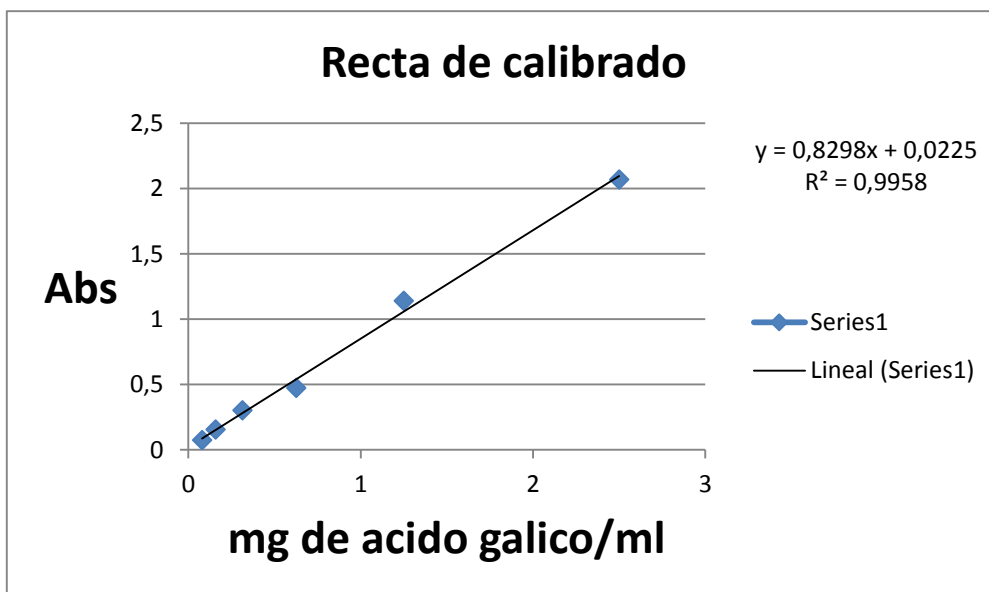
Miel de roble		
μM de trolox/ml	μM de trolox/g	Desviación estándar
0,803	2,363	0,489
0,813	2,541	
0,821	3,286	
<b>Media</b>	2,730	

## **ANEXO II**

## 2. Contenido en fenoles totales

**Tabla A33: Absorbancia del ácido gálico**

Concentración	Abs	Promedio
2,5 mg/ml	1,949	2,071
	2,193	
1,25 mg/ml	1,138	1,141
	1,144	
0,625 mg/ml	0,471	0,4735
	0,476	
0,3125 mg/ml	0,308	0,3025
	0,297	
0,15625 mg/ml	0,145	0,1565
	0,168	
0,078125 mg/ml	0,072	0,075
	0,078	



**Grafico A7: Recta calibrado del ácido gálico**

Tabla A34: Absorbancia de las mieles

Mieles	ABS
Romero (1 g/ml)	0,293
	0,291
Azahar (0,33g/ml)	0,115
	0,112
Eucalipto (0,33g/ml)	0,252
	0,261
Tomillo (0,14g/ml)	0,224
	0,223
Castaño (0,1g/ml)	0,227
	0,229
Roble (0,1g/ml)	0,251
	0,250
Comercial (0,5g/ml)	0,264
	0,259

Tabla A35: Polifenoles totales de las mieles

	mg de gálico/ml	mg de gálico/g	Media	Desviación estándar
Romero	0,326	0,326	0,325	0,002
	0,324	0,324		
Azahar	0,111	0,338	0,332	0,008
	0,108	0,327		
Eucalipto	0,277	0,838	0,855	0,023
	0,287	0,871		
Tomillo	0,243	1,734	1,730	0,006
	0,242	1,726		
Castaño	0,246	2,464	2,477	0,017
	0,249	2,489		
Roble	0,275	2,754	2,748	0,009
	0,274	2,742		
Comercial	0,291	0,582	0,576	0,009
	0,285	0,570		

## **ANEXO III**

### 3. Porcentaje de inhibición enzimática en puré de manzana

**Tabla 36: Absorbancia muestras de mieles**

Muestra	Abs	Medias
Control +	0,638	0,660
	0,682	
Control -	0,534	0,520
	0,505	
AA	0,454	0,431
	0,407	
Eucalipto	0,774	0,783
	0,792	
Castaño	0,694	0,669
	0,644	
Roble	0,614	0,627
	0,639	

**Tabla A37: % de inhibición del pardeamiento de las mieles**

Muestra	Inhibición enzimática	% de inhibición	Medias	Desviación estándar
Contr.(+) - Contr.(-)	0.1405	100		
Ácido Ascórbico	0.206	146.61	163.34	23.65
	0.253	180.07		
Eucalipto	-0.114	-81.13	-87.54	9.05
	-0.132	-93.95		
Castaño	-0.034	-24.19	-6.40	25.16
	0.016	11.38		
Roble	0.046	32.74	23.84	1258
	0.021	14.94		