



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS**  
**MÉRIDA-VENEZUELA**



**ISSN 0543-517-X**  
**Depósito Legal pp 1958 02**  
**ME 1003**

# REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

**FUNDADA EN 1958**



**"REVISTA PATRIMONIO ULA"**

**Volumen 63, Número 1**  
**enero-junio 2021**

## EDITORIAL

### Alimentos Funcionales, alimentos que curan

Los alimentos funcionales, son aquellos alimentos elaborados, que además de las características nutricionales, están dotados de alguna propiedad específica que conlleva a mejorar la salud o reducir el riesgo de contraer enfermedades. La relación entre la dieta y la salud, fueron reconocidas por la medicina china (1000 aC.) e igualmente por Hipócrates hace casi 2500 años con la frase "deja que la alimentación sea tu medicina y que la medicina sea tu alimentación", pero fue en 1984 que nació en Japón, con la publicación de la reglamentación de alimentos para uso específico de salud, el concepto de alimentos funcionales. Para conseguir esta funcionalidad, se les agrega a los alimentos componentes biológicamente activos, como vitaminas, ácidos grasos, minerales, fibra o antioxidantes, que pueden tener efectos beneficiosos en enfermedades metabólicas, patologías asociadas a la edad, cardiopatías o enfermedades neuronales. Es común, encontrar en los supermercados de muchos países, ofertas de alimentos con propiedades saludables, que atraen la atención del consumidor, bebidas lácteas que ayudan a controlar el peso corporal, reducen el colesterol, previenen la osteoporosis o mejoran la tensión arterial; preparados de soya capaces de reducir los síntomas de la menopausia; chicles que ayudan a bajar de peso; además de preparados con potentes antioxidantes capaces de retardar el envejecimiento e incluso de prevenir algunos tipos de cáncer. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre otros organismos, han contribuido desde la década de los 90, al proceso de educación sobre la importancia de los alimentos funcionales y su necesario manejo para prevenir y curar enfermedades. No obstante, aún son insuficientes los estudios que, desde una perspectiva médica, eduquen en su manejo y carácter preventivo.

Dr. Tomas Enrique Visbal Beltrán  
Grupo "Ecología y Nutrición"  
Departamento de Ciencias de Los Alimentos.  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis  
Universidad de Los Andes

## REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

Vol. 63, N° 1

enero-junio 2021

ISSN 0543- 517-X Depósito Legal pp 1958 02 ME 1003

ISSN 2244-8845 Electrónico Depósito Legal ppi 2012 02

ME 4102

## CONTENIDO

### ARTÍCULOS ORIGINALES

Actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* L.

**Antioxidant and tick control activity of the extracts of the leaves of *Bixa orellana* L.**

*Autores: Chacón Arian, Morillo Marielba, Rondón María, Hernández Vanessa, Carmona Juan, Visbal Tomás.....3*

Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador.

**Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Piper marginatum* Jacq. and *Piper tuberculatum* Jacq. from Ecuador.**

*Autores: Moncayo Shirley, Rondón María, Araujo Liliana, †Rojas Luis, Cornejo Xavier, Guamán Walter, Jaramillo Soraya.....14*

Microbiología del agua perteneciente al lago cratérico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Estudio inicial.

**Microbiology of the water in the lake crateric volcanic Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Initial study.**

*Autores: González Marco, Alarcón Diego, Araque Judith, Viteri Francisco, Villacis Luis, Escobar Sandra, Araujo Liliana, Medina Gerardo, Andueza Félix. ....25*

Estudio preliminar de la calidad nutracéutica y autenticidad de la miel con base en parámetros bioquímicos y capacidad antioxidante.

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

*Autores: Pérez-Pérez Elizabeth, Daboin María, Pérez Mariel, Peña-Vera María, Dávila Juan, Sulbarán-Mora Miguel.....34*

**Normas Editoriales.....52**

**Reglamento para el Arbitraje.....53**

**Índice Acumulado.....55**

Artículo original

## Actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* L.

Antioxidant and tick control activity of the extracts of the leaves of *Bixa orellana* L.

Chacón Arian<sup>1</sup>, Morillo Marielba<sup>1\*</sup>, Rondón María<sup>2</sup>, Hernández Vanessa<sup>2</sup>, Carmona Juan<sup>2</sup>, Visbal Tomás<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia de Los Alimentos, <sup>2</sup>Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, 5101, Mérida Venezuela.

Recibido: enero de 2021 –Aceptado: marzo de 2021

### RESUMEN

*Bixa orellana* L. (Bixaceae), es una especie usada con fines ornamentales y terapéuticos. A partir de sus semillas se extrae el colorante conocido como “onoto” ampliamente empleado en culinaria. El objetivo de esta investigación fue estudiar la composición química, actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de esta especie, recolectada en el estado Táchira, Venezuela. El análisis fitoquímico preliminar mostró la presencia de esteroides en los extractos hexanoico y diclorometanoico, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en el extracto etanólico. El extracto etanólico presentó un contenido fenólico total de 0,89 µg ÁG/mg, por el método de Folin-Ciocalteu, usando espectrometría UV/visible a 760 nm. La actividad antioxidante fue determinada empleando el método de DPPH a 517 nm, siendo el extracto etanólico el más activo mostrando un IC<sub>50</sub> de 0,26 mg/mL, con un porcentaje de inhibición (% I) de 87,1 a la concentración de 0,75 mg/mL, mientras que el extracto diclorometanoico IC<sub>50</sub> 0,87 mg/mL y % I 31,0 a la misma concentración, comparado con 96,1 % del ácido ascórbico a 0,176 mg/mL. Además, se evaluó la actividad garrapaticida del extracto etanólico por el método de prueba de paquete de larvas, demostrando que no hubo actividad frente a las larvas de *R. microplus*, ya que no evidenciaron mortalidad. Cabe destacar que este

es el primer reporte de actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de *B. orellana* L., recolectada en Venezuela.

### PALABRAS CLAVE

*Bixa orellana* L., Bixaceae, actividad antioxidante, actividad garrapaticida, *Rhipicephalus microplus*.

### ABSTRACT

*Bixa orellana* L. (Bixaceae) species has been used as ornaments and for therapeutic purposes. The colour known as “onoto” is extracted from the seeds and is widely used in culinary. The aim of this research was to study the chemical composition, antioxidant and tick control activity of the extracts obtained from leaves of this specie, collected in Táchira, Venezuela. Preliminary phytochemical studies showed the presence of sterols in hexanoic and dichloromethane extracts, while alkaloids, sterols and phenolic compounds were observed in the ethanolic extract. A total phenolic content of 0.89 µg ÁG/mg for Folin-Ciocalteu was observed in the ethanolic extract through spectrophotometry UV-visible at a wavelength of 760 nm. The antioxidant activity was determined using the DPPH method at 517 nm. the ethanolic extract was the most active since it showed an IC<sub>50</sub> of 0.26 mg/mL, inhibition

percentages (% I) was 87.1 at the concentration of 0.75 mg/mL, while dichloromethane extract showed an IC<sub>50</sub> of 0.87 mg/mL and 31.0 % to the same concentration compared to 96.1% of the ascorbic acid, used as a positive control, at the concentration of 0.176 mg/mL. In addition, the tick control activity of the ethanolic extract was evaluated by the larval packet test method, showing that there was no activity against the *R. microplus* larvae. This is the first report of antioxidant and tick control activity from the extracts of the leaves of *B. orellana* L, collected in Venezuela.

## KEY WORDS

*Bixa orellana* L, Bixaceae, antioxidant activity, tick control activity, *Rhipicephalus microplus*.

## INTRODUCCIÓN

Bixaceae es una familia pantropical originaria del Continente Americano, se distribuye desde México hasta Brasil y Argentina. En la actualidad, se cultiva extensamente en otras regiones tropicales y sub tropicales [1,2]. Algunos autores consideran que esta familia, agrupa plantas perennes y comprende 25 especies distribuidas en cuatro géneros: *Amoreuxia*, *Bixa*, *Cochlospermum*, *Diegodendron* [3]. El género *Bixa* es originario de América tropical, está representado por pequeños y grandes árboles, formado por las especies *B. orellana*, *B. arborea*, *B. excelsa*, *B. platycarpa*. Una especie ampliamente cultivada es *B. orellana* L. [3], las otras especies están restringidas a bosques de tierras bajas [4]. Estas tienen como características porte leñoso, son arbustivas o arbóreas con látex rojo anaranjado [5].

En Venezuela, la especie *B. orellana* L., es una planta doméstica, que se siembra en los patios de las casas con fines ornamentales y en cercas o pequeñas parcelas para la obtención de colorante para uso familiar [6]. De esta especie se extrae un colorante soluble en agua, con muy baja toxicidad para el humano, reportándose escasos incidentes de eventos alérgicos. Este pigmento se extrae de las semillas de la planta, está compuesto básicamente por carotenoides (bixina, norbixina), que se emplea

con preferencia para colorear alimentos y bebidas [7].

En cuanto a la composición química reportada para esta especie se encontró que los pigmentos más abundantes son los apocarotenos: bixina, norbixina e isobixina. También están presentes otros carotenoides: orellina,  $\beta$ -caroteno (provitamina A), luteína, criptoxantina y zeaxantina [8].

Según Shahid-ul-Islam y cols. (2016) [9], existen reportes de varios investigadores, que indican que se han logrado aislar e identificar 46 componentes químicos presentes en la semilla, corteza de las semillas y hojas de *B. orellana* L., que incluyen carotenoides, apocarotenoides, esteroides, compuestos alifáticos, monoterpénos, sesquiterpénos, triterpénos y otros compuestos misceláneos.

Stringheta y cols. (2018) [10], indicaron que Bixina [6'-metil hidrógeno (9'Z)-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato] es un diapocarotenoide, principalmente presente en las semillas de *B. orellana* L., representando al menos el 80 % del carotenoide total presente en las mismas [9,11]. Bixina, es el metil éster del ácido dicarboxílico de norbixina y es el pigmento presente en "Paprika", una especia utilizada en América del Sur [12], es soluble en soluciones alcalinas concentradas, donde sufre saponificación, mientras que la norbixina y sus sales son el pigmento principal y es soluble en agua [13].

De Oliveira Júnior y cols., (2019) [14], lograron aislar trece (13) componentes químicos de la semilla seca de esta especie. Estos compuestos son: naringenina, ácido 6,8'-diapocaroteno-6,8'-dioico, *E*-norbixina, ácido eicosatrienoico, ácido 6,7'-diapocaroteno-6,7'-dioico, *Z*-norbixina, *E*-bixina, *Z*-bixina, geranilgeraniol, metil-bixina, ácido  $\beta$ -12'-apo-carotenoico,  $\alpha$ -tocotrienol y  $\gamma$ -tocotrienol.

El uso terapéutico que se le atribuye a esta especie es muy variado y depende de la parte que se va a utilizar, se emplea las semillas para tratar bronquitis, hemorroides, en quemaduras, antidiarreico, antiemético, antidiabético y expectorante [15]. La raíz es considerada antidisentérica, antivenérea e hipoglucemiante y las hojas son usadas como desinflamatorio bucal, diurético, antiinflamatorio prostático. En la medicina popular venezolana se emplean las hojas

en decocción para curar las enfermedades del hígado y limpiar la sangre, como refrescante, en el dolor de muela y de cabeza [5]. A los apocarotenos (bixina, norbixina e isobixina) se le atribuyen varias propiedades farmacológicas, pero no se les ha demostrado acción antimalárica [8].

El objetivo de esta investigación fue determinar la composición química cualitativa, contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante y garrapaticida, de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección del material vegetal:** La especie *B. orellana* L. fue recolectada en el sector “Las Flores”, Municipio Ayacucho, Parroquia San Juan de Colón, estado Táchira, a una altitud de 802 m s. n. m. La identificación botánica la realizó el Ingeniero Forestal Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes (ULA). Una muestra bajo el voucher N° 05 de fecha 30 de septiembre de 2017, quedó depositada en el Herbario MERF Dr. José L. Ruiz Terán, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

**Obtención de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.:** Las hojas secas y molidas (100 g) se maceraron por 48 horas con hexano, a temperatura ambiente, posteriormente, se filtró y se llevó a total sequedad empleando un rotavapor IKA RV 10 digital a 45 °C, este procedimiento se repitió tres veces y luego se cambió el solvente a diclorometano y finalmente a etanol, siguiendo el mismo procedimiento para cada uno, finalmente los extractos fueron almacenados en frascos herméticamente tapados, previamente tarados y rotulados, se procedió a la identificación de los metabolitos secundarios, a través de pruebas específicas.

**Estudio fitoquímico preliminar:** Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, de las hojas de *B. orellana* L. se efectuó una serie de pruebas

químicas cualitativas siguiendo la metodología descrita por Marcano y Hasegawa (2002) [16].

**Determinación del contenido de polifenoles totales:** La determinación del contenido de fenoles totales se realizó a través del método Folin-Ciocalteu a pH básico. Todos los reactivos químicos utilizados, incluyendo los disolventes fueron de grado analítico. El reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), la absorbancia se midió en un Espectrofotómetro UV-Visible (Spectronic GENESYS TM 10 Bio) a 760 nm. La determinación de fenoles totales en el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., es considerado un valor arbitrario, ya que se relaciona la absorbancia de la muestra con la absorbancia del fenol estándar a través de sus respectivas curvas de calibración. Se determina de acuerdo a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración del ácido gálico ( $y = ax + b$ ). Las cantidades reportadas, se expresarán como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por mg de extracto [17].

**Actividad antioxidante método DPPH:** Todos los reactivos químicos utilizados, incluyendo los disolventes fueron de grado analítico. El reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) de Sigma-Aldrich, el ácido ascórbico y metanol marca Merck. Se utilizó un Espectrofotómetro UV-Visible (Spectronic GENESYS TM 10 Bio) a 517 nm, para evaluar el comportamiento de los extractos como agentes antioxidantes.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico de las hojas de *B. orellana*, se realizó siguiendo el ensayo del test de actividad secuestrante de radicales libres del DPPH, según la metodología descrita [18, 19, 20, 21, 22].

Esta técnica consistió en preparar una solución stock de cada uno de los extractos, tomando 4 mg de cada uno, en tubos eppendorf y se disolvieron en 1 mL de metanol, el ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los extractos. Para tal fin, se prepararon 3 tubos de cada uno, que contenía 700  $\mu\text{L}$  de DPPH ( $6 \times 10^{-2}$  mM) y 300  $\mu\text{L}$  del extracto, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 minutos. Pasado los 30 minutos se procedió a medir la absorbancia a 517 nm. Con cada uno de los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH igual o superior

a 50 % a 4 mg/mL, se preparó una solución madre de concentración de 1 mg/mL y a partir de la misma se prepararon varias diluciones (0,75; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/mL) y se procedió a determinar la actividad antioxidante. Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico, partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol). El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de DPPH•, se calculó mediante la siguiente ecuación:  $\%I = [(A_{DPPH} - A_{Extracto}) / A_{DPPH}] \times 100$ . La concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) se determinó por regresión lineal para cada muestra en función de la concentración del analito [18, 19, 20, 21, 22].

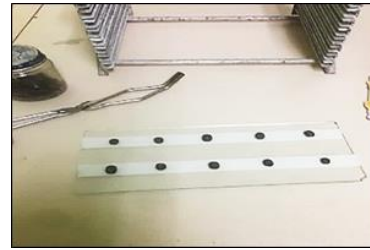
**Concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) en mg/mL (n=3) de los extractos etanólicos y diclorometanoicos de las hojas de *B. orellana* L.:** La determinación de IC<sub>50</sub> (mg/mL) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de esta especie se calculó a partir de la ecuación de la recta  $y = ax + b$ , donde “a” es la pendiente; “b” la intersección de corte en la recta,  $y = 50$  y  $x = IC_{50}$  [23].

**Determinación de la actividad garrapaticida por el método Prueba de Paquete de Larvas (PPL) [24].**

**Recolección de los parásitos en el ganado vacuno:** Las garrapatas del ganado, fueron recolectadas el 12 de julio de 2019, en la finca del “señor Humberto Belandria”, ubicada en Chiguará, estado Mérida (Municipio Sucre, a una altitud de 840 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 28 °C) a 40 minutos de la ciudad de Mérida y a 15 minutos de la ciudad de El Vigía. Para tal fin se tomaron 30 garrapatas adultas ingurgitadas, directamente del animal, se colocaron en un frasco de vidrio limpio, seco y con tapa perforada y se trasladaron al laboratorio.

**Identificación del parásito:** La especie de garrapata utilizada en esta investigación fue identificada por el Prof. Antonio Ascensão del Laboratorio de Biodiversidad de Artrópodos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, ULA. Su nombre científico es *Rhipicephalus microplus*, de la Familia Ixodidae-Argasidae.

**Inmovilización de la garrapata:** Las garrapatas recolectadas (30 en total) fueron colocadas en placas de vidrio e inmovilizadas con cinta adhesiva (Figura 1).



**Fig. 1.** Garrapatas adultas ingurgitadas, sobre la cinta adhesiva. Foto: Vanessa Hernández

**Obtención de los huevos:** Tras la incubación de las garrapatas en una cabina de vidrio durante 18 días a 26 °C, con humedad de  $\pm 85$  %, ocurrió la ovoposición (Figura 2). La masa de huevos de *R. microplus*, se recolectó en tubos de ensayo que se sellaron con cantidad suficiente de algodón para no permitir la fuga de las larvas, fueron llevados a incubación nuevamente bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, por 21 días.



**Fig. 2.** Ovoposición de *R. microplus*. Foto: Vanessa Hernández

**Obtención de las larvas:** Luego de la eclosión de los huevos se dejaron madurar las larvas de *R. microplus*, por 14 días más (Figura 3).



**Fig. 3.** Larvas de *R. microplus*, observadas a través de la lupa estereoscópica. Foto: Vanessa Hernández

**Preparación del extracto:** El extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. al 20 %, se preparó con una solución de tween 80 (2 %).

**Control positivo y control negativo:** Se prepararon tres placas de Petri del control negativo

(Solución Tween 80 al 2 % en agua destilada) y tres placas para el control positivo Ivermectina al 0,1 % (diluida con agua destilada). Con una pipeta automática se procedió a impregnar los papeles filtro, dentro de las placas identificadas, con 2 mL de la concentración correspondiente del extracto de las hojas. Posteriormente se colocaron sobre el papel filtro, aproximadamente entre 100-120 larvas por placa (con un pincel), las placas se sellaron herméticamente utilizando cinta adhesiva.

Todas las placas (extracto y controles) fueron colocadas en una cámara de vidrio, en las mismas condiciones de temperatura y humedad explicadas anteriormente y se esperó 24 horas para hacer el conteo de las larvas muertas y vivas utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas.

En caso de que el extracto llegara a mostrar actividad, se prepararían, 5 diluciones más del mismo a 10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 %, usando el mismo control positivo y negativo, se probaría la actividad garrapaticida por triplicado, siguiendo el mismo procedimiento.

**Para la determinación del porcentaje (%) de mortalidad:** Se consideran larvas muertas aquellas que no caminan ni mueve sus patas cuando son

estimuladas con la pinza entomológica. Se cuenta el número de larvas muertas y el total de larvas por placa utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas, se calcula la mortalidad corregida con la fórmula de Abbott [25].

**Estudio estadístico:** Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU). Con la finalidad de determinar diferencias estadísticas en cada uno de los analitos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, como valores de media (n=3) y desviación estándar (DE).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo una serie de pruebas para determinar cualitativamente los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos de las hojas de *B. orellana* L., que permitieron comprobar en los extractos hexanoico y diclorometanoico la presencia de esteroides y en el extracto etanólico, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos (Tabla 1).

**Tabla 1.**  
Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.

Metabolitos Secundarios	Reacción de coloración o precipitación	EH	ED	EE
Alcaloides	Dragendorff			+++
	Wagner			+++
	Mayer			+++
Esteroides	Liebermann-Burchard	+++	+++	+++
Terpenos		-	-	-
Compuestos fenólicos	Fe Cl <sub>3</sub>	-	-	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-
Taninos	Prueba de gelatina	-	-	-
Cumarinas	NH <sub>4</sub> OH/Luz UV	-	-	-
Quinonas	Prueba NH <sub>4</sub> OH	-	-	-

+++ abundante, ++ moderado, + escaso, - ausente. EH: Extracto hexanoico, ED: Extracto diclorometanoico; EE: Extracto etanólico.

Los resultados obtenidos en este estudio, coinciden, con lo reportado por Padro y cols., (2017) [26], quienes determinaron la composición química en la tintura al 10 % de *B. orellana* L. recolectada en Cuba y lograron identificar alcaloides, esteroides y fenoles, sin embargo, difieren con este estudio, en algunos compuestos químicos como, cumarinas, saponinas, flavonoides, triterpenos y taninos.

Por otra parte, Shahid-ul-Islam y cols., (2016) [9], mencionaron 46 compuestos químicos, aislados e identificados por otros investigadores, de diferentes partes de la especie *B. orellana* L., entre los que se encontraban, carotenoides, terpenoides, compuestos volátiles y otros compuestos, como esteroides, flavonoides y polifenoles. En esta investigación se identificaron cualitativamente, esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides pero no flavonoides.

De igual manera Muñoz (2015) [27], determinó la composición de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *B. orellana* L., los resultados obtenidos, coinciden con este aporte, en la presencia de alcaloides y esteroides, sin embargo, difieren en algunos metabolitos secundarios como, triterpenos, flavonoides, saponinas y taninos, los cuales están ausentes en los extractos.

Las diferencias observadas al comparar este trabajo con el de otros investigadores pueden deberse tanto a los factores climáticos como fisiológicos de la planta, se conoce que determinados rangos de temperatura, luz, precipitaciones intervienen directamente en la germinación, crecimiento y desarrollo de las

plantas y que estos factores no se comportan por igual para todas, ni durante todo su ciclo de vida [28]. Debido a que, en los diferentes estudios realizados por otros investigadores, muestran diferentes composiciones químicas de *B. orellana* L., recolectada en diferentes partes del mundo donde hay características ambientales diferentes a Venezuela, podría ser este, un factor a tomar en cuenta, que explicaría la diferencia en cuanto a la composición química.

Según Waterman y Mole (1994) [29], el contenido de metabolitos secundarios está influenciado por la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Así mismo Santacoloma y Granados (2012) [30], afirmaron que la aparición de los metabolitos secundarios está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta y los efectos del suelo y del clima

**Curva de calibración del ácido gálico:** En la determinación del contenido de compuestos fenólicos del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., las curvas de calibración del ácido gálico, se realizaron por triplicado, y las correspondientes ecuaciones de la recta ( $y = 0,0251X - 0,1211$   $R^2 = 0,9944$ ;  $y = 0,024X - 0,0707$   $R^2 = 0,9951$ ;  $y = 0,0229X - 0,0204$   $R^2 = 0,9957$ ), se emplearon para cuantificar el contenido total de fenoles en la muestra analizada. Los valores de absorbancia del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., fueron reemplazados en la ecuación. En este estudio, el contenido de fenoles totales del extracto etanólico, se corresponde a  $0,89 \pm 0,07$   $\mu\text{g}$  AG/mg de extracto seco (Tabla 2).

**Tabla 2.**

Cuantificación de fenoles totales del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L

Extracto	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia 760 nm			[ ] $\mu\text{g}$ AG/mg de extracto seco			[ ] $\mu\text{g}$ AG/mg de extracto seco $\pm$ DE
		$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	
Etanólico	50	1,137	1,135	1,136	0,89	0,81	0,97	$0,89 \pm 0,07$

AG = ácido gálico; No existen diferencias estadísticamente significativa entre datos ( $p > 0,05$ ), con un nivel de confianza de 95%

Ul Islam y cols. (2011) [31] reportaron un contenido de fenoles totales, en el extracto acuoso de las hojas de *Bixa orellana* Linn, recolectada en Bangladesh, de 99,99 mg de AG/g de extracto (99,99  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto), un valor muy por

encima al reportado en este trabajo de investigación.

Guimet (2012) [32], evaluó la concentración de polifenoles totales, del extracto de las hojas de ocho morfotipos de esta especie, recolectados en Perú, obteniendo valores entre  $43,45 \pm 0,52$  mg de

catequina (CTQ)/100g y  $48,72 \pm 0,36$  mg CTQ/100g. Este estudio no puede ser comparado de forma objetiva con esta investigación ya que los investigadores utilizaron catequina como patrón y no ácido gálico.

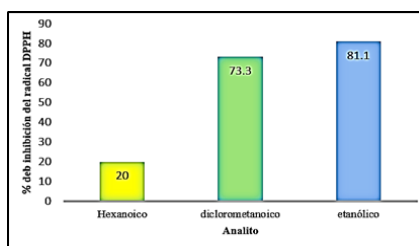
Los metabolitos secundarios varían de acuerdo a la edad de la planta, demostrando que el estado de desarrollo de ésta afecta la biosíntesis y acumulación de estos compuestos químicos, siendo las hojas jóvenes maduras las que secretan mayor cantidad de ellos, de esta manera puede afectar la producción y acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides [33].

Otro factor que influye en la variedad de compuestos fenólicos producidos por la planta, es la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, el estrés producido por nitrógeno provoca la expresión de genes de la ruta de los flavonoides, mientras que para el caso de la disponibilidad de nitrato la ruta directamente afectada es la de los fenilpropanoides (Sousa y cols., 2008) [34].

Las diferencias en la síntesis de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos y fenoles, podrían deberse a que en la mayoría de los ecosistemas existen grandes diferencias meteorológicas a lo largo del año e interanualmente (Valares, 2011) [35]. Factores ambientales como temperatura y luz son desencadenantes de las vías biosintéticas, de manera que las concentraciones de compuestos fenólicos se incrementan cuando las plantas están expuestas a la luz solar [36].

**Actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *B. orellana* L.**

**Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH:** Los resultados de la determinación del porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH, de los diferentes extractos a una concentración de 4 mg/mL (barrido inicial), se muestran en la Figura 4.

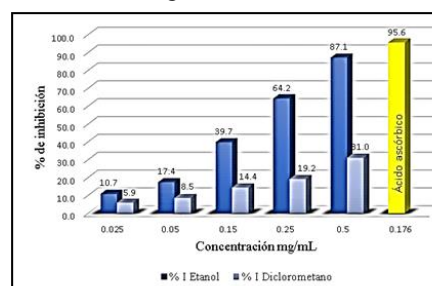


**Fig. 4.** % de inhibición del radical DPPH de los extractos de las hojas de *B. orellana* L. a 4 mg/mL.

**Porcentaje de inhibición del extracto etanólico y diclorometanoico, de las hojas de *B. orellana* L.:**

La actividad antioxidante se determinó en los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de esta especie. En la Figura 5 se muestra la comparación de % I de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de la especie en relación a las diferentes concentraciones.

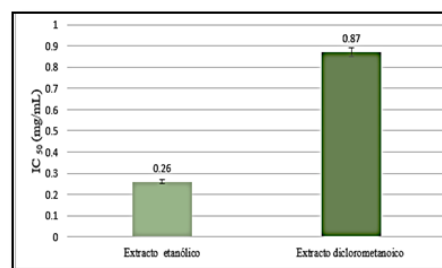
En base a los datos obtenidos, se puede inferir que el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. presentó una mayor actividad antioxidante, con % I por encima del 50 % con respecto al % I del extracto diclorometanoico en todas las concentraciones (Figura 5).



**Fig. 5.** Porcentaje de inhibición (%I) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de *B. orellana* L.

**Concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) en mg/mL (n=3) de los extractos etanólico y diclorometanoico de las hojas de *B. orellana* L.:**

En este estudio, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. mostró un IC<sub>50</sub> de 0,26 mg/mL y el extracto diclorometanoico 0,87 mg/mL (Figura 6).



**Fig. 6.** IC<sub>50</sub> de los extractos etanólico y diclorometanoico, de las hojas de *B. orellana* L.

Los resultados de IC<sub>50</sub> encontrados en esta investigación, difiere de lo reportado por Meñaca y cols. (2018) [37], quienes evaluaron la actividad antioxidante a través del método DPPH, de los extractos de las semillas de *B. orellana* L,

recolectadas en el Jardín Botánico de Tuluá, Valle del Cauca, Colombia, encontrando que estos extractos que fueron obtenidos a través de fluidos supercríticos (CO<sub>2</sub>), presentaron una IC<sub>50</sub> de 23,5; 28,8; 37,2; 81,1 y 193,8 µg/mL; Ul Islam y cols. (2011) [31] reportaron un IC<sub>50</sub> de 13 µg/mL, en el extracto acuoso de las hojas de *B. orellana* Linn, recolectada en Bangladesh, mientras que en este estudio los valores de IC<sub>50</sub>, fueron 0,26 mg/mL (260 µg/mL) para el extracto etanólico y 0,87 mg/mL (870 µg/mL) para el diclorometanoico. Es decir, los extractos en esta investigación mostraron una menor actividad antioxidante.

Abayomi y cols. [38] determinaron la actividad antioxidante con DPPH del extracto del colorante obtenido de *B. orellana*, recolectada en Jamaica; el material vegetal fue extraído utilizando un protocolo ácido-base, obteniendo % I del radical DPPH entre 5% a 48,9% (a concentraciones entre 0,25 y 2,5 µg/mL), estos resultados estuvieron por encima de los resultados conseguidos para el extracto etanólico en el presente trabajo que se encontraron entre 64,2 y 87,1 % a concentraciones de 0,25 y 0,5 mg/mL respectivamente.

Estas diferencias pueden deberse a varios factores que influyen en la concentración de metabolitos secundarios con actividad antioxidante en la planta como son: Variedad del fruto, lugar de la cosecha, altura y condiciones del suelo, parte de la planta estudiada, clima. De igual forma, la luz, es posiblemente el factor de mayor significación, ya que está estrechamente relacionada con la temperatura, varía con la estación del año y juega un papel importante en la producción de metabolitos activos [28, 39].

**Actividad garrapaticida del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. contra *R. microplus*, a través del método Prueba de Paquete de Larvas (PPL):** La actividad garrapaticida del extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. sobre *R. microplus* se realizó por triplicado (n=3), a través del método de Prueba de Paquete de Larvas (PPL) [24]. Se pudo evidenciar a través de este método que no se observó mortalidad, es decir todas las larvas sobrevivieron al tratamiento con el extracto etanólico de las hojas al 20 %, en solución acuosa de Tween 80 (2 %) (Tabla 3).

**Tabla 3.**

Resultados de la supervivencia de las larvas de *R. microplus*, tratada con el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. al 20%, en solución acuosa de Tween 80 al 2%.

Muestra	% de Mortalidad		
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>
Extracto etanólico	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Sol Tween 80 (2%)	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Ivermectina 0,1 %	100±0,0	100±0,0	100 ±0,0

M<sub>1,2,3</sub>= muestras. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n=3), los resultados se muestran cómo % mortalidad ± DE

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L. no mostró actividad sobre las larvas de *R. microplus*, es decir, resultó ser inocuo, obteniendo 100 % de supervivencia de las mismas (Tabla 3).

Se ha evaluado la actividad garrapaticida en extractos de aproximadamente 55 especies de plantas pertenecientes a 26 familias, recolectadas en diferentes regiones del mundo contra *R. microplus* [39]. Entre las especies reportadas con actividad garrapaticida tenemos: *Trachyspermum ammi* [40]; *Melia azedarach* [41]; *Azadirachta indica* [42]; *Palicourea marcgravii* [43]; *Manilkara zapota* [44] entre otras, sin embargo, no se ha reportado hasta la actualidad el uso de la especie *B. orellana* L. para el control de *R. microplus*.

Es importante mencionar que Dimas (2011) [45], relacionó la mortalidad de larvas de *R. microplus*, con una saponina llamada sapotoxina. Se ha demostrado que las saponinas, estimulan la penetración de compuestos tóxicos en las células generando una acción sinérgica [46,47].

En esta investigación, el extracto etanólico de las hojas de *B. orellana* L., no mostró presencia de saponinas, taninos ni otros metabolitos a los que se les haya reportado actividad garrapaticida, ni tampoco presentó actividad contra las larvas de *R. microplus*, se podría inferir que la ausencia de estos metabolitos secundarios podría ser el origen de este resultado.

Sin embargo, a esta especie si se le ha atribuido otras propiedades medicinales en animales domésticos, como en el hongo de cerdos y aves [48], en la coriza infecciosa de las gallinas, producida por *A. paragallinarum* [49]. Estos reportes condujeron a tratar de probar la efectividad del extracto polar de las hojas de esta planta sobre la larva de la garrapata del ganado vacuno, que

tantas pérdidas económicas causan en Venezuela, Latinoamérica y el resto del mundo. Sin embargo, no se logró demostrar actividad sobre las mismas.

## CONCLUSIONES

Los extractos hexanoico y diclorometanoico de las hojas de *B. orellana* L. mostraron la presencia de esteroides y el extracto etanólico, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos. El contenido de fenoles totales del extracto etanólico es 0,89 µg AG/mg.

Los extractos etanólico y diclorometanoico, presentaron una concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de 0,26 mg/mL y 0,87 mg/mL y el % I del radical DPPH fue de 87,1 y 31,0 respectivamente a la concentración de 0,75 mg/mL.

El extracto etanólico de hojas de esta especie no mostró actividad sobre las larvas de la garrapata del ganado (*R. microplus*), ya que estas tuvieron un porcentaje de supervivencia de 100 % después del tratamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen y agradecen al Instituto de Investigaciones, Departamento de Ciencia de Los Alimentos y Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. (Mérida, Venezuela), por el apoyo brindado para finalizar con éxito esta investigación. Al Prof. Antonio Ascensão del Laboratorio de Biodiversidad de Artrópodos, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, ULA, por realizar la identificación de la especie de garrapata utilizada en esta investigación. A la Ing. Yesenia Pérez por la colaboración prestada en la obtención de los extractos de la especie en estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Jiménez D. El achiote, *Bixa orellana* Linn. Fam. Bixaceae. Rev. Inst. Def. Café de C. R. 1947; 155-156 (23): 361-367.  
 [2] Little EL, Dixon RG. Árboles comunes de la provincia de Esmeraldas, Ecuador, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Organización

de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Roma. 1969.

[3] Rivera D, Flores E. Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L. (Bixaceae). Rev Biol. Trop. 1988; 36(2B): 499-509.

[4] Zuloaga FO, Morrone O, Belgrano MJ. Bixaceae. Cochlospermaceae. Catálogo de las Plantas vasculares del Cono Sur, Missouri (Eds). Botanical Garden Press: St. Luis, Missouri, USA.1627. 2008.

[5] Leal F, Clavijo C. Acerca de la historia, taxonomía como botánica y uso de *Bixa orellana* L. Rev. Unell Cienc Tec. 2010; 28, 78-76.

[6] Mazzani E, Marin C, Segovia V. Estudio de la variabilidad existente en la colección de onoto (*Bixa orellana* L.) del CENIAP FONAIAP Venezuela. Rev Fac. Agron. 2000; 17(6): 492-504.

[7] Lourido H, Martínez G. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. Rev. Cuba. de Farm. 2010; 44(2): 231-244.

[8] Hamzah J, Skinner-Adams TS, Davis TME. *In vitro* antimalarial activity of retinoids and the influence of selective retinoic acid receptor antagonists. Acta Trop. 2003; 87(3): 345-353.

[9] Shahid-ul-Islam, Rather L, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications. A review. J Adv Res. 2016; 7: 499-514.

[10] Stringheta PC, Silva PI, Costa AGV. Annatto/Urucum *Bixa orellana*. Exotic Fruits. 2018; 23-30.

[11] Shahid-ul-Islam, Rather L, Shahid M, Khan M, Mohammad F. Study the effect of ammonia post-treatment on color characteristics of annatto-dyed textile substrate using reflectance spectrophotometry. Ind. Crops Prod. 2014; 59: 337-342.

[12] Scotter M, Wilson L, Appleton G, Castle L. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. J Agric Food Chem. 1998; 46: 1031-8.

[13] Stringheta PC, Silva PI. (Org.). Pigmentos do urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora

Suprema, 2008.

[14] De Oliveira Júnior RG, Bonnet A, Braconnier E, Groult H, Prunier G, Beaugeard L, et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2019; 125: 549-561.

[15] Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ, Decker EA. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(7): 2969-2976.

[16] Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica*. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico: Caracas, Venezuela, 2002.

[17] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc.* 2007; 2(4): 875-877.

[18] Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot M. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 1999; 79(12):1625-1634.

[19] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol.* 2004; 26(2): 211-219.

[20] Díaz L, De Monjito S, Medina A, Meléndez P, Laurence V, Marti-Mestres G. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev Per Biol.* 2011; 18(2): 153-158.

[21] Plaza CM, Díaz L, Lücking RK, Vizcaya M, Medina GE. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *JPP Res.* 2014; 2(5):138-147.

[22] Contreras-Moreno B, Díaz L, Celis MT, Rojas J, Méndez L, Rosenzweig LP, Ontiveros J. Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Ciencia e Ingeniería.* 2017; 38(3): 1-14.

[23] Malavé MJ, Mendoza Z, Morillo M, Visbal T, Rondón ME, Carmona J. Composición química y

actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* (Houtt.). *Rev. Fac. Farm.* 2019; 61(Número Especial): 25-35.

[24] Resistance management and integrated parasite control in ruminants-guidelines, module I-Ticks: acaricide resistance-diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome; 2014. [Página Web] [Acceso: 10 de octubre de 2019]. Disponible <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>

[25] Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomology.* 1925; 18: 265-267.

[26] Padro-Rodríguez L, López-González T, Nuviola-Frometa D. Caracterización preliminar de tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L. *Rev Cub Quim.* 2017; 29(1): 103-114.

[27] Muñoz L. Estudio farmacológico y cuantificación de flavonoides totales de la hojas de *Bixa orellana* (achiote). Proveniente del Distrito de Usquil Provincia Otuzco región la Libertad. [Tesis de pregrado] Universidad Nacional de Trujillo, Perú; 2015.

[28] Acosta, L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2003; 8(1) [online]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962003000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008).

[29] Waterman P, Mole S. *Method in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites.* Boston, United State: Blackwell Sci; 1994.

[30] Santacoloma VLE, Granados JE. (2012). Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades fisicoquímicas del suelo. *RIAA.* 2012; 3(1): 53-62.

[31] Ul Islam SMB, Hossain MK, Gomes I, Gomes DJ, Rahman SR, Rahman MS, Rashid MA. Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Bixa orellana* Linn. *Lat. Am. J. Pharm.* 2011; 30 (6), 1126-1134.

[32] Guimet R. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación de polifenoles totales *in vitro*, de las hojas de ocho morfotipos de *Bixa orellana* L. [Tesis de Pregrado]. Universidad

- Nacional de La Amazonia Peruana, Iquitos-Perú; 2012.
- [33] Cabrera J, Jaramillo C, Dután F, Cun J, García P, Rojas L. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro*. 2017; 29(1): 53-60.
- [34] Sousa C, Pereira D, Pereira J, Bento A, Rodrigues M, Dopico-García S et al. Multivariate analysis of *Trochuda cabbage* (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) phenolics: influence of fertilizers. *J Agr Food Chem*. 2008; 56: 2231-2239.
- [35] Valares C. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. [Tesis de doctorado]. Universidad de Extremadura, Badajoz, España; 2011.
- [36] Jahangir M, Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ Exp Bot*. 2009; 67(1): 23-33.
- [37] Meñaca EV, Restrepo J, Colmenares AJ. Actividad antioxidante del complejo de inclusión del extracto de semilla de *Bixa orellana* en  $\beta$ -ciclodextrina obtenido por CO<sub>2</sub>. *Vitae (Antioquia)*. 2018; 25(2): 83-91.
- [38] Abayomi M, Adebayo AS, Bennett D, Porter R, Shelly-Campbell J. *In vitro* antioxidant activity of *Bixa orellana* (Annatto) Seed Extract. *J. Appl. Pharm. Sci*. 2014; 4(02), 101-106.
- [39] Borges M, Sousa A, Barbosa D. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011; 20(2): 89-96.
- [40] Zaman MA, Iqbal Z, Abbas RZ, Khan MN, Muhammad G, Younus M, Ahmed S. *In vitro* and *in vivo* acaricidal activity of a herbal extracts. *Vet Parasitol*. 2012; 186(3-4):431-436.
- [41] Borges LM, Ferri PH, Silva WJ, Silva WC, Silva JG. *In vitro* efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med Vet Entomol*. 2003; 17(2): 228-231.
- [42] Yaguana K. Evaluación *in vitro* de extractos vegetales obtenidos manualmente en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Nacional de Loja para el Control de garrapatas en bovinos. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador; 2016.
- [43] Silva WC, Martins JR de S, Cesio MV, Azevedo JL, et al. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*. 2011; 179(1-3): 189-194.
- [44] Rajakumar G, Abdul-Rahuman A. Acaricidal activity of aqueous extract and synthesized silver nanoparticles from *Manilkara zapota* against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Res Vet Sci*. 2012; 93(1): 303-309.
- [45] Dimas PD. Evaluación *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre huevos y larvas *Boophilus microplus*. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional Agraria De La Selva, Tingo María, Perú; 2011.
- [46] Abreu GOA. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. *Rev. Cubana Plantas Med*. 2005; 10(3-4): 1-10.
- [47] Tsuzuki J, Svidzinski T, Shinobu C, Silva L, Rodríguez E, Cortez D, Ferreira L. Actividad antifúngica de los extractos y de saponinas *Sapindus saponaria*. *ABC*. 2007; 79(4): 577-583.
- [48] Burga MP. Identificación de especies de plantas medicinales usadas en la fitoterapia de animales domésticos, en la ciudad de Jenaro herrera, bajo Ucayali, Loreto. Iquitos, Perú. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional De La Amazonia, Iquitos, Perú; 2016.
- [49] Rodríguez-Vivas RI, Alfonso-Díaz MA, Rodríguez-Arevalo F, Fragosó-Sánchez H, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphates and pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol*. 2006; 136(3-4): 335-342.
- Chacón Arian**, Orcid ID: 0000-0001-6654-9897
- Morillo Marielba**, Orcid ID: 0000-0002-6048-0590
- Rondón María**, Orcid ID: 0000-0002-6048-0590
- Hernández Vanessa**, Orcid ID: 0000-0001-7887-8161
- Carmona Juan**, Orcid ID: 0000-0002-3599-5672
- Visbal Tomás**, Orcid ID: 0000-0003-1644-2228

Artículo original

# Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador.

Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Piper marginatum* Jacq. and *Piper tuberculatum* Jacq. from Ecuador.

Moncayo Shirley<sup>1</sup>, Rondón María<sup>1</sup>, Araujo Liliana<sup>2</sup>, †Rojas Luis<sup>3</sup>, Cornejo Xavier<sup>4</sup>, Guamán Walter<sup>2</sup>, Jaramillo Soraya<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. <sup>2</sup>Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. <sup>4</sup>Herbario GUAY, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

Recibido: enero de 2021 –Aceptado: abril de 2021

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de las partes vegetativas de *Piper marginatum* Jacq. y *P. tuberculatum* Jacq., especies pertenecientes a la familia Piperaceae, colectados en la costa ecuatoriana. Los aceites esenciales fueron extraídos por hidrodestilación y caracterizados mediante CG-EM. La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la técnica de microdilución en caldo frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antioxidante se evaluó empleando el método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). El componente mayoritario en el aceite esencial de *P. marginatum* fue el curzereno (22,4%), y el del aceite de *P. tuberculatum* fue el dilapiol (49,15%). El aceite esencial de *P. tuberculatum* inhibió el crecimiento de *S. aureus*

(CMI=50-100 µg/mL) y *E. coli* (CMI= 200-400 µg/mL), mientras que el aceite esencial de *P. marginatum* resultó ser moderadamente activo frente a dichas cepas (CMI= 400-800 µg/mL). Los porcentajes de inhibición del DPPH fueron muy limitados, menores al 50%. Este es el primer reporte de la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* recolectados en las costas ecuatorianas. Estos resultados indicarían el potencial significativo de los aceites esenciales evaluados para el desarrollo de productos antibacterianos.

## PALABRAS CLAVE

Aceite esencial, *Piper marginatum*, *Piper tuberculatum*, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

## ABSTRACT

The aim of this work was to determinate the chemical composition and evaluate the biological activity of the essential oils of the vegetative parts

of *Piper marginatum* Jacq. and *P. tuberculatum* Jacq., species belonging to the Piperaceae family, collected in the Ecuadorian coast. The essential oils were extracted by hydrodistillation and characterized by GC-MS. The antimicrobial activity was evaluated using the broth microdilution technique against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Candida albicans* yeast ATCC 10231. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The major component in the essential oil of *P. marginatum* was curzerene (22.4%), and in *P. tuberculatum* was dillapiol (49.15%). The essential oil of *P. tuberculatum* inhibited the growth of *S. aureus* (MIC = 50-100 µg/mL) and *E. coli* (MIC = 200-400 µg/mL), while that the essential oil of *P. marginatum* showed moderate activity against these strains (MIC = 400-800 µg/mL). Very limited inhibition percentages were obtained, less than 50%. This is the first report of the chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *P. marginatum* and *P. tuberculatum* collected from Ecuadorian coast. These results would indicate the significant potential of the essential oils evaluated for the development of antibacterial products.

## KEY WORDS

Essential oil, *Piper marginatum*, *Piper tuberculatum*, antimicrobial activity, antioxidant activity.

## INTRODUCCIÓN

*Piper* L. y *Peperomia* Ruiz & Pav., son los géneros más grandes y conocidos dentro de la familia Piperaceae [1]. El género *Piper* comprende alrededor de 2000 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo [2]. Su presencia es mayoritaria en los Neotrópicos, donde se han registrado hasta 1804 especies, desde el norte de México hasta Chile y Argentina [3,4]. Por sus

características aromáticas, son empleadas en perfumería y en las industrias alimenticia y farmacéutica [5].

En la medicina tradicional de América Latina, *Piper marginatum* es frecuentemente utilizada en América Central, América del Sur y las Antillas como analgésico, contra enfermedades gastrointestinales y urinarias [6], mientras que *P. tuberculatum* se emplea como diurético, analgésico, para tratar desórdenes digestivos y mordeduras de serpientes [7].

Algunos de estos efectos son atribuidos a los componentes químicos presentes en los aceites esenciales de este género, entre ellos fenilpropanoides, como el safrol, dilapiol, *trans* anetol y miristicina; además monoterpenos o sesquiterpenos [4].

El estudio de la actividad farmacológica de los aceites esenciales de *Piper* [8,9,10], está dirigido hacia el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, muchas de estas con resultados satisfactorios. Además, se han realizado investigaciones basadas en las actividades larvicida e insecticida de los fenilpropanoides presentes en los aceites esenciales de estas plantas [11].

El objetivo del presente estudio fue analizar los aceites esenciales obtenidos de las partes vegetativas de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* de la costa ecuatoriana y evaluar sus actividades antimicrobiana y antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal:** Las hojas de *P. marginatum* Jacq. y *P. tuberculatum* Jacq., fueron colectadas en el cantón Cumandá en la provincia de Chimborazo y en el cantón El Triunfo, provincia del Guayas, Ecuador, respectivamente. La identificación de las muestras botánicas se realizó en el Herbario GUAY de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, donde se depositaron los vouchers de los especímenes bajo los códigos MER06 (*P. marginatum*) y MER07 (*P. tuberculatum*).

**Extracción del aceite esencial:** Las hojas frescas (300 g) de cada especie de *Piper* se sometieron a hidrodestilación, utilizando la trampa

de Clevenger durante cuatro horas. Los aceites obtenidos se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se conservaron en viales herméticamente cerrados a 4 °C protegidos de la luz hasta su análisis.

**Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas:** El análisis cualitativo y cuantitativo de los aceites fue realizado por CG-FID/CG-EM [12]. La temperatura de inyección fue de 250°C. La temperatura del CG fue programada como se describe a continuación: temperatura inicial de 60°C (1,0 min) con incremento de 4°C a 200°C y luego a 10°C/min hasta una temperatura final de 280°C. El gas portador fue He a 1,0 mL/min, valor constante. El análisis CG-EM fue obtenido en un equipo cromatográfico Hewlett Packard 6890 series II, acoplado a un sistema de espectrometría de masas Hewlett Packard 5973 equipado con un inyector automático. Se utilizó una columna capilar HP-5 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. La energía de ionización fue de 70 eV. Una muestra de 1  $\mu\text{L}$  de la solución al 2% del aceite en n-heptano fue inyectada con reparto de 100:1. La identificación de los componentes volátiles de los aceites esenciales obtenidos se hizo a través de las bases de datos Wiley y Nist y por cálculo de los índices de Kovats. Los índices de Kovats fueron calculados en relación con una mezcla de n-alcános  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{24}$  y comparados con valores en la literatura. El método de normalización para los picos que representan el área fue usado para calcular el porcentaje de composición del aceite esencial [12,13].

**Actividad antioxidante:** Para determinar la actividad antioxidante de los aceites, se realizó el ensayo de eliminación de radicales libres descrito por Lai y col. con menores modificaciones [14], empleando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•). Se preparó una solución metanólica de cada aceite a una concentración de 40 mg/mL. A 0,2 mL de cada una de las soluciones de aceite esencial se le adicionó 2,8 mL de una solución de DPPH• ( $6 \times 10^{-2}$  mM). La mezcla fue agitada vigorosamente y conservada en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro UV-visible Genesys 10 BIO a 517 nm. Como control negativo se utilizó una solución compuesta de 2,8 mL de DPPH y 200  $\mu\text{L}$  de metanol y como

estándar antioxidante de referencia, una solución metanólica de ácido ascórbico a una concentración de 176  $\mu\text{g/mL}$ . Los ensayos se realizaron por triplicado. Todos los reactivos empleados en el análisis fueron de grado analítico. El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, el metanol y el ácido ascórbico fueron suministrados por Sigma-Aldrich. La actividad antioxidante fue expresada como el porcentaje de inhibición de la absorción de los radicales (% I), el cual se calculó siguiendo la siguiente ecuación: [15,16]:

$$\% I = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs DPPH}} \times 100$$

**Actividad antimicrobiana:** La actividad antimicrobiana fue evaluada frente a las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); y las Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) y frente a la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231).

Las cepas microbianas se conservaron a 4°C realizando siembras periódicas en agar cerebro corazón (agar BHI) para el mantenimiento de *E. faecalis* debido a sus exigencias metabólicas, en agar nutritivo (AN) para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, y en agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para la levadura *C. albicans*. Todos los medios fueron adquiridos en Oxoid. Los ensayos de la detección de actividad antimicrobiana se ejecutaron a partir de cultivos desarrollados a 37 °C durante 24 h en agitación orbital en caldo nutritivo (CN), caldo infusión cerebro corazón (BHI) y medio líquido Sabouraud (MLS), según el microorganismo. La concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y concentración mínima fungicida (CMF) de los aceites esenciales frente a cada microorganismo fueron determinadas por triplicado, usando el método de microdilución en caldo [17]. Las soluciones concentradas de los aceites fueron preparadas en DMSO (50.000  $\mu\text{g/mL}$ ), a partir de las cuales se realizaron diluciones en medio de cultivo (CN, BHI o MLS) y se distribuyeron a concentraciones seriadas en los pozos de la microplaca, donde la proporción de DMSO nunca

excedió el 1% v/v. La concentración inicial de microorganismos en todos los pozos fue de  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL, excepto en aquellos que se usaron como control negativo que solo contenían medio líquido. Para garantizar el crecimiento microbiano se usaron pozos como controles con células disueltas en el medio de cultivo, algunas carentes de aceites y otras tratadas con DMSO a la máxima concentración usada, para evidenciar la inocuidad de este disolvente. Las placas de 96 pozos fueron incubadas durante 24 h a 37 °C en agitación orbital y tras ese tiempo el crecimiento fue monitoreado por medición del incremento de la densidad óptica a 550 nm utilizando un lector de microplacas (Biotek). De todos los pozos sin crecimiento visible se sacaron alícuotas de 100  $\mu$ L que fueron subcultivadas en placas con AN, agar BHI o ASD e incubadas durante 24 h a 37 °C. Finalmente, el establecimiento de la CMI definida como la mínima concentración del aceite a la cual no hubo crecimiento y la CMB o CMF como la mínima concentración del aceite que produjo la muerte del 99,9 %, de la población inicial, se realizó mediante los recuentos de células viables.

**Análisis estadístico:** Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion versión 17. Las diferencias estadísticas entre las muestras se determinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%, utilizando la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Análisis del aceite esencial:** Los rendimientos de los aceites esenciales fueron 0,2% para *P. marginatum* y 0,8% para *P. tuberculatum*, calculados en base al peso fresco del material vegetal utilizado. Ambos aceites esenciales presentaron color amarillo claro.

En la Tabla 1, se muestra la composición química de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum*, la cual indica el porcentaje de área de cada compuesto, así como sus tiempos de retención e índices de Kovats. Se logró determinar un 93,83% de los componentes en el aceite esencial de *Piper marginatum*, el cual se caracterizó por su

alto contenido de sesquiterpenos oxigenados (49,61%) tales como curzereno (22,44%) y atractilona (18,15%), representando los compuestos mayoritarios, seguido por sesquiterpenos hidrocarbonados (25,18%), especialmente germacreno D (6,50%) y  $\beta$ -cariofileno (5,07%). Mientras que, en el aceite esencial de *P. tuberculatum*, se identificó el 97,85% de los componentes químicos, en su mayoría de naturaleza fenilpropanoide (51,70%) dentro de los cuales se determinó dilapiol como compuesto principal en un 49,15%.

Los compuestos curzereno y atractilona detectados como principales en el aceite de *P. marginatum*, también se han reportado en los aceites esenciales de otras especies del género *Piper*, pero con menor frecuencia [18,19]. El sesquiterpeno curzereno ha mostrado propiedad anticancerígena frente a distintas líneas celulares tanto en ensayos *In Vitro* como *In Vivo* [20] y se le ha atribuido una significativa actividad frente al melanoma [21].

Estudios previos reportan que el curzereno se forma a través de una reacción [3.3]-sigmatrópica o rearreglo de Cope [22], a partir de 1,4-dienos, tales como el furanodieno, presentes en los aceites esenciales. Estas reacciones pueden ocurrir durante el proceso de extracción de aceite y/o durante un análisis de cromatografía de gases, en las cuales se han empleado temperaturas superiores a 200 °C, debido a la sensibilidad térmica del furanodieno [23].

Estudios previos señalan a los sesquiterpenos dentro de los componentes predominantes en la composición química del aceite esencial de *P. marginatum*. Así, se identificaron mayoritariamente sesquiterpenos como el germacreno D (36,6%),  $\beta$ -elemeno (12,6%), germacreno B (12,4%), en el aceite esencial de *P. marginatum* recolectado en el municipio de Turbaco, Colombia [24], mientras el aceite esencial de las raíces de *P. marginatum* recogidas en Porto Velho en Brasil, tuvo en su mayoría compuestos sesquiterpénicos como el biciclogermacreno (9,4%), germacreno D (8,33%), germacreno B (8,07%) [25].

**TABLA 1.**  
Composición química de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum*

Compuestos	TR (min.)	Área (%)	IKcal	Área (%)	IKcal	IKtab
		<i>P. marginatum</i>		<i>P. tuberculatum</i>		
<i>α</i> -Pino	5,41	2,34	930	1,01	930	932
Sabineno	6,31	0,12	962	0,29	962	969
<i>β</i> -Pino	6,41	2,93	965	0,43	965	974
<i>β</i> -Mirceno	6,69	0,10	974	0,51	984	988
<i>α</i> -Felandreno	7,09	-	-	0,48	996	1002
<i>α</i> -Terpineno	7,41	-	-	0,85	1005	1014
<i>p</i> -Cimeno	7,62	0,15	1002	1,16	-	1020
Limoneno	7,74	1,79	1007	4,40	1018	1024
1,8 Cineol	7,85	-	-	0,37	1023	1026
( <i>z</i> )- <i>β</i> -Ocimeno	7,94	1,39	1017	0,98	1027	1032
( <i>e</i> )- <i>β</i> -Ocimeno	8,25	2,58	1030	2,30	1041	1044
<i>γ</i> -Terpineno	8,59	-	-	0,89	1055	1054
Linalool	9,80	0,10	1093	1,32	1093	1095
Terpinen-4-ol	12,30	0,11	1175	0,92	1175	1174
Cuminaldehído	14,30	-	-	0,60	1239	1246
Piperitona	14,80	2,91	1256	19,57	1259	1249
<i>α</i> -Terpinen-7-al	15,76	-	-	0,52	1286	1281
Safrol	15,88	-	-	0,54	1290	1285
Z-Isosafrol	15,96	-	-	0,48	1292	1282
Carvacrol	16,26	-	-	0,28	1302	1298
<i>β</i> -Elemeno	19,20	3,02	1392	-	-	1406
<i>β</i> -Cariofileno	20,07	5,07	1421	1,14	1421	1417
<i>trans-α</i> -Bergamoteno	20,53	-	-	0,41	1437	1432
<i>α</i> -Humuleno	21,12	1,50	1458	0,54	1458	1452
Alloaromadrendeno	21,34	1,11	1465	-	-	1461
Germacreno D	21,96	6,50	1486	2,60	1486	1484
Germacreno A	22,37	3,16	1510	0,50	1499	1508
Biciclogermacreno	22,42	-	-	0,73	1501	1500
<b>Curzereno</b>	<b>22,45</b>	<b>22,44</b>	<b>1502</b>	-	-	<b>1499</b>
Valenceno	22,71	-	-	0,32	1510	1499
<i>δ</i> -Cadineno	22,98	-	-	1,34	1519	1522
Miristicina	23,13	-	-	1,53	1524	1523
Elemol	23,97	6,29	1550	-	-	1548
Germacreno B	24,21	4,82	1557	0,37	1557	1559
<i>trans</i> -Nerolidol	24,34	-	-	0,30	1561	1569
Espatulenol	24,81	1,92	1574	-	-	1577
Óxido de cariofileno	24,98	0,22	1579	-	-	1582
Viridiflorol	25,23	-	-	1,02	1587	1592
<b>Dilapiol</b>	<b>26,12</b>	<b>4,52</b>	<b>1618</b>	<b>49,15</b>	<b>1624</b>	<b>1620</b>
<i>β</i> -Eudesmol	26,86	0,31	1648	-	-	1649
<i>α</i> -Eudesmol	26,95	0,28	1652	-	-	1652
Atractilona	28,10	<b>18,15</b>	<b>1697</b>	-	-	1657
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		<b>11,25</b>		<b>12,14</b>		
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>3,12</b>		<b>22,70</b>		
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>		<b>25,18</b>		<b>7,95</b>		
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>49,61</b>		<b>1,32</b>		
<b>Fenilpropanoides</b>		<b>4,52</b>		<b>51,7</b>		
<b>Otros compuestos</b>		<b>0,15</b>		<b>2,04</b>		
<b>Total de componentes identificados</b>		<b>93,83</b>		<b>97,85</b>		

TR= Tiempo de retención; IKcal= Índice de Kovats calculado; IKtab= Índice de Kovats tabulado

Por el contrario, otras investigaciones de aceites de *P. marginatum* realizadas en países de América Central y otros de Sudamérica reportan los compuestos fenilpropanoides como los mayoritarios. Así, el aceite esencial de las hojas de

esta especie de Brasil reveló como principal compuesto a Z-asarona (30,4%), mientras que E-asarona fue mayoritario en la inflorescencia (22,1%) y tallo (32,6%) [26].

Además, en el análisis del aceite esencial de 22 muestras de hojas de *P. marginatum* colectadas en diferentes áreas de la Amazonía brasileña, se encontraron siete quimiotipos ricos en fenilpropanoides o sus derivados [27]. *P. marginatum* de Costa Rica exhibió anetol (45,9%) como compuesto mayoritario [28], mientras que, el aceite esencial de esta especie de *Piper* colectada en el municipio de Acandí, en Colombia, presentó *cis-p*-anetol (46,3%) y estragol (28,9%) como principales [24].

La comparación de los resultados obtenidos en el análisis químico del aceite esencial de *P. marginatum* colectada en la provincia de Guayas que se señalan en este trabajo con los reportados previamente en la literatura científica, permite que se aprecie una diferencia significativa en cuanto a los compuestos determinados y su proporción. Es bien conocido que la ubicación geográfica y la condición del hábitat afectan significativamente la composición química de los aceites esenciales [24], en este sentido, Moraes y col. (2014) [29] investigaron el efecto del tiempo de colección de las hojas de *P. marginatum* sobre el rendimiento del aceite esencial y sus componentes químicos, e indicaron un cambio en el ritmo circadiano, ya que la proporción de las clases químicas predominantes, fenilpropanoides y sesquiterpenos, variaron significativamente en las muestras colectadas en diferentes tiempos durante 24 h.

Estudios sobre la composición química del aceite esencial de *P. tuberculatum* de Venezuela, reportan un predominio del compuesto fenilpropanoide dilapiol [30], lo cual coincide con lo encontrado en la presente investigación. Sin embargo, estos datos difieren de la composición química de aceites esenciales de las hojas de esta especie colectadas en otras regiones, ya que los sesquiterpenos fueron el grupo químico predominante. Así, el aceite esencial de las hojas de *P. tuberculatum* colectadas en Brasil, contenían mayoritariamente  $\beta$ -cariofileno (40,2%) y espatulenol (15,77%) y los tallos,  $\beta$ -cariofileno (32,1%) [31,32]; en Colombia, el compuesto mayoritario fue  $\beta$ -farneseno [33]; mientras en Venezuela, fue el espatulenol (15,77%) [34]. También se ha informado de la presencia de monoterpenos como el  $\alpha$ -pineno (26,54%) y

$\beta$ -pineno (27,74%) en el aceite esencial de los frutos de *P. tuberculatum* [35].

Esta variabilidad intraespecífica puede responder a la ubicación geográfica, las condiciones ambientales y a las diferencias genéticas [7]. La presencia de dilapiol en las muestras colectadas en Ecuador, indicaría que *P. tuberculatum* pertenece a una variedad quimiotaxonómica diferente a las de otras regiones. El dilapiol se ha reportado como constituyente principal del aceite esencial de *P. aduncum* y posee una excelente capacidad insecticida y fungicida [36].

**Actividad antioxidante:** La aplicación del método del radical libre DPPH es una manera relativamente simple de evaluar la actividad antioxidante de extractos naturales debido a su fuerte capacidad donadora de hidrógeno. La capacidad antioxidante de los aceites esenciales se determinó a una concentración de 40 mg/mL. Los porcentajes de inhibición (% I) fueron 21% para *P. marginatum* y 45% para *P. tuberculatum* (Tabla 2). Para calcular la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>), el % I debe ser superior a 50% [37]. Estos resultados indican que la capacidad antioxidante de estos aceites esenciales es muy limitada. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los aceites esenciales de las especies evaluadas y el control ( $p < 0,05$ ).

**TABLA 2.**

Actividad antioxidante de los aceites esenciales por el método DPPH

Aceites esenciales	Porcentaje de inhibición*
<i>P. marginatum</i>	21,16 ± 0,58 <sup>a</sup>
<i>P. tuberculatum</i>	44,67 ± 0,39 <sup>b</sup>
<b>Control positivo</b>	
Ácido ascórbico	84,01 ± 0,25 <sup>c</sup>

\*Los valores se muestran como la media ± desviación estándar (n=3). Valores con letras distintas difieren estadísticamente en el test de Tukey ( $p < 0.05$ )

Es conocido que las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales se deben particularmente a la capacidad que poseen algunos de sus componentes, como los fenoles y terpenoides, para retrasar el estrés oxidativo en el sistema biológico. Sin embargo, algunos mecanismos propuestos explican que, mientras los compuestos fenólicos reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo

bloqueando la cadena oxidativa, los compuestos terpenoides presentes en el aceite esencial, principalmente los insaturados, pueden ser degradados por autooxidación, de manera similar a los lípidos insaturados, produciendo más especies reactivas capaces de propagar la cadena oxidativa [38]. Este hecho puede explicar la escasa capacidad antioxidante (21,16%) que presentó el aceite esencial de *P. marginatum*, ya que el análisis de la composición química arrojó porcentajes importantes de monoterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados, en un 11,25%, 25,18% y 49,61%, respectivamente. La presencia de curzereno como compuesto mayoritario (22,44%) pudo haber limitado la actividad antioxidante del aceite, lo que es similar a lo reportado en el estudio del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. que con un contenido de curzereno de 50,6% mostró un % I de 42,8% [21].

Podría esperarse una buena actividad antioxidante de los aceites esenciales con un gran contenido en compuestos fenólicos y un contenido modesto en terpenos insaturados. *P. tuberculatum* probablemente no mostró actividad antioxidante (% I < 50), a pesar de que dilapiol fue el compuesto mayoritario (49,15%), además safrol, Z-isosafrol y carvacrol también estaban presentes, esto debido a la presencia de terpenos insaturados minoritarios en el aceite esencial, los que podrían causar una reducción de la capacidad antioxidante de estos compuestos fenólicos [39].

Una investigación realizada en Colombia en la que se determinó la actividad antioxidante de los aceites esenciales de dos especímenes de *P. marginatum*, mostró que uno de los aceites con elevado contenido de fenilpropanoides, presentó una actividad antioxidante de 60% a una concentración de 2,5 µg/mL y el otro con germacreno D como componente mayoritario, tuvo una actividad de 90% a una concentración de 2 µg/mL [24]. En Brasil, el aceite esencial de las raíces de *P. marginatum* con el compuesto fenilpropanoide (*E*-anetol) predominante, mostró una actividad antioxidante de 93% a una concentración de 200 µg/mL [25]. En adición, este es el primer reporte sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de *P. tuberculatum*.

**Actividad antimicrobiana:** La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* fue evaluada frente a cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) y frente a la levadura *Candida albicans*.

La Tabla 3 muestra las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), las concentraciones mínimas bactericidas (CMBs) y las concentraciones mínimas fungicidas (CMFs) de los aceites esenciales frente a las estirpes microbianas determinadas por el método de microdilución en caldo. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales evaluados ( $p=0,9482$ ).

El aceite de *P. tuberculatum* ejerció un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, ya que se registraron CMI de 50-100 µg/mL y de 200-400 µg/mL, respectivamente; además, se evidenció una acción bactericida a la concentración de 200 µg/mL frente *S. aureus* y de 800 µg/mL frente *E. coli*. Sin embargo, ambas estirpes bacterianas exhibieron una sensibilidad moderada al aceite esencial de *P. marginatum* (CMI de 400-800 µg/mL y CMBs de 800 µg/mL).

Ambos aceites esenciales mostraron una actividad antimicótica moderada frente a *C. albicans* (CMI de 800-1600 µg/mL y CMF de 3200 µg/mL), pero inhibieron débilmente el crecimiento de las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* (1600-3200 µg/mL) y *K. pneumoniae* (3200-6400 µg/mL). *E. faecalis* resultó ser insensible a la acción de los dos aceites hasta la concentración de 6400 µg/mL.

Resultados similares fueron publicados en un estudio realizado en Brasil por Duarte y col (2007) [39], quienes mediante ensayos de microdilución evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. marginatum* frente a dos serotipos de *E. coli* y reportaron CMI de 700 y 900 µg/mL para los serotipos STEC0157 y EPEC0312, respectivamente. Sin embargo, estos autores señalaron que el aceite de *P. marginatum* no exhibió actividad frente a *C. albicans* a concentraciones inferiores de 2000 µg/mL [40].

TABLA 3

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* expresada como Concentración mínima inhibitoria (CMI µg/mL)

Microorganismo	Aceites esenciales (µg/mL)			
	<i>P. marginatum</i>		<i>P. tuberculatum</i>	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
<b>Bacterias Gram positivas</b>				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	400-800	800	50-100	200
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>6400	>6400	>6400	>6400
<b>Bacterias Gram negativas</b>				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	400-800	800	200-400	800
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1600-3200	6400	1600-3200	3200
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	3200-6400	>6400	3200-6400	>6400
<b>Levadura</b>				
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	800-1600	3200	800-1600	3200

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima bactericida; CMF: concentración mínima fungicida; ATCC: American type culture collection

La investigación sobre la determinación de la actividad antimicrobiana, por el método de microdilución, frente las bacterias ATCC *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *S. aureus* de aceites esenciales extraídos (usando dióxido de carbono supercrítico) de las semillas de *P. tuberculatum*, mostró un efecto inhibitorio pero no letal de los aceites sobre el crecimiento de *S. aureus* y *B. subtilis* en TBS, pero estos aceites no tuvieron ningún efecto antibacteriano frente a *P. aeruginosa* y *S. enterica* Typhimurium [33].

Estos resultados avalarían los usos tradicionales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* en casos de afectaciones dermatológicas y en trastornos gastrointestinales, entre ellos, diarrea [6,7].

Una de las propiedades de los aceites esenciales responsable de su actividad antimicrobiana, es su carácter hidrofóbico, por el cual, pueden romper las cadenas lipídicas presentes en las membranas celulares de los patógenos, permeabilizándolas y causando la pérdida de componentes intracelulares vitales [41].

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales podría estar condicionada por la actividad de sus componentes mayoritarios, sin embargo, hay evidencia del papel fundamental que desempeñan los compuestos minoritarios, al producir un efecto sinérgico entre componentes [41]. Aceites esenciales ricos en curzereno y en dilapiol como los de esta investigación han demostrado su efectividad antibacteriana [42,43].

Así mismo, algunos de los compuestos minoritarios identificados como  $\alpha$  y  $\beta$  pineno, piperitona, safrol, limoneno,  $\beta$ -cariofileno poseen probada actividad antibacteriana [41,44,45].

## CONCLUSIONES

Los principales constituyentes químicos encontrados en el aceite esencial de *P. marginatum* fueron los sesquiterpenos oxigenados, curzereno y atracilon, mientras que el aceite esencial de *P. tuberculatum* se caracterizó por la presencia del fenilpropanoide dilapiol. La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las especies de *Piper* estudiadas fue limitada, con un porcentaje de inhibición menor al 50%. Los resultados demuestran la capacidad inhibitoria de los aceites contra bacterias de importancia clínica como *E. coli* y *S. aureus*, lo cual avalaría sus aplicaciones etnobotánicas en casos de enfermedades dermatológicas y gastrointestinales, considerándolos una fuente significativa de nuevos productos antibacterianos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Universidad de Los Andes) y al Dr. Luis Rojas (QEPD) por el análisis de los resultados cromatográficos gases-masas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jaramillo MA, Manos PS, Zimmer EA. Phylogenetic relationship of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. *Int J Plant Sci.* 2004; 165(3): 403-417.
- [2] Ghosh R, Darin K, Nath P., Deb P. An overview of various *Piper* species for their biological activities. *Int J Pharma Res Rev.* 2014; 3(1): 67-75.
- [3] Ulloa C, Acevedo P, Beck S, Belgrano M, Bernal R, Berry P, Brako L, Celis M, Davidse G, Forzza R, Gradstein R, Hokche O, León B, León-Yáñez S, Magill R, Neill D, Nee M, Raven P, Stimmel H, Strong M, Villaseñor J. L, Zarucchi L, Zuloaga F, Jørgensen P. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science.* 2017; 358: 1614-1617.
- [4] Da Silva J, da Trindade R, Alves N, Figueiredo P, Maia J, Setzer W. Essential oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 2571-2613.
- [5] Bizzo HR, Hovell MC, Rezende CM. Brazilian essential oils: general view, developments and perspective. *Quim Nova,* 2009; 3: 588-594.
- [6] Brú J, Guzmán JD. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 26(6): 767-779.
- [7] Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, Valussi M, Tumer TB, Monzote Fidalgo L, Martorell M, Setzer WN. *Piper* species: A comprehensive review on their Phytochemistry biological activities and applications. *Molecules.* 2019; 24(7), 364.
- [8] Pretto I, Evaldt G, Machado A, Cibulski SP, Roehe PM, Alves L, Von Poser G. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Ind Crops Prod.* 2012; 40: 292-295.
- [9] Da Silva JK, Pinto LC, Burbano RM, Montenegro RC, Guimarães EF, Andrade E, Maia JGS. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind Crops Prod.* 2014; 58: 55-60.
- [10] Aumeeruddy E, Gurib-Fakim G, Mahomoodally F. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of *Mauritius*. *Ind Crops Prod.* 2015; 71: 97-204.
- [11] Souto RN, Harada AY, Andrade EH, Maia JG. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) Neotrop *Entomol.* 2012; 41: 510-517.
- [12] Adams RP. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. San Diego, USA: Academic Press; 1989.
- [13] Sandra P, Bicchi C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Heidelberg, Alemania: Huethig; 1987.
- [14] Lai LS, Chou ST, Chao WW. Studies on the antioxidant activities of Hsian-tsoo (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 963-968.
- [15] Murillo EO, Lombo L, Tique M, Méndez JJ. Potencial antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harns (Fabaceae.) *Inf Tecnol.* 2007; 18: 65-74.
- [16] Ollanketo M, Peltoketo A, Hartonen K, Hiltunen R, Riekkola ML. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: Antioxidant activity of the extracts. *Eur Food Res Technol.* 2002; 215(2): 158-163.
- [17] Moujir L, Seca A, Araujo L, Silva A, Barreto C. A new natural spiro heterocyclic compound and the cytotoxic activity of the secondary metabolites from *Juniperus brevifolia* leaves. *Fitoterapia.* 2011; 82(2):225-229.
- [18] Andrade EHA, Alves CN, Guimaraes EF, Carreira LMM, Maia JGS. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. *Biochem Syst Ecol.* 2011; 39: 669-675.
- [19] Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A. Composition of the essential oil of *Piper hispidum* Sw. from Cuba. *J Essent Oil Res.* 2004; 16: 459-460.
- [20] Da Costa J, Barroso A, Mourão R, da Silva J, Maia J., Figueiredo P. Seasonal and Antioxidant evaluation of Essential Oil from *Eugenia uniflora* L., Curzerene-Rich, Thermally Produced *in Situ*.

- Biomolecules. 2020; 10(2): 328; doi: 10.3390/biom10020328.
- [21] Figueiredo P, Pinto L., da Costa J, da Silva A, Mourão R, Montenegro R, da Silva J, Maia J. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. J Ethnopharmacol. 2019; 232: 30-38.
- [22] Baldovini FT, Casanova J. Identification and quantitative determination of furanodiene, heat-sensitive compounds, in essential oil by <sup>13</sup>C-NMR. Phytochemical Analysis. 2001; 12: 58-63
- [23] Chang R, de Moraes SAL, Napolitano DR, Duarte KC, Guzman VB, do Nascimento EA. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* (pitangueira) leaves. Rev Bras Farmacogn. 2011; 21: 392-396.
- [24] Jaramillo B, Julio J, Duarte E, González A, Julio L. Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. B Latinoam Caribe Pl. 2015; 14: 343-354.
- [25] Bay F, Abreu R, Teixeira F, Bay M, Soares M, Alves V. Antioxidant activity and characterization of the essential oil from the roots of *Piper marginatum* Jacq. Ciência e Natura. 2016; 38(3): 1504-1511.
- [26] Autran ES, Neves IA, da Silva CS, Santos GK, da Câmara CA, Navarro DM. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Biores Technol. 2009; 100: 2284-2288.
- [27] Andrade EH, Carreira LM, Silva MH, da Silva JD, Baston CN, Sousa PJ, Maia JG. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chem. Biodivers. 2008; 5: 197-208.
- [28] Vogler B, Noletto JA, Haber WA, Setzer WN. Chemical constituents of the essential oils of three *Piper* species from Monteverde, Costa Rica. J Essent Oil-Bear, Plants. 2006; 9: 230-238.
- [29] Moraes M, Da Silva T, Da Silva R, Ramos C, Da Câmara C. Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. B Latinoam Caribe Pl. 2014; 13(3): 270-277.
- [30] Mora FD, Peña JJ, Rojas LB, Usubillaga A, Meléndez P. Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L.C. Rich. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Mérida, Venezuela. Ciencia. 2008; 16(3): 365-369
- [31] Navickiene HM, Morandim AD, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DC, Telascrea M, Cavalheiro A, Lopes M, Bolzani B, Furlan M, Marques M, Young M, Kato MJ. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Quim Nova. 2006; 29(3): 467-470.
- [32] Morandim AA, Pin AR, Pietro NA, de Oliveira HC, Mendes MJ, Alecio AC, Kato M, Oliveira J, Furlan M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. J Med Plants Res. 2010; 4, 1810-1814.
- [33] Restrepo Z, Colmenares A, Mora L, Sánchez R. Extraction, chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of pipilongo (*Piper tuberculatum*) using supercritical carbon dioxide. Revista de Ciencias Universidad del Valle. 2013; 17(3): 45-56.
- [34] Ordaz G, D'Armas H, Yanez D, Moreno S. Chemical composition of essential oils from leaves of *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) and *Solanum subinerme* (Solanaceae) from Sucre, Venezuela. Rev Biol Trop. 2011; 59: 585-595.
- [35] Dos Santos V, Monteiro ÁB, Delmondes GA, do Nascimento EP, Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo FR, de Souza CK, Evangelista de Lacerda JF, Fernandes CN, Barbosa MO, Brasil AX, Tintino SR, Vega Gomez MC, Coronel C, Kerntopf MR. Antiparasitic activity and essential oil chemical analysis of the *Piper tuberculatum* Jacq Fruit. Iran J Pharm Res. 2018; 17(1): 268-275.
- [36] De Almeida RR., Souto RN, Bastos CN, da Silva MH, Maia JG. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole rich essential oil. Chem Biodivers. 2009; 6(9): 1427-1434.
- [37] Goupy PM, Hugues M, Boivin P, Amiot MJ. (1999) Antioxidant composition and activity of

barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. J Sci Food Agric. 1999; 79: 1625-1634.

[38] Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. J Agric Food Chem. 2013; 61: 10835-10847.

[39] Duarte M, Leme E, Delarmelina C, Soares A, Figueira G, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol. 2007; 111(2): 197-201.

[40] Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 2005; 97(2): 305-311.

[41] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. Int. J Food Microbiol. 2004; 94: 223-253.

[42] Hamzeh A, Ramezan A, Shiva M, Firoozeh C, Abdolhossein R. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from stems, leaves, fruits and roots of *Smyrniun cordifolium* Boiss. from Iran. J Essent Oil Res. 2006; 18(5): 574-577.

[43] Brazão M, Brazão F, Maia J, Monteiro M. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-

resistant strains. B Latinoam Caribe Pl. 2014; 13 (6): 517-526.

[44] Rondón ME, Velasco J, Cornejo X, Fernández J, Morocho V. Chemical composition and antibacterial activity of *Piper lenticellosum* C.DC essential oil collected in Ecuador. J Appl Pharm Sci. 2016; 6: 156-159.

[45] Han Y, Sun Z, Chen W. Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. Molecules. 2109; 25(1): 33.

**Moncayo Shirley**, Orcid ID:0000-0003-2374-497X

**Rondón María**, OrcidD ID: 0000-0003-2393-751X

**Araujo Liliana**. Orcid ID: 0000-0001-8762-1413

†**Rojas Luis**, Orcid ID: 0000-0003-4508-1927

**Cornejo Xavier**, Orcid ID: 0000-0002-4081-4047

**Guamán Walter**, Orcid ID: 0000-0002-8511-9427

**Jaramillo Soraya**, Orcid ID:0000-0002-2607-429X

Artículo original

# Microbiología del agua perteneciente al lago cratérico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Estudio inicial.

Microbiology of the water in the lake crateric volcanic Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Initial study.

González Marco<sup>1</sup>, Alarcón Diego<sup>1</sup>, Araque Judith<sup>1,4</sup>, Viteri Francisco<sup>1</sup>, Villacis Luis<sup>1</sup>, Escobar Sandra<sup>2,4</sup>, Araujo Liliana<sup>3</sup>, Medina Gerardo<sup>3,4</sup>, Andueza Felix<sup>1,4\*</sup>.

<sup>1</sup>Figempa. Universidad Central del Ecuador. Quito. CP. 170519. Ecuador. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba. CP. 060150 Ecuador. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional del Chimborazo. Riobamba. CP. 060150 Ecuador. <sup>4</sup>Postgrado de Química de Medicamentos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida. CP. 5101. Venezuela.

Recibido: febrero de 2021 –Aceptado: mayo de 2021

## RESUMEN

La microbiología del agua de los lagos crátericos volcánicos es un aspecto que se está investigando ampliamente, motivado a que su conocimiento puede ayudar a comprender el origen de la vida en la tierra, así como descubrir nuevas sustancias químicas de origen microbiano con distintas aplicaciones farmacéuticas e industriales. En Ecuador existen cinco lagos crátericos volcánicos, pero son muy pocos los estudios microbiológicos. Por ello, el objetivo del trabajo fue realizar un estudio preliminar sobre la microbiología del agua del lago cratérico Cuicocha, situado a 3072 m.s.n.m. en la Provincia de Imbabura-Ecuador. Se recolectaron muestras de agua provenientes de ocho sitios de muestreo según lo indicado por la norma ecuatoriana NTE-INEN-2169-2013. Se cuantificaron los grupos bacterianos mediante la técnica de filtración de membrana de acuerdo con lo indicado por Andueza (2007) utilizando el agar R<sub>2</sub>A para las bacterias heterótrofas, el agar azul eosina de metileno para coliformes totales, agar cetrimida para *Pseudomonas*, agar manitol salado para *Staphylococcus* y el agar sabouraud con cloranfenicol para los hongos. En el análisis

microbiológico se logró contabilizar un valor promedio de bacterias heterótrofas de  $1,65 \times 10^2$  UFC/mL, *Pseudomonas* de  $1,25 \times 10$  UFC/mL, *Staphylococcus* de  $0,6 \times 10$  UFC/mL y hongos de  $0,4 \times 10$  UFC/mL. En ninguna de las muestras se detectaron coliformes. Los valores del recuento microbiológico indican que se trata de un agua no estéril con una población microbiana viable cultivable escasa, la cual debe ser identificada, caracterizada, estudiada y preservada.

## PALABRAS CLAVE

Microbiología, lagos crátericos volcánicos, Cuicocha, Imbabura, Ecuador.

## ABSTRACT

The microbiology of the water of volcanic crater lakes is an aspect that is being widely investigated, so that its knowledge and understanding can help to know the origin of life on earth, as well as find new chemical substances of microbial origin with different pharmaceutical and industrial applications. In Ecuador there are five volcanic crater lakes, but there are very few microbiological studies.

Therefore, the objective of the work was to carry out a preliminary study on the microbiology of the water of the Cuicocha crater lake, located at 3,072 meters above sea level. in the Province of Imbabura-Ecuador. Water samples were collected from eight sampling sites as indicated by the Ecuadorian standard NTE-INEN-2169-2013. Bacterial groups were quantified by means of the membrane filtration technique as indicated by Andueza (2007) using R<sub>2</sub>A agar for heterotrophic bacteria, methylene blue eosin agar for total coliforms, cetrimide agar for *Pseudomonas*, salty mannitol agar for *Staphylococcus* and sabouraud agar with chloramphenicol for fungi. In the microbiological analysis, an average value of heterotrophic bacteria of  $1.65 \times 10^2$  CFU/mL, *Pseudomonas* of  $1.25 \times 10$  CFU/mL, *Staphylococcus* of  $0.6 \times 10$  CFU/mL and fungi of  $0.4 \times 10$  CFU/mL was recorded. Coliforms were not detected in any of the samples. The microbiological count values indicate that we are in the presence of a non-sterile water with a few viable culturable microbial populations, which must be identified, characterized, studied, and preserved.

## KEY WORDS

Microbiology, volcanic crater lakes, Cuicocha, Imbabura, Ecuador.

## INTRODUCCIÓN

La actividad volcánica ha jugado un papel importante en la formación de lagos y lagunas en varias regiones del mundo [1,2].

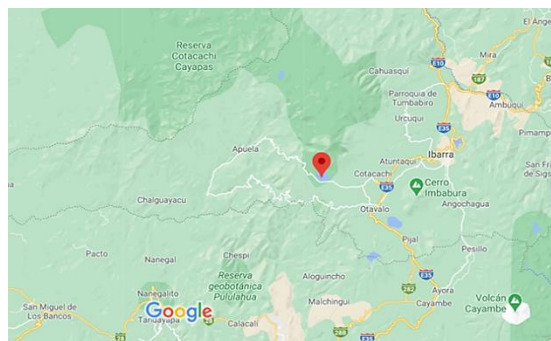
Los lagos crátericos son lagos volcánicos alojados en las calderas de volcanes. Estos volcanes pueden formar cráteres centrales o en la cima a través de procesos eruptivos explosivos. Luego de la conformación del cráter, debido a influencias climáticas, geoquímicas, procesos hidrogeológicos y de desgasificación, el cráter se va llenando de agua y forma un lago cráterico a lo largo de milenios [3].

Los lagos volcánicos crátericos son sitios con diversas condiciones extremas, tales como alta

incidencia de rayos UV, altas concentraciones de sales, ubicación en altitudes por encima de los 3000 m.s.n.m., temperaturas bajas y oligotrofia. A pesar de estas condiciones extremas para la vida, las investigaciones realizadas en varios lagos crátericos ubicados en diferentes partes del mundo, indican que estos ambientes no son estériles y en ellos se han detectado diversos tipos de comunidades microbianas que viven en estos ecosistemas acuáticos, siendo tolerantes a grandes fluctuaciones en los factores ambientales, así como con características fenotípicas y genotípicas especiales que les han permitido adaptarse a estos ecosistemas a través del tiempo [4, 5, 6, 7].

En Ecuador existen varios lagos crátericos, tales como los lagos Cuicocha, Chalpatan, Amarillo, Mojanda y el Quilotoa en donde se han realizado investigaciones de naturaleza geológicas, limnológicas y químicas [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14], pero en muy pocos se ha realizado estudios sobre su microbiología [15].

Cuicocha es un lago cráterico ubicado en la cordillera occidental de los Andes ecuatorianos, localizado a unos 100 km al norte de Quito, cerca de la población de Otavalo, en la provincia de Imbabura. Está situado a una altura de 3072 metros sobre el nivel del mar, posee un diámetro de 3,2 km, una superficie de 3,78 km<sup>2</sup> con una profundidad máxima de 148 metros. Presenta en el centro del lago dos islas, la isla Yerovi de una superficie de 0,26 km<sup>2</sup> y la isla Wolf con una superficie de 0,41 km<sup>2</sup> [12, 13] (Figuras 1 y 2).



**Fig. 1.** Ubicación geográfica del lago cráterico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador Fuente: Google Maps, 2020.

Es un lago adyacente al volcán Cotacachi que de acuerdo con los datos geológicos que se disponen, el volcán donde se aloja sufrió una serie de erupciones intensas con emisión de cenizas,

lahares y el colapso de la caldera entre los años 2900 AC y 700 DC, llegándose a formar, ulterior a estos acontecimientos, un lago en la caldera que ha sido llenado tanto por agua de lluvia como por agua hidrotermal [12, 13].



**Fig. 2.** Fotografía del lago cratérico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador. Fuente: Alicia Flores, 2019

El mapa batimétrico del lago de Cuicocha muestra dos cuencas lacustres separadas, una con una profundidad máxima de 148 metros que se extiende al este de las islas, y la otra cuenca con una profundidad máxima de 78 metros, situada hacia la parte oeste del lago. La declinación de la zona litoral del lago es extremadamente alta [12, 13]

En base a lo señalado en los párrafos anteriores se realizó el presente trabajo preliminar de manera de cuantificar la población microbiana viable cultivable que pudiera habitar las aguas del lago Cuicocha.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestras:** Para realizar el presente trabajo se realizaron dos campañas de muestreos en el lago cratérico volcánico Cuicocha, situado a 3072 m.s.n.m. en la Provincia de Imbabura. Ecuador.

Los muestreos se realizaron durante el año 2019. Se tomaron 32 muestras de agua del lago Cuicocha. Las muestras de agua se recolectaron en 8 sitios seleccionados a lo largo y ancho del lago a nivel de la superficie. Se identificaron las coordenadas geográficas de los sitios de recolección mediante un GPS (Garmin eTrex20).

En cada ocasión de muestreo, se recolectaron dos muestras de agua de un volumen de 1 litro, en cada uno de los sitios de muestreos seleccionados. Para la recolección de las muestras se utilizaron

frascos esterilizados y un muestreador de agua Van Dorn (Wildco Instruments y modelo: 3-1120-G45).

Las muestras se cubrieron con papel aluminio para evitar el paso de luz solar, se sellaron con cinta de embalaje previniendo el derrame y se etiquetaron con sus respectivas condiciones, trasladándose bajo refrigeración en una cava hasta el laboratorio, realizándose los análisis microbiológicos dentro de las 24 horas luego de la toma [16, 17].

**Medios de cultivo:** Los medios de cultivo que se utilizaron se prepararon a partir de las formas deshidratadas suministradas por las casas comerciales. Se reconstituyeron con agua destilada y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos a 15 PSI de presión.

**Siembra y recuento de bacterias heterótrofas:** La siembra y el recuento de bacterias heterótrofas se realizó por la técnica de filtración por membrana de 0,45 µm de poro (Milipore). Se utilizó el agar R<sub>2</sub>A (Oxoid) incubando a 30 °C durante un máximo de 7 días. El volumen de muestra de agua filtrada fue de 100 mL. Los resultados se expresaron como medias aritméticas de las unidades formadoras de colonias UFC por mililitro [18].

**Siembra y recuento de coliformes:** La investigación del grupo de bacterias coliformes se realizó por la técnica de filtración de membrana. Se filtraron 100 mL de las muestras de agua a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro (Milipore) que se transfirió al agar azul eosina de metileno (Oxoid), contenido en una placa Petri. Se incubaron a 37 °C durante 24-72 horas. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias típicas rojo ladrillo o naranja y se expresó el resultado en UFC por 100 mL de agua [18].

**Siembra y recuento de *Pseudomonas*:** Para estudiar la presencia de *Pseudomonas* se utilizó la técnica de filtración en membrana, filtrando un volumen de 100 mL de muestra de agua y utilizando filtros de 0,45 µm de poro (Milipore) los cuales se colocaron en agar cetrimida (Oxoid) y se incubaron a 37 °C durante 7 días. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias crecidas y se expresó el resultado en UFC por 100 mL de agua [18].

**Siembra y recuento de *Staphylococcus*:** Para la investigación de *Staphylococcus* se filtraron 100

mL de agua del lago, a través de un filtro de 0,45 µm de poro (Milipore). El filtro se introdujo en un matraz con 100 mL de caldo nutritivo, incubándose a 37° C durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se tomó un asa de cultivo y se sembró por estría en superficie en el medio de agar manitol salado (Oxoid), el cual se incubó a 37 °C durante 5 días. Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias crecidas y se expresó el resultado en UFC por 100 mL de agua [18].

**Siembra y recuento de hongos:** Para el estudio de los hongos se empleó la técnica de filtración en membrana. Se filtraron 100 mL de la muestra de agua, empleando filtros de 0,45 µm de poro (Milipore) que se depositaron en placas con medio de cultivo agar Sabouraud con cloranfenicol (Oxoid), las cuales se incubaron a 24 °C por 14 días. Al finalizar el período de incubación se

contaron las colonias típicas de hongos y se expresó el resultado en UFC por 100 mL de muestra [18].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Son pocas las investigaciones que se han realizado en Ecuador sobre las características microbiológicas del agua de los lagos cratéricos volcánicos que existen en el país [15]. En este sentido, existen muy pocos trabajos con que comparar los datos obtenidos en los análisis microbiológicos.

En la tabla 1 se resumen los valores promedios obtenidos de cada uno de los grupos microbianos evaluados durante el primer muestreo, y en la tabla 2 los obtenidos durante el segundo muestreo.

**TABLA 1.**

Recuento promedio de bacterias heterótrofas, coliformes, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y hongos viables del agua del lago Cuicocha. Imbabura. Ecuador. Primer muestreo.

Punto	Longitud	Latitud	Bacterias heterótrofas (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)	<i>Pseudomonas</i> (UFC/mL)	<i>Staphylococcus</i> (UFC/mL)	Hongos (UFC/mL)
1	794757,125	10035418,128	1,02 x 10 <sup>2</sup>	0	1,0 x 10	0,7 x 10	0
2	794528,541	10033654,415	1,74 x 10 <sup>2</sup>	0	1,8 x 10	0	1,2 x 10
3	794211,414	10034205,851	1,32 x 10 <sup>2</sup>	0	1,6 x 10	0	0
4	793414,451	10033712,455	1,48 x 10 <sup>2</sup>	0	1,9 x 10	0	0
5	792810,518	10033058,418	1,54 x 10 <sup>2</sup>	0	1,5 x 10	0,5 x 10	0,6 x 10
6	792731,219	10033125,451	1,34 x 10 <sup>2</sup>	0	1,1 x 10	0,6 x 10	0
7	792325,323	10033437,150	2,07 x 10 <sup>2</sup>	0	1,2 x 10	1,4 x 10	0
8	792280,514	10033419,622	1,92 x 10 <sup>2</sup>	0	1,0 x 10	0,8 x 10	0,3 x 10
<b>Media</b>	-	-	1,55 x 10 <sup>2</sup>	0	1,4 x 10	0,5 x 10	0,3 x 10
<b>Desviación estándar</b>	-	-	34,36	-	3,60	4,93	4,37
<b>Varianza</b>	-	-	1032,73	-	11,36	21,25	16,73

**Punto:** Punto de muestreo. **UFC/mL:** Unidades formadoras de colonias/mililitro

Al observar los resultados de la tabla 1 se puede indicar que el número de bacterias heterótrofas estuvo en un rango de 1,02 x 10<sup>2</sup> a 2,07 x 10<sup>2</sup> UFC/mL, con un valor promedio de 1,55 x 10<sup>2</sup> UFC/mL. En el caso del segundo muestreo (ver tabla 2) los valores obtenidos estuvieron en el rango de 1,24 x 10<sup>2</sup> a 2,00 x 10<sup>2</sup> UFC/mL, con un valor promedio de 1,75 x 10<sup>2</sup> UFC/mL.

La enumeración de las bacterias heterótrofas provee una estimación del número total de bacterias viables y da información acerca de la calidad sanitaria del agua y del estado eutrófico de un ecosistema acuático [19, 20, 21]. Se interpreta

que cuando el resultado del número de bacterias heterótrofas viables es superior a 200 UFC/mL, se ha desarrollado algún problema bacteriano en el agua [22]. La academia nacional de ciencias de los Estados Unidos de Norteamérica recomienda que el límite de bacterias heterótrofas viables en un agua debe ser de un máximo de 300 UFC/mL [23].

Los resultados obtenidos en esta investigación son bajos y aunque no existe normativa en Ecuador que indique los valores máximos permitidos para este tipo de microorganismos en aguas de uso recreativo, como es el caso del agua del lago Cuicocha, si se toma en referencia y se compara

con lo indicado por la academia nacional de ciencia de los Estados Unidos de Norteamérica [23], quienes señalan que valores de microorganismos heterótrofos superiores a 300 UFC/mL, pueden

representar un riesgo sanitario, se podría indicar que las aguas del lago Cuicocha tienen una buena calidad microbiológica.

**TABLA 2.**

Recuento promedio de bacterias heterótrofas, coliformes, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y hongos viables del agua del lago Cuicocha. Imbabura. Ecuador. Segundo muestreo.

Punto	Longitud	Latitud	Bacterias heterótrofas (UFC/mL)	Coliformes (UFC/mL)	<i>Pseudomonas</i> (UFC/mL)	<i>Staphylococcus</i> (UFC/mL)	Hongos (UFC/mL)
1	794757,125	10035418,128	2,00 x 10 <sup>2</sup>	0	1,0 x 10	0,7 x 10	0,5 x 10
2	794528,541	10033654,415	1,24 x 10 <sup>2</sup>	0	0,6 x 10	0	0
3	794211,414	10034205,851	2,00 x 10 <sup>2</sup>	0	1,2 x 10	0,7 x 10	0
4	793414,451	10033712,455	1,78 x 10 <sup>2</sup>	0	2,0 x 10	0	0
5	792810,518	10033058,418	1,87 x 10 <sup>2</sup>	0	0,7 x 10	1,8 x 10	1,4 x 10
6	792731,219	10033125,451	1,45 x 10 <sup>2</sup>	0	1,0 x 10	0	0
7	792325,323	10033437,150	2,00 x 10 <sup>2</sup>	0	0,7 x 10	1,0 x 10	1,0 x 10
8	792280,514	10033419,622	1,65 x 10 <sup>2</sup>	0	1,4 x 10	1,0 x 10	0,7 x 10
<b>Media</b>	-	-	1,75 x 10 <sup>2</sup>	0	1,1 x 10	0,7 x 10	0,5 x 10
<b>Desviación estándar</b>	-	--	28,36	-	4,62	6,37	5,45
<b>Varianza</b>	-	-	703,61	-	18,69	35,5	26

**Punto:** Punto de muestreo. **UFC/mL:** Unidades formadoras de colonias/mililitro

Las aguas de los lagos volcánicos cratéricos constituyen ecosistemas oligotróficos donde los niveles de materia orgánica son sumamente bajos y con una limitada biodisponibilidad. La población microbiana de estos ecosistemas son en su mayoría bacterias heterótrofas, que, debido a los problemas en la carencia de nutrientes, entran en un estado de sobrevivencia denominado “viables no cultivables” [24, 25, 26, 27] y por ello se consiguen valores muy bajos cuando se intenta aislarlas en medios de cultivos apropiados [18]. Un gran número de las bacterias que se encuentran en estas aguas oligotróficas presentan un crecimiento lento y requerimientos nutricionales muy específicos y sólo se detectan de un 5-10 % de las bacterias existentes en los sitios estudiados [28].

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo en relación con las bacterias heterótrofas, con los observados por otros autores en varias partes del mundo en diferentes tipos de lagos de alta montaña, entre ellos lagos cratéricos, se observan que los valores son similares y el número y variedad de microorganismos es bajo [15, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36].

Durante el desarrollo de la investigación en ninguna de las muestras estudiadas se pudo detectar la presencia de células pertenecientes al grupo de

bacterias coliformes, lo cual estaría indicando que la contaminación microbiana es escasa y que la calidad sanitaria de este ecosistema acuático es buena. Se ha indicado que las bacterias coliformes requieren de materia orgánica para crecer y en el caso del agua del lago Cuicocha, se está en presencia de un ecosistema oligotrófico, lo cual no permitiría la supervivencia y el crecimiento de los coliformes [37].

Las bacterias del género *Pseudomonas* fue otro de los grupos microbianos que se estudiaron. Los valores del conteo obtenido durante el primer muestreo variaron entre 1,00 x 10 a 1,90 x 10 UFC/mL, con un valor promedio de 1,40 x 10 UFC/mL (ver tabla 1). En el caso del segundo muestreo, los valores fluctuaron entre 0,60 x 10 a 2,00 x 10 UFC/mL, con un valor promedio de 1,10 x 10 UFC/mL (ver tabla 2).

Las bacterias del género *Pseudomonas* intervienen en diversos procesos ecológicos y son esenciales en los hábitats acuáticos ya que degradan la materia orgánica, siendo, además, una bacteria muy ubicua capaz de colonizar diversos ecosistemas acuáticos debido a su capacidad de sobrevivir en ambientes oligotróficos dada su versatilidad enzimática [38, 39, 40].

Miembros del género *Pseudomonas* se han aislados en diversos lagos cratéricos volcánicos del mundo, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo [15, 41, 42, 43, 44], así como en el agua de lagos de alta montaña [30, 31].

Además de las bacterias del género *Pseudomonas*, también se investigó la presencia de bacterias del género *Staphylococcus*, obteniéndose valores promedios en el recuento de este género bacteriano durante el primer muestreo fluctuantes entre valores de 0 y  $1,40 \times 10$  UFC/mL, con un valor promedio de  $0,50 \times 10$  UFC/mL (ver tabla 1). En el caso del segundo muestreo los valores obtenidos variaron entre  $0,70 \times 10$  y  $1,80 \times 10$  UFC/mL, con un valor promedio de  $0,70 \times 10$  UFC/mL (ver tabla 2).

Los miembros del género *Staphylococcus* pueden vivir en concentraciones elevadas de sales, lo que hace posible que se encuentren en aguas con altos valores de concentración salina, como es el caso del agua del lago Cuicocha [12]. La presencia de este tipo de bacterias en aguas naturales ya ha sido indicada por otros autores en muestras de aguas de lagos de alta montaña, lagos volcánicos y aguas minerales naturales [15, 18, 30, 31, 42, 45, 46, 47].

Otro de los parámetros microbiológicos evaluados fue la cuantificación de células de hongos presentes en el agua del lago Cuicocha, obteniéndose durante el primer muestreo valores entre 0 y  $1,20 \times 10$  UFC/mL, con un valor promedio de  $0,30 \times 10$  UFC/mL (ver tabla 1). Durante el segundo muestreo los valores observados estuvieron entre 0 y  $1,40 \times 10$  UFC/mL, con un valor promedio de  $0,50 \times 10$  UFC/mL (ver tabla 2).

Existen muy pocos trabajos en donde se indique la presencia de células de hongos en ecosistemas de aguas naturales extremos, como es el caso del agua de los lagos cratéricos volcánicos. Estos microorganismos pueden vivir de la descomposición de residuos vegetales y su presencia, en número alto, indica una contaminación del agua [48, 49, 50, 51, 52]. Además, los hongos para su crecimiento requieren de altas concentraciones de nutrientes y en el caso del agua del lago volcánico Cuicocha se trata de un lago oligotrófico, por lo cual los bajos valores obtenidos coinciden con las condiciones fisicoquímicas y eutróficas del lago [12, 53].

En el presente estudio se pudo detectar la presencia de hongos, pero en muy baja cantidad, resultado similar a los obtenidos por investigadores en diferentes partes del mundo para este tipo de ecosistemas [15, 54, 55, 56].

## CONCLUSIONES

Los lagos cratérico volcánicos no son ambientes estériles, en las aguas oligotróficas de estos ecosistemas se han adaptado diversos tipos de microorganismos, muchos de los cuales pueden crecer en medios de cultivos y ser cuantificados y caracterizados. En el agua del lago cratérico volcánico Cuicocha se pudo cuantificar, a través de técnicas tradicionales de microbiología, la existencia de una población microbiana viable cultivable perteneciente a microorganismos heterótrofos escasa en número, constituida principalmente por bacterias, aunque se evidencia también la presencia de células fúngicas.

## AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Central del Ecuador por facilitar los fondos económicos para el desarrollo del presente trabajo a través del proyecto senior 045 y a la Universidad Nacional del Chimborazo y a la Universidad de los Andes, por la colaboración y asesoramiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Roldán G. Fundamentos de limnología tropical.: Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 1992.
- [2] Salazar-Sánchez M, Naundorf-Sanz G, Medina-Tombe M. Composición, dinámica y abundancia de la comunidad fitoplanctónica de una laguna con aguas de origen volcánico. Revista Luna Azul, 2011; 33: 46-60.
- [3] Rouwet D, Christenson B, Tassi F, Vandemeulebrouck J. Volcanic Lakes, Advances in Volcanology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2015. DOI 10.1007/978-3-642-36833-2\_1.

- [4] Demergasso C, Casamayor EO, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedros-Alio C. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004; 48: 57-69.
- [5] Escudero L, Chong G, Demergasso C. Investigating microbial diversity and UV radiation impact at the high altitude lake Aguas Calientes, Chile Proc. SPIE. Conf. 2007; 6694: 1-12.
- [6] Dib J, Motok J, Fernández Zenoff V, Ordoñez O, Farías M. Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high altitude (above 4,400 m) Andean Lakes. *Curr Microbiol.* 2008; 56(5): 510-7.
- [7] Fernández Zenoff V, Heredia J, Ferrero M, Siñeriz F, Farías M. Isolation of UV resistant bacteria from high altitude Andean Lake bacterial community. *Curr. Microbiol.* 2006; 52: 359-362.
- [8] Barberi F, Coltelli M, Ferrara G, Innocenti F, Navarro JM, Santacroce R. Plio Quaternary volcanism in Ecuador. *Geol. Mag.* 1988; 125: 1-14.
- [9] Aguilera E, Chiodini G, Cioni R, Guidi M, Marini L, Raco B. Water chemistry of Lake Quilotoa (Ecuador) and assessment of natural hazards. *Journal of Volcanology and Geothermal Research.* 2000; 97: 271-285.
- [10] Coltorti M, Ollier CD. Geomorphic and tectonic evolution of the Ecuadorian Andes. *Geomorphology.* 2000; 32: 1-19.
- [11] Gunkel G, Viteri F, Beulker C, Grupe B. Accumulation of Carbon Dioxide in Deep Caldera Lakes of Ecuador: Evaluation and Monitoring of Possible Gas Eruptions. Investigation, Quito. Technical University of Berlin-Department of Water Quality Control. 2007.
- [12] Gunkel G, Beulker C, Grupe B, Viteri F. Hazards of volcanic lakes: analysis of Lakes Quilotoa and Cuicocha, Ecuador. *Advances in Geosciences, European Geosciences Union.* 2008; 14: 29-33.
- [13] Gunkel G, Beulker C, Grupe B, Viteri F. Survey, and assessment of post volcanic activities of a young caldera lake, Lake Cuicocha, Ecuador. *Natural Hazards and Earth System Sciences.* 2009; 9 (3): 699-712.
- [14] Orellana J. Volcán Quilotoa. Breve Resumen de su Historia, Geología y Actividad Eruptiva. Peligros Potenciales Asociados. En Instituto Geofísico Escuela Politécnica Nacional. 2009. [En línea]. Quito, disponible en: <https://www.igeepn.edu.ec/publicaciones-para-la-comunidad/comunidad-espanol/33triptico-quilotoa-historia-peligros-y-sistema-de-monitoreo>. [Acceso el día 23 de octubre del 2020].
- [15] González M, Acuña J, Escobar J, Viteri F, Villacis L, Araujo L, Araque, J, Andueza, F. Initial microbiological study of the water in the crateric volcanic lake Quilotoa. Cotopaxi. Ecuador. Abstract book ISME Virtual Microbial Ecology Summit. International Society for Microbial Ecology. South África. 2020.
- [16] INEN. NTE INEN 2169:2013. Agua. Calidad del Agua. Muestreo. Manejo y Conservación de Muestras. Instituto Ecuatoriano de Normalización 2169. Primera Edición. Quito-Ecuador. 2013.
- [17] INEN. NTE INEN 2176:2013. Agua. Calidad del Agua. Muestreo. Técnicas de Muestreo. Instituto Ecuatoriano de Normalización 2176. Primera Edición. Quito-Ecuador. 2013.
- [18] Andueza Félix. Diversidad Microbiana de las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, España. 2007.
- [19] Rodier J. Análisis de las aguas: Aguas naturales, Aguas Residuales, Aguas de Mar. Omega. Barcelona. España. 1988.
- [20] Roldán G, Ramírez J. Fundamentos de Limnología Neotropical. Segunda Edición. Antioquia. Universidad de Antioquia. Antioquia. Colombia. 2008.
- [21] Allen M, Edberg S, Reasoner D. Heterotrophic plate count bacteria what is their significance in drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 92: 265-274.
- [22] Bartram J, Cotruvo J, Dufour A, Hazan S, Tanner B. Heterotrophic plate count. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 92: 239-240.
- [23] National Academy of Science. Drinking water and Health. Vol 1. National Academy of Science (NAS). National Academy Press. Washington. USA. 1977.
- [24] Morita R. Starvation-survival of heterotrophic in the marine environment. *Adv. Microbiol. Ecol.* 1982; 6: 117-198.
- [25] Byrd J, Xu H, Colwell R. Viable but non-culturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57: 875-878.
- [26] Mukamolova G, Kaprelyants A, Kell D, Young M. Adoption of the transiently non-culturable state a bacterial survival strategy. *Adv. Microb. Physiol.* 2003; 47: 65-129.
- [27] Su X, Chen X, Hu J, Shen C, Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. *World J*

- Microbiol Biotechnol. 2013; 29, 2213–2218. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1390-5>.
- [28] Rappe M, Giovannoni S. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003; 57: 369-394.
- [29] Ordoñez OF. Factores ambientales extremos en ecosistemas microbianos de humedales altoandinos: mecanismos de adaptación. Ph.D. thesis from Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina. 2012.
- [30] Barranco C, Araque J, Andueza F. Bacterias heterótrofas del agua de lagunas de alta montaña de los Andes Venezolanos. *Revista portuguesa de Farmacia, Suplemento especial.* 2011; LII (5): 40.
- [31] Bravo D, Trimachi M, Loewenthal J, Araque J, Andueza F. Microbiota bacteriana viable cultivable del agua de lagunas de alta montaña en los Andes Venezolanos. *Revista Hechos en Microbiología.* 2014; 5 (2): 80.
- [32] Albarracín VH, Kurth D, Ordoñez OF, Belfiore C, Luccini E, Salum GM, Piacentini RD, Farías ME. High-up: a remote reservoir of microbial extremophiles in central Andean wetlands. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1404.
- [33] Mapelli F, Marasco R, Rolli E, Daffonchio D, Donachie S, Borin S. Microbial Life in Volcanic Lakes. In: Rouwet D., Christenson B., Tassi F., Vandemeulebrouck J. (eds) *Volcanic Lakes. Advances in Volcanology.* Springer, Berlín, Heidelberg. 2015.
- [34] Albarracín VH, Gärtner W, Farias ME. Forged under the sun: life and art of extremophiles from Andean lakes. *Photochem Photobiol* 2016; 92: 14-28.
- [35] Albarracín VH, Galván FS, Farias ME. Extreme Microbiology at Laguna Socompa: A High-Altitude Andean Lake (3570 m.a.s.l.) in Salta, Argentina. In: Farías M. (eds) *Microbial Ecosystems in Central Andes Extreme Environments.* Springer, Cham. 2020 [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36192-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36192-1_14).
- [36] Farias M. Microbial ecosystem in central Andes, extreme environments. Springer. Switzerland. 2020.
- [37] Boulam M, Mathieu L, Fass S, Cavard J, Gatel D. Relationship between coliform culturability and organic matter in low nutritive waters. *Water Res.* 2002; 36: 2618-2626.
- [38] Campa M, Bendinelli M, Friedman H. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Ed. Plenum press. New York. USA. 1993.
- [39] Kurath G, Morita Y. Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45: 1206-1211.
- [40] Verón M. *Pseudomonas*. In: *Bacteriologie Medicale.* Ed. Flammarion. Paris. France. 1989.
- [41] Gaidos E, Lanolil B, Thorsteinsson T, Graham A, Skidmore M, Han S, Rust T, Popp B. A Viable Microbial Community in a Subglacial Volcanic Crater Lake, Iceland. *Astrobiology.* 2004; 4(3): 1-7.
- [42] Demergasso C, Dorador C, Meneses D, Blamey J, Cabrol N, Escudero L, Chong G. Prokaryotic diversity pattern in high-altitude ecosystems of the Chilean Altiplano. *J. Geophys. Res.* 2010; 115: 2-14. doi:10.1029/2008JG000836.
- [43] Rincón-Molina C, Hernández-García J, Rincón-Rosales R, Gutiérrez-Miceli F, Ramírez-Villanueva D, González-Terreros E, Peña-Ocaña B, Palomeque-Domínguez H, Dendooven L, Ruíz-Valdiviezo V. Structure and Diversity of the Bacterial Communities in the Acid and Thermophilic Crater-Lake of the Volcano “El Chichón”, México, *Geomicrobiology Journal.* Vol. 2019; 36: 97-109. doi: 10.1080/01490451.2018.1509158.
- [44] Tapia-Vázquez I, Sánchez-Cruz R, Arroyo-Domínguez M, Lira-Ruan V, Sánchez-Reyes A, Sanchez-Carbente M, Padilla-Chacón D, Batista-García R, Folch-Mallol J. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in México. *Microbiol Res.* 2020; 232: 1-12.
- [45] Queck SY, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative Staphylococci. In: Lindsay J (ed) *Staphylococcus: Molecular Genetics.* Caister Academic Press, Norfolk, pp 227–254. 2008.
- [46] Meldrum R. Survey of *Staphylococcus aureus* contamination in a hospital's spa hydrotherapy pools. *Commun. Dis. Public Health.* 2001; 4: 205-208.
- [47] Aguirre-Garrido JF, Ramírez-Saad HC, Toro N, Martínez-Abarca F. Bacterial Diversity in the Soda Saline Crater Lake from Isabel Island, México. *Microb. Ecol.* 2016; 71: 68–77. doi.org/10.1007/s00248-015-0676-6.
- [48] Niemi R.M, Knuth S, Lundstrom K. Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982; 43: 378-388.

- [49] Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS. Microbiol. Rev.* 2002; 26: 207-222.
- [50] Connell L, Staudigel H. Fungal Diversity in a Dark Oligotrophic Volcanic Ecosystem (DOVE) on Mount Erebus, Antarctica. *Biology.* 2013; 2: 798-809. doi:10.3390/biology2020798.
- [51] Wurzbacher C, Bärlocher F, Grossart H. Fungi in lake ecosystems. *Aquat Microb Ecol.* 2010; 59: 125-149.
- [52] Connell L, Barrett A, Templenton A, Staudigel H. Fungal Diversity Associated with an Active Deep Sea Volcano: Vailulu'u Seamount, Samoa. *Geomicrobiology Journal.* 2009; 26: 597-605.
- [53] Atlas R, Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental.* 4ta Ed. Pearson education. S A., Madrid. España. 2002.
- [54] Page K, Flannery M. Chytrid Fungi Associated with Pollen Decomposition in Crater Lake, Oregon. *Applied and environmental microbiology.* 2018; 4(1): 83-100.
- [55] Gonçalves V, Vaz A, Rosa C, Rosa L. Diversity, and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica, *FEMS Microbiology Ecology.* 2012; 82(2): 459-471. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x
- [56] Zhou Y, Jia B, Han P, Wang Q, Li, A, Zhou YG. *Wickerhamomyces kurtzmanii* sp. nov. An Ascomycetous Yeast Isolated from Crater Lake Water, Da Hinggan Ling Mountain, China. *Curr. Microbiol.* 2019 76: 1537-1544 doi.org/10.1007/s00284-019-01773-x.
- González Marco**, Orcid ID: 0000-0002-2072-4976
- Araque Judith**, Orcid ID: 0000-0002-6423-9622
- Viteri Francisco**, Orcid ID: 0000-0001-8698-7536
- Villacis Luis**, Orcid ID: 0000-0002-7383-4546
- Escobar Sandra**, Orcid ID: 0000-0002-3347-0282
- Araujo Liliana**, Orcid ID: 0000-0001-8762-1413
- Medina Gerardo**, Orcid ID: 0000-0002-4782-7924
- Andueza Felix**, Orcid ID: 0000-0002-9046-8883

Artículo original

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

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

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

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

Recibido: febrero de 2021 –Aceptado: mayo de 2021

## RESUMEN

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

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

## PALABRAS CLAVE

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

## ABSTRACT

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

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

## KEY WORDS

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

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

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

laboratorio con fines investigativos del trabajo en cuestión.

**TABLA 1.**

Muestras de miel usadas en el presente estudio.

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

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

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

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

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

**Determinación del contenido de flavonoides:**

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

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

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

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

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

que produce el mismo porcentaje de disminución de color.

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

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

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

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

**TABLA 2.**

Caracterización química de las mieles en estudio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

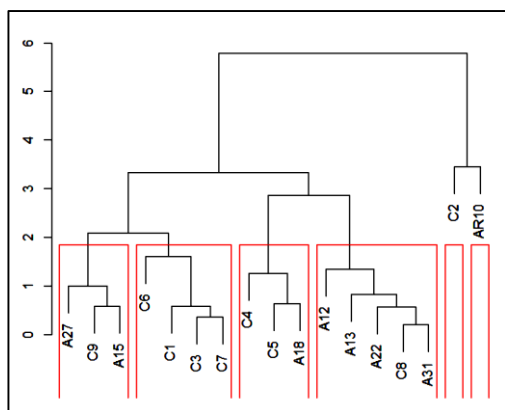
Si se comparan los valores de actividad antioxidante, por cualquiera de los métodos usados en este trabajo, de las mieles comerciales con las auténticas, se observa que muchas de ellas comparten la misma letra lo que significa que son estadísticamente iguales. Por ejemplo, si se compara la capacidad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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

**TABLA 5.**

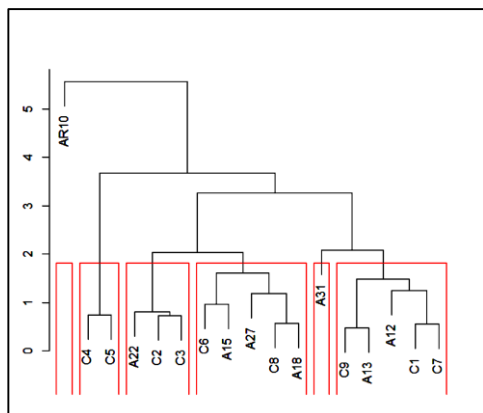
Valores medios resultantes del Análisis Clúster de las características bioquímicas.

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

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

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

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



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

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

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

**TABLA 6.**

Valores medios resultantes del Análisis Clúster de la actividad antioxidante.

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

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

**TABLA 7.**

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

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

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

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

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

autores son superiores a los obtenidos en esta investigación.

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

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

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

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

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

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

hidroxilo superior a los reportados en los trabajos citados anteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

## CONCLUSIONES

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

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

## AGRADECIMIENTOS

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

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

- [34] Mondragón PM, Ulloa JA. Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopia de infrarrojo. *Revista Fuente*. 2015; (6): 5-9.
- [35] Rodríguez A, Pérez E, Vit P. Capacidad antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. *Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel"* 2007; 38 (2): 13-17.
- [36] Pérez E, Rodríguez-Malaver A, Vit P. Antioxidant Capacity of Venezuelan Honey in Wistar Rat Homogenates. *J Med Food*. 2006; 9(4): 510–516.
- [37] Colmenares Y, Carreño J. Estudio de la capacidad antioxidante y antibacteriana de mieles de origen asiático [Tesis de pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Los Andes; 2015.
- [38] Steinbrück I. Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos etanólicos de mieles comerciales de origen Asiático y Europeo [Tesis de Pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Los Andes; 2017.
- [39] Muñoz AM, Alvarado-Ortíz C, Blanco T, Castañeda B, Ruiz J, Alvarado A. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Rev. Soc. Quím. Perú*. 2014; 80(4): 287-297.
- [40] Ciappini M, Gatti B, Vito V. El color como indicador del contenido de flavonoides en miel. *Rev. Cien. Tecnol*. 2013; 19: 59-63.
- [41] Vit P, Gutiérrez M, Titera D, Bednar M, Rodríguez-Malaver A. Miele checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioq Clín Latin*. 2008; 42: 237-244.
- [42] Pérez-Pérez EM, Suárez E, Peña-Vera MJ, González AC, Vit P. Antioxidant activity and microorganisms in nest products of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 from Mérida, Venezuela. Vit P & Roubik DW, eds. *Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. 2013. pp. 1-8. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>
- [43] Pérez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes [Tesis de Pregrado]. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Madrid; 2007.
- [44] Oddo L, Heard T, Rodríguez A, Pérez R, Fernández M, Sancho M, Sesta G, Lusco L, Vit P. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *J Med Food*. 2008; 11: 789-794.
- [45] Rodríguez A, Rasmussen C, Gutiérrez M, Gil F, Nieves B, Vit P. Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *NPC*. 2009; 4: 1221-1226.
- [46] Rodríguez B, Mendoza S, Iturriga M, Castañón-Tostado E. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *J. Food Sci*. 2012; 77: C121-C127.
- [47] Erejuwa O, Sulaiman S, Ab Wahab M. Honey: a novel antioxidant. *Molecules*. 2012; 17: 4400-4423.
- [48] Cushnie T, Lamb A. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J. Ethnopharmacol*. 2005; 101: 243-248.
- [49] Fiorani M, Accorsi A, Blasa M, Diamantini G, Piatti E. Flavonoids from Italian multifloral honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54: 8328-8334.
- [50] Lianda R, Sant'Ana L, Echevarria A, Castro N. Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts. *J. Braz. Chem. Soc*. 2012; 23: 618-627.
- [51] Küçük M, Kolaylı S, Karaoğlu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem*. 2007; 100(2): 526-534.
- [52] Diaz C. Determinación del origen floral y caracterización física y química de mieles de abeja (*Apis mellifera* L.), etiquetadas como "miel de ulmo" (*Eucriphya cordifolia* Cav.) [Tesis de Pregrado]. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile, Chile: Biblioteca Central del INIA; 2003.
- [53] Cefali LC, de Oliveira Maia L, Stahlschmidt R, Ataíde JA, Tambourgi EB, Rosa PCP, Mazzola

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## NORMAS EDITORIALES

La Revista de la Facultad de Farmacia (Rev Fac Farm) es una publicación editada por la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela. La revista es arbitrada e indizada y tiene como objetivo publicar Trabajos Originales (inéditos producto de estudios terminados), Revisiones, Reporte de Casos Clínicos, Comunicaciones y Cartas al Editor, que versen sobre las siguientes áreas del conocimiento: Etnobotánica, Química Orgánica, Química Inorgánica, Química Analítica, Química Medicinal, Fitoquímica, Ciencias de los Alimentos, Galénica, Tecnología Industrial, Análisis de Medicamentos, Física, Físicoquímica, Estadística Aplicada a las Ciencias de la Salud, Microbiología, Parasitología, Inmunología, Hematología, Farmacología, Toxicología, Fisiología, Farmacocinética, Mercadotecnia, Historia de la Farmacia y Bioanálisis, Farmacognosia, Nutrición en Salud Pública y Biotecnología. Los manuscritos deben ser concisos, correctos en su estilo y escritos en idioma español, inglés o portugués. El Comité Editorial (CE) tiene prevista la publicación de un volumen y dos números al año, con la extensión que se estime conveniente.

### ENVÍO DEL MANUSCRITO

Los autores deben enviar el archivo del manuscrito en programa "Word for Windows" a través de los siguientes correos: revfarm@ula.ve o revfarmacia@gmail.com Es necesario que el autor principal envíe una comunicación al Editor, en donde solicita la consideración del material adjunto para la publicación en alguna de las secciones de la Revista, con indicación expresa, de tratarse de un trabajo original, de no haber sido publicado excepto en forma de resumen y que sólo ha sido enviado a la Revista de la Facultad de Farmacia. Además, debe incluir la autorización, donde todos los autores aceptan con su firma, que han participado activamente en el desarrollo y ejecución de dicha investigación, y que conocen que está siendo enviado a publicación sin percibir remuneración alguna.

### SISTEMA DE ARBITRAJE

Todos los trabajos serán sometidos a consideración del CE de la Revista, el cual decidirá si el trabajo debe ser enviado a arbitraje o es devuelto por no cumplir con las normas editoriales establecidas. El arbitraje de doble ciego será realizado por al menos tres expertos en el área objeto de la comunicación. Se cuenta con la participación de especialistas, provenientes de diferentes instituciones locales, nacionales, así como internacionales. En caso de existir sugerencias por parte de los evaluadores para mejorar la calidad de los trabajos, serán devueltos a sus autores para las debidas correcciones, las cuales deben cumplirse, siendo posible apelar con la debida justificación en cada caso. Para facilitar el proceso de arbitraje, los autores deberán enviar una lista de seis posibles árbitros (Nacionales e Internacionales) con sus respectivas direcciones, y de ser posible, direcciones de correo electrónico.

### NORMAS EDITORIALES

Los textos deben estar compuestos por las siguientes secciones:

**Revisiones:** Según los criterios establecidos por el CE, para incluir revisiones en la Revista de la Facultad de Farmacia se debe cumplir con las siguientes condiciones:

- Al menos uno de los autores debe tener un mínimo de tres trabajos sobre el tema, publicados en revistas indexadas y arbitradas y por lo menos una de esas revistas debe ser Tipo A.
- Las revisiones pueden ser solicitadas al autor (es) por el CE o propuestas por el autor (es) al CE, sobre temas seleccionados. Estructura: Resumen, palabras clave, abstract, key words, introducción, cuerpo o desarrollo, conclusión (es), referencias bibliográficas, de acuerdo a las mismas instrucciones de los trabajos originales.

**Trabajos originales:** Se le da prioridad a los artículos originales. Estructura: Resumen, palabras clave, abstract, key words, nroducción, material y métodos, resultados, discusión, conclusión (es), agradecimientos (precindible) y referencias bibliográficas,

# REGLAMENTO PARA EL ARBITRAJE

## CAPÍTULO 1

### *Disposiciones Fundamentales*

**Artículo 1.** El presente **REGLAMENTO** tiene por objeto normar los principios rectores del Arbitraje de los Trabajos de Investigación, enviados por autores al Editor para su aceptación en la Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes.

**Artículo 2.** La recepción de un Trabajo de Investigación por parte del Editor, no implica por fuerza su aceptación para ser publicado en cualquiera de volúmenes de la Revista de la Facultad que se editen en un año. Además, no se recibirán trabajos para arbitraje que no estén acompañados de un oficio dirigido al Editor de la Revista, firmado por el autor (o responsable de una publicación en caso de ser colectiva).

**Artículo 3.** El Editor podrá recibir trabajos de investigación para su Arbitraje de cualquier autor de algunas de las Facultades de la Universidad de Los Andes, en primera instancia. En segundo lugar, de cualquier autor adscrito a cualquier universidad pública o privada del país. En tercer lugar, de autores de universidades extranjeras con preeminencia de América Latina.

**Artículo 4.** El Editor se reserva el Derecho de Admisión de los trabajos con base en lo establecido en el presente **REGLAMENTO**, y en las Instrucciones para los Autores, publicada en cada volumen editado de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 5.** El Editor no recibirá para su consideración de arbitraje trabajos divulgativos en cualquiera de las áreas de competencia de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 6.** El Editor aceptará para su arbitraje trabajos de investigación documental con aportes sustanciales al conocimiento científico de cualquiera de las áreas de competencia de la Revista de la Facultad de Farmacia, y que se ajusten a lo estipulado en las Instrucciones para los autores.

## CAPÍTULO 2

### *De los Árbitros y de su Competencia*

**Artículo 7.** El número de miembros del Comité de Arbitraje estará supeditado a las áreas de

competencia de la Revista de la Facultad de Farmacia. En todo caso, algunos miembros del Comité podrán fungir como re-presentantes hasta de tres áreas del conocimiento, de acuerdo con su formación y experiencia científica, y será potestad del Editor su designación.

**Artículo 8.** Los miembros del Comité de Arbitraje podrán ser miembros del personal docente y de investigación de la Universidad de Los Andes, o de cualquier otra universidad pública o privada de la República de reconocida actividad científica y académica, con estudios de cuarto nivel.

**Artículo 9.** Podrán ser miembros del Comité de Arbitraje reconocidos investigadores de universidades extranjeras, cuyas instituciones mantengan convenios de cooperación y de intercambio con la Universidad de Los Andes.

**Artículo 10.** Podrán ser miembros del Comité de Arbitraje de la Revista de la Facultad de Farmacia investigadores sin estudios de cuarto nivel, siempre que hayan sido reconocidos por su actividad de investigación dentro o fuera de la institución a la que estén adscritos.

**Artículo 11.** El Editor seleccionará con base en lo expuesto en los Artículos: 7, 8 y 9 del presente **REGLAMENTO**, a los investigadores que conformarán el Comité de Arbitraje de la Revista de la Facultad de Farmacia por un periodo no mayor de dos años consecutivos, pudiendo solicitar a motu proprio su reinserción dentro del Comité a algunos de los miembros salientes o por iniciativa de éstos.

**Artículo 12.** Son funciones de los árbitros, las siguientes:

a) Evaluar los trabajos de investigación de sus áreas de competencia.

b) Enviar al Editor una respuesta por escrito del trabajo considerado, en un plazo no mayor de 30 días, contados a partir de la recepción del texto.

c) Aprobar o improbar los trabajos recibidos, con base a argumentos científicos proclives a ser revisados.

d) No establecer con los autores de los trabajos ninguna comunicación referida al texto que evalúa, que conlleve interferencias y subjetividades en el

proceso. Aplicar en la evaluación argumentos científicos objetivos que permita al Editor a posterior iniciar un proceso de retroalimentación positiva con los autores, a los fines de la excelencia y transparencia del trabajo científico, y de la proyección de la Revista de la Facultad de Farmacia.

e) Aplicar en la evaluación los parámetros especificados en la Guía para los Árbitros.

**Artículo 13.** Los árbitros tienen derecho a recibir a cambio de su trabajo de evaluación, una constancia expedida por el Editor, a los fines de su inclusión en procesos de reconocimiento de los méritos académicos y científicos de los miembros del personal docente y de investigación de las universidades representadas en el Comité de Arbitraje.

### CAPÍTULO 3

#### *Disposiciones Finales Artículo*

**Artículo 14.** El Editor podrá sustituir en cualquier momento a algún miembro del Comité de Arbitraje, cuando éste no haya cumplido con lo dispuesto en el presente **REGLAMENTO**. El Editor procederá de inmediato a sustituir al miembro excluido con base a lo dispuesto en los Artículos: 7, 8 y 9 del presente **REGLAMENTO**, y a notificar de inmediato su remoción al saliente.

**Artículo 15.** Los autores tendrán derecho a solicitar reconsideración de la evaluación de su trabajo de investigación cuando haya resultado improbadado por un miembro del Comité de Arbitraje. A tales efectos, el Editor enviará el trabajo en cuestión a ser evaluado a otro árbitro. En caso de resultar positiva la segunda evaluación, el Editor se reservará el derecho de publicar o no el trabajo sin más opiniones de expertos, con base a la disponibilidad de espacio en la Revista en el volumen que juzgue conveniente, y así se lo hará saber al autor.

**Artículo 16.** Con base en lo dispuesto en el Artículo anterior, las decisiones de los árbitros son inapelables y de obligatorio acatamiento por parte del autor.

**Artículo 17.** Los miembros del Comité de Arbitraje no percibirán remuneración económica alguna por su trabajo.

**Artículo 18.** Los trabajos de investigación recibirán respuesta escrita a partir de los 60 días hábiles de su recepción.

**Artículo 19.** Si el informe de arbitraje es positivo para un trabajo en primera instancia, el Editor se compromete a incluirlo en el volumen inmediatamente próximo de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 20.** El Editor se arroga la potestad de realizar observaciones de forma a los trabajos recibidos antes de ser enviados a arbitraje, de tal manera que el autor se compromete a acatarlas sin desmedro de la trascendencia o alcance científico del trabajo.

**Artículo 21.** El autor se hace responsable de cualquier errata de forma y de fondo que esté incluida en el original enviado al Editor; y éste no se compromete a dar Fe de Errata en tales circunstancias.

**Artículo 22.** El Editor se compromete a dar Fe de Errata en aquellas circunstancias en que por inadvertencia o fallas técnicas se haya incurrido en un error no incluido en el original (papel y electrónico) enviado para su consideración por el autor. Tal procedimiento se patentizará en el volumen inmediatamente siguiente a la emisión del error, siempre y cuando el autor se lo haga saber al Editor por escrito tres meses antes de la edición del siguiente volumen de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 23.** El Editor no se compromete a expedir constancias de trabajos recibidos sin que haya finalizado el proceso de arbitraje y se cuente con un informe escrito y firmado por el árbitro.

**Artículo 24.** Lo establecido en el presente **REGLAMENTO** será difundido en la Revista de la Facultad de Farmacia, de tal forma, que tanto autores como árbitros se solidaricen con lo aquí expuesto.

## ÍNDICE ACUMULADO

### Volumen 56(1) Año 2014

#### **Guía para autores para escribir un artículo científico.**

Ovalles José Fernando, Velasco Judith, Rojas Janne, Ramírez-González Irama, Vielma Rosa Alba, Contreras Libia Yaritza, Lozano Ricardo, Meléndez Pablo, Piña Enzo, Peña Jesús.

#### **Análisis del aceite esencial de las hojas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae).**

Hernández-Bastidas Vanessa, Mora-Vivas Flor, Rojas-Fermín Luis, Meléndez Pablo.

#### **Síntesis de derivados nitrogenados de la podofilotoxina**

Santiago-Dugarte Carolina, Abad-Reyes Andrés, Bahsas Alí, Chacón-Morales Pablo.

#### **Determinación del contenido de cadmio en muestras de tabaco de cigarrillos comercializados en Venezuela.**

Petit de Peña Yaneira, Guillén Juan Carlos, Vicuña- Fernández Nelson, Briceño Luisa Carolina, Carrero Pablo, Peñaloza Hermes.

#### **Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling.**

Pérez-Colmenares Alida, Vivas-Guerrero Karla, Rojas-Fermín Luis, Usubillaga Alfredo, Chataing Bernardo.

### Volumen 56(2) Año 2014

#### **Composición del aceite esencial de las flores de *Oyedaea verbesinoides* D.C.**

Ramírez-González Irama, Villalobos-Osorio Darly, Rojas-Fermín Luis, Mendoza Francisco, Rodríguez- Castillo Clorybeth, Carmona Juan.

#### **Más acerca del comportamiento electroquímico de la dopamina con el pH del medio electrolítico.**

Menolasina Sabino.

#### **Hidrogenación catalítica de los ésteres metílicos de los ácidos kaurénico y**

#### **grandiflorénico con $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ en medio homogéneo y bifásico.**

Reyes Marisela, Barazarte Andris, Fonseca Yuraima, Fontal Bernardo, Usubillaga Alfredo, Suárez Trino, Bellandi Fernando, Vielma Joel.

#### **Ésteres glicosídicos de algunos derivados del ácido entkaur-16-eno-19-oico.**

Villasmil Thayded, Peña Alexis, Aparicio Rosa, Usubillaga Alfredo.

### Volumen 57(1) Año 2015

#### **Obtención de derivados azufrados del ácido kaurénico y de otros kaurenos substituidos en la posición C-15 y su actividad antibacteriana.**

Peña Alexis, Usubillaga Alfredo, Alarcón Libia, Velasco Judith, Aparicio Rosa.

#### **Estudio *in situ* por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de la oxidación electroquímica del acetaminofén en medio acuoso.** Rivas Nieto Rebeca, Martínez Yris, Materán Jesús, Ortiz Reynaldo.

#### **Study of the chemical composition of the essential oil from the hybrid Asteraceae *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec.**

Oregón-Díaz Ysbelia, Rojas-Fermín Luis, Usubillaga Alfredo, Pouységu Laurent, Quideau Stéphane.

#### **Secondary metabolites from *Chaptalia meridensis*.**

Pinto Ana Andreina, Amaro-Luis Juan Manuel.

### Volumen 57(2) Año 2015

#### **Composición química del aceite esencial de hojas frescas de *Annona muricata* L., de Mérida, Venezuela.**

Meccia C., Gina; Vit Olivier, Patricia; Rojas, Luis B.; Carmona Arzola, Juan; Santiago Silva, Bertha y Usubillaga, Alfredo.

#### **Estudio del crecimiento bacteriano. Enfoque de análisis de datos con medidas repetidas.**

Peña G. Jesús A; Rosales O., Yolima Beatriz y Orlandoni M., Giampaolo.

**Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para la cuantificación de hidrocortizol y clorhidrato de propranolol en formas farmacéuticas sólidas.**

Guillén Guillén, Ana; Brunetto, Rosario; León Leal, Andrés; Gallignani, Maximo A.; Lobatón Álvarez Robert; Colón U., Sarín y Calderón G., Laura M.

**Extracción y caracterización de grasa y almidón de la almendra de mango variedad Alphonso (*Mangifera indica* L).**

Gutiérrez, Carlos; Rivera, Yezabel; Gómez, Rubén; Bastidas, Vanessa y Izaguirre, César.

**Volumen 58(1)  
Año 2016**

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar.**

Rojas, Janne; Velasco Carrillo, Judith; Buitrago D., Alexis A.; Mender, Tamara y Rojas, John.

**Fasciolosis y parásitos gastrointestinales en becerros de la Estación Experimental "El Joque" Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.**

González Ramírez, Luisa Carolina; Martínez, Asdrúbal; Assouad, Manuel; Álvarez, Janeth; Gil, Florimar; Castro Vera, Trino Alberto; Pérez De Pablos, Carlos y Dávila, Ciro.

**Estudio fitoquímico y actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.**

Mogollón, José Ángel; Rondón, María Eugenia; Morales Méndez, Antonio y Contreras Moreno, Billmary Z.

**Comparación de los perfiles de disolución de cápsulas de cefadroxilo comercializadas en Venezuela.**

Colón U., Sarín; Guillén, Ana; Peña, Jesus Alberto; Lobatón Álvarez, Robert; León, Andrés y Calderón G., Laura M.

**Volumen 58(2)  
Año 2016**

**Composición química y perfil mineral de materias primas de origen animal y vegetal utilizadas en la formulación de dietas para la alimentación de alevines de *Colossoma macropomum*.**

Morillo, Marielba; Visbal, Tomas; Vielma, Rosa Alba; Peña, Liz; González, Isbelia y Medina, Ana Luisa.

**Estudio fitoquímico de la resina de *Protium carana* March (Burseraceae), derivados semisintéticos de los triterpenos  $\alpha/\beta$ -amirinas, determinación de su actividad antioxidante y actividad antibacteriana.**

Bracho Niño, Ismer; Rojas, Luis B.; Usbillaga, Alfredo; Carmona Arzola Juan; Carrero, José; Hernández, Johanna; Deffieux, Denis; Pouységu, Laurent y Quideau, Stéphane.

**Uso de chachafruto (*Erythrina edulis*) y soya (*Glycine max*) como sustituto de la harina de pescado en la formulación de dietas para alevines de coporo (*Prochilodus mariae*).**

Visbal, Tomas; Morillo, Marielba; Rial, Leandra; Altuve, Daisy; Betancourt, Carlos y Medina, Ana Luisa.

**Evaluación sensorial de lonjas de jamón cocido y pechuga de pavo, recubiertas con películas antimicrobianas de alginato de sodio.**

Rosales O., Yolima Beatriz; Raybaudi Massilia, Rosa; Medina, Ana Luisa; Mosqueda Melgar, Jonathan y Tomé, Elisabetta.

**Volumen 59(1)  
Año 2017**

**Composición química del aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium* L. colectada en Tovar-Edo. Mérida, Venezuela.**

Rojas Fermín, Luis; Rojas Vera, Janne; Cordero de Rojas, Yndra; Handan, Mager y Carmona Arzola, Juan.

**Determinación voltamétrica de citrato de sildenafil en formulaciones farmacéuticas.**

Ortiz, Reynaldo; Nava, Lismar; Martínez, Yris J.; Weinhold, Elkis y Paredes R., Andreina.

***In vivo* anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*.**

Rios Tesch, Nurby Nahiely; Villalobos Osorio, Darly Coromoto; Rojas Fermín, Luis; Aparicio Z., Rosa L.; Usubillaga, Alfredo; Mitaine Offer, Anne Claire; Lacaille Dubois, Marie Aleth; Denis, Deffieux; Peixoto, Philippe; Laurent, Pouységu y Stéphane, Quideau.

**Composición química del aceite esencial de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC de los Andes Venezolanos.**

Buitrago B., Diolimar; Morales M., Antonio; Rojas Fermín, Luis; Aparicio Z., Rosa L. y Meléndez G., Pablo.

**Volumen 59(2)**

**Año 2017**

**Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec**

Cordero de Rojas, Yndra; Lucena de Ustáriz, María Eugenia; Araujo, Liliana; Usubillaga, Alfredo; Rojas Fermín, Luis y Moujir, Laila.

**Actividad anti-inflamatoria del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq.**

Hernández Bastidas, Vanessa; Mora V., Flor D.; Nicola, Malafronte y Nunziatina De Tommasi.

**Constituyentes volátiles de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling de los Andes venezolanos.**

Pérez Colmenares, Alida; Rojas Fermín, Luis y Usubillaga, Alfredo.

**Actividad antiinflamatoria in vivo de extractos de hojas, tallos y frutos de *Ficus maitin* Pittier.**

Villalobos Osorio, Darly Coromoto; Rios, Nurby, Ramírez González, Irama Judith y Meléndez, Pablo.

**Volumen 60(1)**

**Año 2018**

**Evaluación del balance del contenido vaginal para el diagnóstico de la disfunción vaginal.**

Muñoz, Jesús; Sánchez, Kiralba y Babino Cynthia.

**Actividad antimicrobiana y perfil fitoquímico de las hojas de *Conarus venezuelanus* B. var. *venezuelanus* (Connaraceae R. BR.).**

García Giovanni; Rodríguez Castillo Gabriela; Velasco Carrillo, Judith; Villalobos Osorio, Darly Coromoto y Ramírez González, Irama Judith.

**Valoración del efecto de la Erdosteina en cuadros de intoxicación con Paraquat en ratas BIOU: Wistar y comparación con la N-acetilcisteína mediante determinación de malondialdehído por Espectroscopia UV.**

Di Bernardo, María L.; Zambrano de Dávila Thania; Morales Yasmin; Brito Sulay; Rojas de Marin, Tibisay del Carmen; Montero Yepsy; Osorio Andrés y Montoya Dubelia.

**Perfil de textura instrumental y sensorial de pastas elaboradas con *Cajanus cajan* fermentada.**

Vivas Odry y Sangronis Elba.

**Volumen 60(2)**

**Año 2018**

**Fenoles totales, contenido de flavonoides y actividad antioxidante de los extractos etanólicos de plantas ecuatorianas.**

Rondón, María; Moncayo, Shirley; Cornejo, Xavier y Plaza, Claudia.

**Un modelo de supervivencia bivariante para eventos dependientes bajo el enfoque de funciones cópulas.**

Peña G., Jesús A; Ramoni P., Josefa y Giampaolo, Orlandoni.

**Estudio de la composición química de los aceites esenciales de las hojas y flores de *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. (Lamiaceae).**

Araque, Emmanuel; Urbina, Daniela; Morillo, Marielba; Rojas Fermín, Luis y Carmona Arzola, Juan.

**Revista de la Facultad de Farmacia. Seis décadas de trayectoria.**

Gil Otaiza, Ricardo.

**Volumen 61(Edición Especial)**

**Año 2019**

**Análisis de supervivencia con interacción de diabetes e índice de masa corporal en pacientes en diálisis peritoneal.**

Borges P., Rafael E.; Torres-Mantilla, Hugo Alexander y González-Villar, Andrea.

**Evolución del error total en la determinación de glucosa en un laboratorio de bioquímica clínica.**

Molina, Karla; Torres, Jeymmy; López, María; Hurtado, María; Guillén, Leidys y Dugarte, Freddy.

**Actividad larvicida de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y *Lepechinia bullata* contra *Tecia solanivora* Povolny.**

Ramírez, Rosslyn N.; Mora V., Flor D.; Domínguez, Ilka; Rojas Fermín, Luis; Ramírez, Wilson; Peña, José y Pérez Colmenares, Alida.

**Composición química y actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* (Houtt.).**

Malave, María José; Mendoza, Zulimar; Morillo, Marielba; Visbal, Tomas; Rondón, María Eugenia y Carmona Arzola, Juan.

**Volumen 62(Edición Especial)**

**Año 2020**

**Perfil fitoquímico, actividad biológica y fotoprotectora de las flores de *Aldama dentata* La Llave et Lex.**

Isla Marylenlid, Pérez Alida, Obregon Ysbelia, Aparicio Rosa, Cordero Yndra, Díaz Clara, Isla José, Chacón Carmen, Fernández Jhender, Rojas-Fermín Luis.

**Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana de fracciones de diferentes polaridades obtenidas de *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch y *Vismia macrophylla* Kunth.**

Buitrago-Díaz Alexis Alberto, Rojas-Vera Janne, Velasco-Carrillo Judith.

**Valoración de dietas a base de *Leucaena leucocephala* (Lam.), *Machaerium* sp y *Glycine max* (Soya) para la alimentación de alevines de *Colossoma macropomum* (cachama negra).**

Visbal Tomas, Morillo Marielba, Rial Leandra, Betancourt Carlos, Medina Ana Luisa.

**Actualización de la imagen de la Revista de la Facultad de Farmacia.**

Rojas-Vera Janne, Buitrago-Díaz Alexis, Meccia Gina, Rondón María Eugenia, Rojas Julio.



## CONSEJO DE DESARROLLO CIENTÍFICO HUMANÍSTICO, TECNOLÓGICO Y DE LAS ARTES Cdchta



El **Cdchta** es el organismo encargado de promover, financiar y difundir la actividad investigativa en los campos científicos, humanísticos, sociales y tecnológicos.

### Objetivos Generales:

El **Cdchta**, de la Universidad de Los Andes, desarrolla políticas centradas en tres grandes objetivos:

- Apoyar al investigador y su generación de relevo.
- Vincular la investigación con las necesidades del país.
- Fomentar la investigación en todas las unidades académicas de la ULA, relacionadas con la docencia y con la investigación.

### Objetivos Específicos:

- Proponer políticas de investigación y desarrollo científico, humanístico y tecnológico para la Universidad. Presentarlas al Consejo Universitario para su consideración y aprobación.
- Auspiciar y organizar eventos para la promoción y la evaluación de la investigación.
- Proponer la creación de premios, menciones y certificaciones que sirvan de estímulo para el desarrollo de los investigadores.
- Estimular la producción científica.

### Funciones:

- Proponer, evaluar e informar a las Comisiones sobre los diferentes programas o

solicitudes.

- Difundir las políticas de investigación.
- Elaborar el plan de desarrollo.

### Estructura:

- Directorio: Vicerrector Académico, Coordinador del

### Cdchta.

- Comisión Humanística y Científica.
- Comisiones Asesoras: Publicaciones, Talleres y Mantenimiento, Seminarios en el Exterior, Comité de Bioética.
- Nueve subcomisiones técnicas asesoras.

### Programas:

- Proyectos.
- Seminarios.
- Publicaciones.
- Talleres y Mantenimiento.
- Apoyo a Unidades de Trabajo.
- Equipamiento Conjunto.
- Promoción y Difusión.
- Apoyo Directo a Grupos (ADG).
- Programa Estímulo al Investigador (PEI).
- PPI-Emeritus.
- Premio Estímulo Talleres y Mantenimiento.
- Proyectos Institucionales Cooperativos.
- Aporte Red Satelital.
- Gerencia.

**Alejandro Gutiérrez**  
**Coordinador General**

[www.ula.ve/cdcht/](http://www.ula.ve/cdcht/) / E-mail: cdcht@ula.ve  
Telf. 0274-2402785 / 2402686.

## AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

### Decano(e)

Dra. Angela Lugo

### Director de la Escuela de Bioanálisis

Dra. Ana Carolina Ramírez

### Director de la Escuela de Farmacia

MSc. Robert Lobatón

### Director del Instituto de Investigaciones

Dra. Yndra Cordero

### Director de la Oficina de Relaciones

### Interinstitucionales

Dr. José Nelson Aranguren

La Revista de la Facultad de Farmacia, posee acreditación del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes. Universidad de Los Andes-Venezuela (CDCHTA-ULA).

Esta publicación está indizada en REVENCYT, Sistema de Publicaciones Scielo, Periódica (UNAM- México), IMBIOMED, Base de datos LILACS producida por BIREME y LIVECS, y Latindex México.

Incluida en el Registro de Publicaciones Científicas y Tecnológicas del FONACIT.

ISSN 0543- 517-X Depósito Legal pp 1958 02 ME 1003

ISSN 2244-8845 Electrónico Depósito Legal ppi 2012 02 ME 4102.

La Revista de la Facultad de Farmacia se exime de compromisos con la opinión y enfoques vertidos por los autores de los materiales publicados en ella. Queda prohibida, sin la autorización del Comité Editorial, la reproducción total o parcial de los trabajos incluidos en este volumen, por cualquier medio. La misma asegura que los editores, autores y árbitros cumplen con las normas éticas internacionales durante el proceso de arbitraje y publicación. Del mismo modo aplica los principios establecidos por el Comité de Ética en Publicaciones Científicas (COPE). Igualmente, todos los trabajos están sometidos a un proceso de arbitraje y de verificación por plagio.

## COMITÉ EDITORIAL

### EDITORA

Dra. Janne Rojas

Instituto de Investigaciones

### EDITORES HONORARIOS

Dr. Alfredo Usubillaga

Instituto de Investigaciones

Dr. Ricardo Gil Otaiza

Dpto. de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos

Dra. Beatriz Nieves Blanco

Dpto. de Microbiología y Parasitología

### CUERPO EDITORIAL

Dr. Alexis A Buitrago Díaz

(Diagramación)

Dpto. de Análisis y Control

Dr. Julio Rojas

Dpto. de Toxicología

Dra. María Eugenia Rondón

Dpto. de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos

MSc. Gina Meccia,

Instituto de Investigaciones

### REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

#### Dirección de Canje (Postal address)

Prolongación Av. Humberto Tejera, Sector Campo de Oro, detrás del IAHULA, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Edificio Carlos Edmundo Salas, 1er piso. ULA. Mérida. República Bolivariana de Venezuela. Código Postal 5101 Teléfono: +58-274-2403561.

Fax: +58-274-2403568

Dirección electrónica:

revfarm@ula.ve o revfarmacia@gmail.com



### REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Universidad de Los Andes Facultad de Farmacia y Bioanálisis Biblioteca "Ismael Valero"

Esta versión digital de la revista de la Facultad de Farmacia, se realizó cumpliendo con los criterios y lineamientos establecidos para la edición electrónica en el año 2020.

Publicada en el repositorio institucional SaberULA

Universidad de Los Andes-Venezuela

[www.saber.ula.ve](http://www.saber.ula.ve), [info@saber.ula.ve](mailto:info@saber.ula.ve).

