



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Propiedades antioxidantes de mieles de Mozambique en
base a su composición en flavonoides y ácidos fenólicos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Linares Grau, María

Tutor/a: Escriche Roberto, M^a Isabel

Cotutor/a: Juan Borrás, María del Sol

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

Propiedades antioxidantes de mieles de Mozambique en base a su composición en flavonoides y ácidos fenólicos

Resumen

La miel es uno de los alimentos más primitivos que existe, siendo muy valorada por sus propiedades nutritivas, terapéuticas y, especialmente, por sus características antioxidantes. La presencia de este tipo de compuestos puede ser útil para poner en valor la miel procedente de determinadas zonas geográficas, además de potenciar la creación de nuevos medios de vida sostenibles en las zonas rurales. El objetivo de este trabajo ha sido analizar el perfil de flavonoides y ácidos fenólicos específicos de mieles originarias de las cuatro regiones de Mozambique de mayor producción (Manica, Nampula, Sofala y Zambezia). El análisis de los compuestos antioxidantes se ha realizado mediante cromatografía líquida, previa extracción en fase sólida. Posteriormente se han identificado por comparación de sus tiempos de retención y características espectrales UV (200-400 nm) con estándares auténticos. La cuantificación se ha realizado a partir de curvas de calibración construidas para cada estándar considerando las áreas y las respectivas concentraciones. Se han identificado diez compuestos fenólicos agrupados en 2 categorías: 7 phenolic acids y 3 flavonoids. Dentro de los phenolic acids se han diferenciado hydroxycinnamic acids (caffeic acid; p-coumaric acid; sinapic acid; ferulic acid y trans-cinnamic acid) y hydroxybenzoic acids (ellagic acid y gallic acid). Los flavonoids se han agrupado en dos familias químicas: flavonols (rutin y quercetin) y flavanone (naringenin). En todas las regiones ha sido mayor el contenido de phenolic acids respecto al de flavonoids, siendo el ellagic acid el compuesto mayoritario en todas ellas. Las muestras de miel han mostrado diferencias en el contenido de compuestos fenólicos entre regiones, siendo las mieles de Zambezia las de mayor contenido. Considerando los distritos estudiados de cada región, son Maringue (Sofala) y Mulevala (Zambezia) los que mostraron mayores diferencias por su elevada concentración en compuestos fenólicos.

Palabras clave: Mozambique, miel, compuestos antioxidantes

Alumna: Maria Llinares Grau

Directora Académica: Dra. María Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Dra. María Del Sol Juan Borrás

València, julio de 2022

Antioxidant properties of honey from Mozambique based on its flavonoids and phenolic acids composition

Abstract

Honey is one of the most primitive foods that exists, being highly valued for its nutritional, therapeutic properties and, especially, for its antioxidant characteristics. The presence of this type of compound can be useful to value honey from certain geographical areas, in addition to promoting the creation of new sustainable livelihoods in rural areas. The objective of this work has been to analyze the profile of flavonoids and specific phenolic acids of honeys originating from the four regions of Mozambique with the highest production (Manica, Nampula, Sofala and Zambezia). After extraction in solid phase, have been carried out by liquid chromatography the analysis of the antioxidant compounds. They have subsequently been identified by comparison of their retention times and UV spectral characteristics (200-400 nm) with authentic standards. The quantification has been made from calibration curves constructed for each standard considering the areas and the respective concentrations. Ten phenolic compounds have been identified grouped into 2 categories: 7 phenolic acids and 3 flavonoids. Within the phenolic acids have been differentiated hydroxycinnamic acids (caffeic acid; p-coumaric acid; sinapic acid; ferulic acid and trans-cinnamic acid) and hydroxybenzoic acids (ellagic acid and gallic acid). Flavonoids have been grouped into two chemical families: flavonols (rutin and quercetin) and flavanone (naringenin). In all regions the content of phenolic acids has been higher than that of flavonoids, being ellagic acid the major compound in all of them. Honey samples have shown differences in the content of phenolic compounds between regions, with Zambezia honeys being the ones with the highest content. Considering the districts studied in each region: Maringue (Sofala) and Mulevala (Zambezia) showed the greatest differences due to their high concentration of phenolic compounds.

Keywords: Mozambique, honey, antioxidant compounds.

Author: Maria Llinares Grau

Academic director: Dra. María Isabel Escriche Roberto

Co-tutor: Dra. María Del Sol Juan Borrás

Valencia, july 2022

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el programa ADSIDEO 2020 del Centro de Cooperación al Desarrollo de la Universitat Politècnica de Valencia a través de Proyecto titulado: “Análisis de Riesgos en productos apícolas de Mozambique. Oportunidad Social y Económica de las poblaciones rurales”.

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis tutoras Isabel Escriche Roberto y Marisol Juan Borrás por toda la dedicación, la enseñanza y la paciencia que me han aportado.

También a Ana Peral Pinto por su ayuda y apoyo en el Laboratorio de la Miel.

Agradecer también a mi familia y entorno por el constante respaldo y confianza.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1. LA MIEL.....	1
	1.2. APICULTURA EN MOZAMBIQUE.....	1
	1.3. BENEFICIOS DE LOS ANTIOXIDANTES.....	3
	1.3.1. CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....	4
	1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES.....	7
2.	OBJETIVOS.....	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
	3.1. MUESTRAS DE MIEL.....	11
	3.2. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC).....	12
	3.2.1. REACTIVO Y PATRONES.....	12
	3.2.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	12
	3.2.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	13
	3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
	4.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	15
	4.2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	17
	4.2.1. EFECTO DE LA REGIÓN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS MIELES.....	19
	4.2.2. EFECTO DEL DISTRITO EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS MIELES DE CADA REGIÓN.....	23
5.	CONCLUSIÓN.....	30
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Producción mundial de miel natural	2
Figura 2.	Mapa de Mozambique.....	3
Figura 3.	Mecanismos de los efectos antioxidantes de la miel	4
Figura 4.	Clasificación de antioxidantes	5
Figura 5.	Estructuras de importantes ácidos fenólicos	6
Figura 6.	Estructura de importantes flavonoides	7
Figura 7.	Colector de vacío para extracción en SPE.....	12
Figura 8.	HPLC Agilent 1200 SL series Rapid Resolution.....	13
Figura 9.	Diagrama de Box-Whisker	14
Figura 10.	Ejemplos de cromatogramas de muestras de las regiones de Manica (A), Nampula (B), Sofala (C) y Zambezia (D).....	16
Figura 11A.	Curvas de calibrado de los compuestos fenólicos.....	17
Figura 11B.	Curvas de calibrado de los compuestos fenólicos.....	18
Figura 12.	Diagramas box and whiskers de los compuestos con diferencias significativas entre regiones	22
Figura 13.	Diagramas box and whiskers de los compuestos con diferencias significativas entre distritos de Sofala	28
Figura 14.	Diagramas box and whiskers de los compuestos con diferencias significativas entre distritos de Zambezia.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Muestras de miel evaluadas	11
Tabla 2.	Gradiente de la fase A y fase B utilizado durante el análisis cromatográfico	13
Tabla 3.	Tiempos de retención y longitudes de onda de máxima absorbancia para cada compuesto fenólicos detectado	15
Tabla 4.	Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de diferentes regiones de Mozambique (Manica, Nampula, Sofala y Zambezia), y ANOVA F-ratio para el factor “región”	21
Tabla 5A.	Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de diferentes distritos de Manica y Nampula y ANOVA F-ratio para el factor “distrito”	25
Tabla 5B.	Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de diferentes distritos de Sofala y ANOVA F-ratio para el factor “distrito”	26
Tabla 5C.	Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de diferentes distritos de Zambezia y ANOVA F-ratio para el factor “distrito”	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA MIEL

En la actualidad, existen alrededor de 20.000 especies de abejas y solamente 5 de ellas tienen la capacidad de producir miel, destacando la *Apis mellifera*. Estas abejas producen la miel a partir del néctar de las flores y/o las secreciones de ciertas plantas y la incorporación de sustancias propias de ellas (Ulloa et al, 2010). Después de su deshidratación, concentración y almacenamiento obtienen la miel, alimento nutritivo, saludable y natural con una composición compleja, destacando la gran proporción de carbohidratos (Jiménez, 2018).

La miel es rica en una variedad de sustancias en menor proporción como son enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, antioxidantes, vitaminas y minerales. El color varía de prácticamente incoloro a pardo oscuro y su consistencia desde muy viscosa hasta parcialmente cristalizada (Maza, 2022). La composición de la miel puede variar según las condiciones climáticas, la situación geográfica y los factores ambientales e incluso por el origen botánico de las flores y secreciones de las plantas utilizadas por las abejas. Es producida en los cinco continentes y su consumo varía de un país a otro por hábitos alimentarios y culturales (FAO, 2022).

La norma para la miel CXS 12-1981, enmendada en 2019, del Codex Alimentarius determina que la miel no deberá contener ningún ingrediente adicional ni tampoco ninguna materia, sabor o aroma ajenos añadidos. La miel no deberá haber comenzado a fermentar o producir efervescencia (FAO, 2022).

1.2. APICULTURA EN MOZAMBIQUE

Mozambique es un país situado al sureste de África, su territorio está formado por 11 regiones, las cuales se dividen a su vez en 28 distritos. Cuenta con una superficie de 799.380 km² y una población de 30.832.244 habitantes (MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES, UNIÓN EUROPEA Y COOPERACIÓN, 2022)

En las Naciones Unidas, cada año se elabora el Índice de Desarrollo Humano (IDH) que se encarga de medir el desarrollo económico de un país analizando la salud, educación e ingresos. Según el último informe publicado, Mozambique se encuentra en el puesto 181 de 189, lo que indica que sus habitantes se encuentran entre los que peor calidad de vida tienen en el mundo (UNDP, 2022).

En el continente africano, la apicultura es considerada como una actividad ancestral que contribuye a los medios de vida más vulnerables y aumenta la resiliencia, por lo que se podría considerar como una de las estrategias con gran potencial para apoyar a la gente a la creación de medios de vida sostenibles en las zonas rurales de África (Bradbear, 2005; Serem y Bester, 2012). Además, la comercialización de la miel podría ser un apoyo para crear nuevos medios de subsistencia sostenibles favoreciendo así el desarrollo de otros sectores (Talenque-Alberto et al., 2018). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen ciertos obstáculos para el desarrollo de la apicultura como son la falta de legislación y conocimiento acerca de los factores

de calidad de la miel y productos de colmena, lo que dificulta el acceso a los mercados (Obaga, 2002).

En África se producen unas 150 mil toneladas de miel al año, representando así el 8,4 % de la producción mundial de miel (figura 1). En Mozambique, la producción es más rudimentaria, pero aun así se consiguen producir alrededor de 607 toneladas anuales, con una tendencia creciente durante los últimos años. Para impulsar la actividad apícola se han desarrollado distintos proyectos como es el caso del Programa de Desarrollo Económico Local (PRODEL) con la finalidad de conseguir integrar en la cadena de valor de producción de miel a pequeños apicultores situados en Caia, Cheringoma y Maringue, distritos pertenecientes a la región de Sofala (FAOSTAT, 2020).

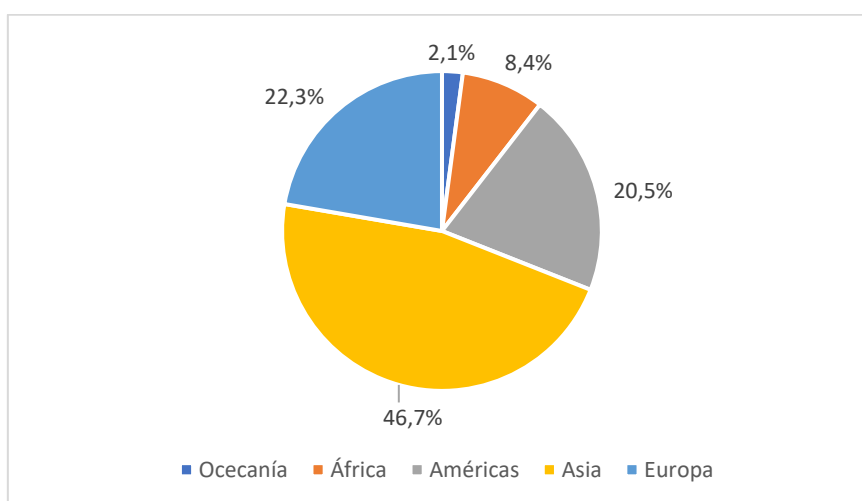


Figura 1. Producción mundial de miel natural. Fuente: FAOSTAT, 2020.

La apicultura en Mozambique dispone de una variedad autóctona de abejas denominadas *Apis mellifera var scutellata*. Los sistemas de explotación de miel en el país dependen de dos factores principalmente, el clima y la vegetación. En Mozambique se diferencian 2 estaciones climáticas durante el año, la estación de las lluvias desde octubre hasta abril y la estación seca de mayo a septiembre. La figura 2 detalla el mapa de Mozambique en el que se destaca en color naranja las regiones centrales, en las que la producción de miel es más importante:

- Manica: situada en el centro de Mozambique, se caracteriza por tener una vegetación del tipo sabana con arbustos de gran potencial para la producción de miel.
- Nampula: situada en el norte de Mozambique posee roca calcárea y bosques entre los numerosos campos de cultivo
- Sofala: situada en el centro-norte de Mozambique junto a Manica, destaca por su flora melífera.
- Zambezia: situada en el centro-norte de Mozambique se encuentra llena de valles verdes con un hábitat privilegiado para una fauna diversificada.

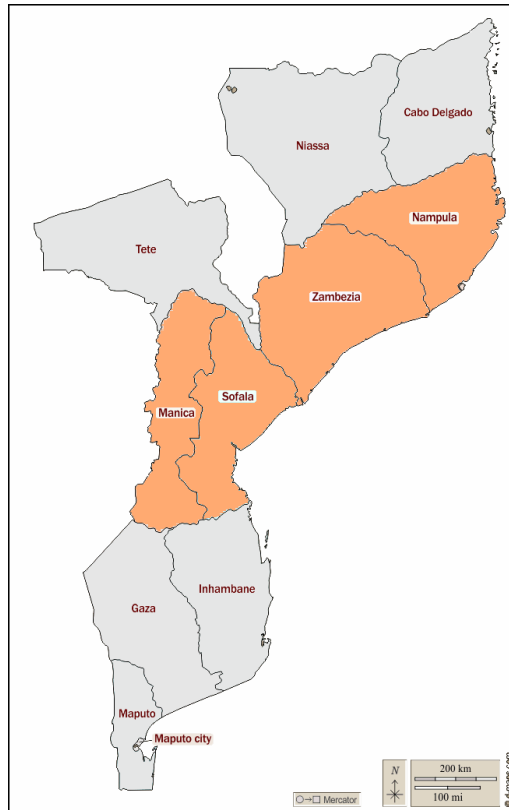


Figura 2. Mapa de Mozambique.

1.3 BENEFICIOS DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias naturales que se pueden encontrar en los alimentos, capaces de contrarrestar el deterioro causado por ciertos oxidantes como el OH^- , O_2 o los radicales peroxilos de los lípidos. Las células presentan un sistema de defensa contra el daño causado por la oxidación, el cual se basa en radicales libres y otros agentes protectores de la oxidación. Estos estimulan algunas biomoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y de esta manera las células que han sufrido una alteración provocan una respuesta antioxidante (Nagai, 2001).

Los radicales libres, poseen distintas funciones en el organismo de manera positiva ya que son necesarios para realizar determinados procesos como puede ser producir energía, regular el crecimiento celular o sintetizar sustancias biológicas importantes. Sin embargo, su producción en exceso de manera descontrolada tiene efectos negativos sobre las proteínas, carbohidratos, grasas y en el DNA. Esto se debe a la reacción química conocida como oxidación y a los ataques sobre los tejidos por parte de los radicales libres conocidos como estrés oxidativo. Se ha comprobado que, en el cuerpo humano, el estrés oxidativo está relacionado con patologías y diversos trastornos como son: trombosis coronaria, angina de pecho, fallos cardíacos, apoplejía, daños cerebrales, enfermedades renales, cáncer, envejecimiento, desórdenes inflamatorios, cataratas, artritis reumatoide, esterilidad masculina, retinopatía prematura y malnutrición (Youngson, 2003).

Las sustancias antioxidantes pueden retrasar o impedir la oxidación e incluso combatir los efectos perjudiciales producidos por los radicales libres. Los organismos producen sus propias sustancias antioxidantes capaces de prevenir daños oxidativos y además también se pueden obtener de fuentes externas, como es el caso de la miel y por ello, se asocia su consumo con la disminución del riesgo de sufrir determinadas patologías. Además, algunos investigadores demostraron que la miel aumentaba la cantidad y la actividad de los agentes antioxidantes (betacaroteno, vitamina C, glutatión reductasa y ácido úrico) en personas sanas (Nagai, 2001). En el proceso de inhibir la oxidación, intervienen varios métodos y actividades por parte de los compuestos antioxidantes. En la figura 3 se muestran los posibles mecanismos involucrados en el caso de la miel (Ahmed et al., 2018). Entre todos los compuestos que ejercen actividad antioxidante en la miel (carotenoides, polifenoles y vitaminas), los polifenoles, en concreto flavonoides y ácidos fenólicos, son los más abundantes. En cada tipo de miel, la cantidad de polifenoles varía según las condiciones geográficas y climáticas, además de la fuente floral empleada ya que estos compuestos bioactivos con actividad antioxidante se encuentran en todos los órganos de las plantas y son transferidos a la miel mediante las abejas (Honrado, 2020).

Estas propiedades antioxidantes de la miel se pueden utilizar para impedir la oxidación de otros alimentos como carnes refrigeradas (López-Velasco et al., 2021).

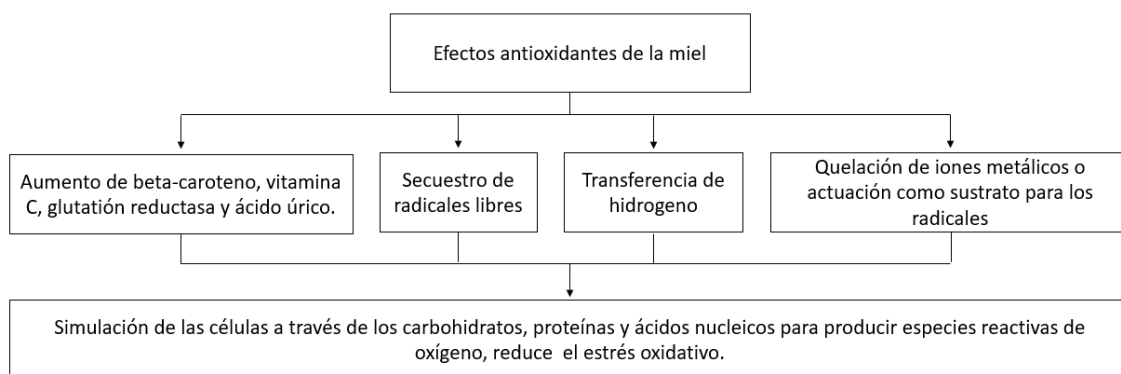


Figura 3. Mecanismos de los efectos antioxidantes de la miel. Fuente: Ahmed et al., 2018.

1.3.1. CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIOXANTES

Los compuestos antioxidantes se pueden clasificar en dos grandes grupos, antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el caso de los antioxidantes enzimáticos se dividen a su vez en dos grupos; enzimas primarias y secundarias estas dos enzimas no neutralizan de manera directa los radicales libres, sino que desempeñan funciones de apoyo a los demás antioxidantes endógenos (Carocho & Ferreira, 2012).

Entre los antioxidantes no enzimáticos, muchos de ellos se obtienen por fuentes dietéticas, estos se clasifican en varias clases de las cuales los polifenoles son el grupo mayoritario ya que consiste en ácidos fenólicos y flavonoides. Los otros antioxidantes de procedencia alimentaria son las vitaminas, los carotenoides, los minerales y lo compuestos organosulfurados (Ratnam et al., 2006). Lo que les confiere actividad antioxidante es la

capacidad de combinarse con radicales libres peroxilo antes de que se propague la peroxidación a los lípidos (Palace et al., 1999).

La eficacia de los compuestos antioxidantes depende de diversos factores. La estructura química determina la reactividad intrínseca de un antioxidante frente a los radicales libre y, por tanto, influye en la actividad antioxidante. Del mismo modo que depende de la concentración en la que se encuentre. Otro factor importante es la cinética de la reacción, es decir la velocidad de reacción entre un antioxidante determinado y un oxidante distinto (Munteanu & Apetrei, 2021). Todos los parámetros deben de tener en cuenta para considerar tanto la eficacia como una correcta selección de las sustancias antioxidantes. En la figura 4, se muestra una clasificación completa de los compuestos antioxidantes.

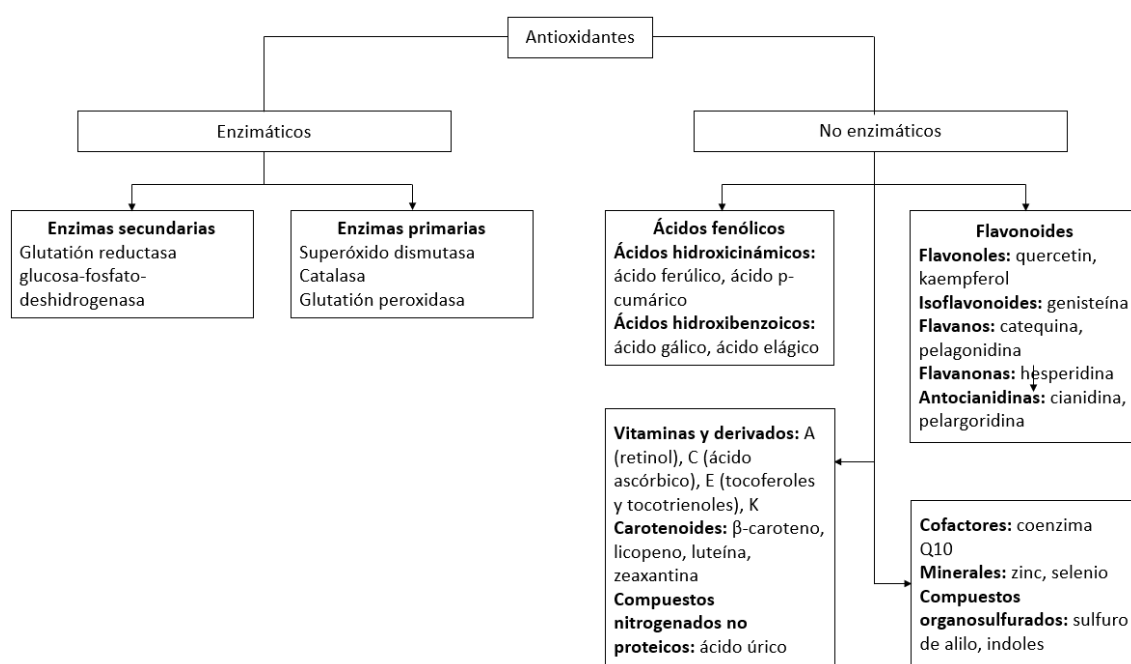


Figura 4. Clasificación de antioxidantes. Fuente: Munteanu & Apetrei, 2021.

Las cantidades presentes en alimentos incluidos en la dieta humana de flavonoides y polifenoles son bastante más superiores que las de otros antioxidantes como pueden ser las vitaminas C y E (Lotito & Frei, 2006). En el caso de la miel, se considera que los flavonoides y los componentes de los ácidos fenólicos son los únicos responsables de los efectos antioxidantes y otros efectos medicinales (Ahmed & Othman, 2013).

Los compuestos fenólicos son moléculas con uno o más grupos hidroxilo que se encuentran unidos a un anillo aromático. Se consideran importantes antioxidantes dentro de la alimentación. Numerosos compuestos fenólicos se encuentran en plantas, frutas, hortalizas, raíces y cereales y son los responsables del color y las características sensoriales como por ejemplo la astringencia en ciertos alimentos. La actividad antioxidante de cada uno de ellos depende, en la gran mayoría, del número y posición de los grupos hidroxilo (Jiménez et al., 2009).

Los **ácidos fenólicos** se dividen en dos grupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos presentan un grupo carbonilo (grupo ácido) y grupos hidroxilo en un anillo aromático. En el caso de los ácidos hidroxicinámicos, cabe destacar que son más efectivos en cuanto a actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos; esto se debe a la presencia de más de un grupo carboxilo y la mayor separación entre el grupo carbonilo y el anillo aromático (Peñarrieta et al., 2014).

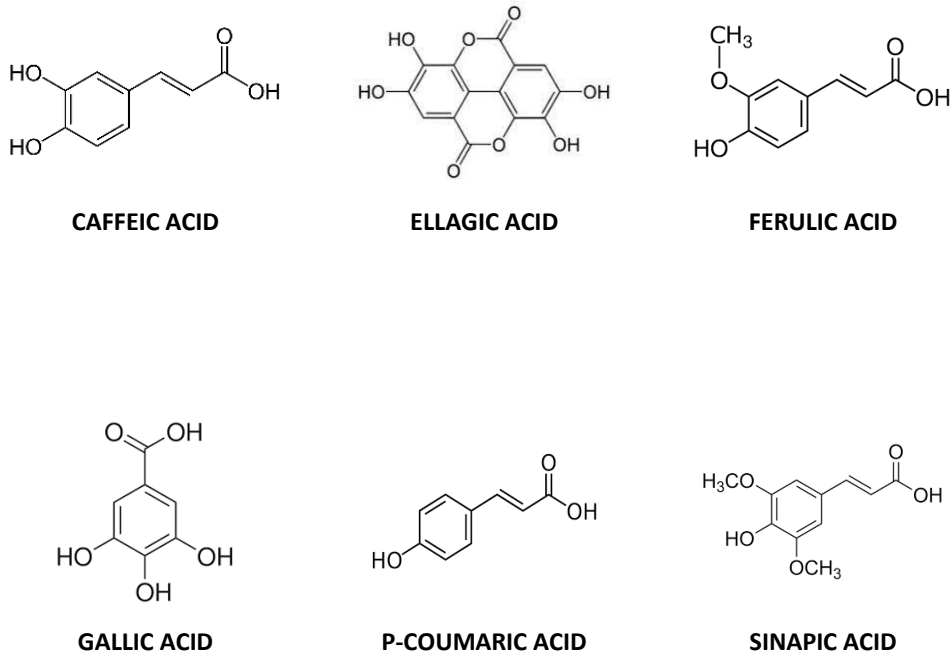


Figura 5. Estructuras de importantes ácidos fenólicos.

Los **flavonoides** son un tipo particular de polifenoles presentes en las plantas y responsables del color en flores y frutas. Están formados por cinco grupos: flavonoles, isoflavonas, flavanes, flavanonas y antocianidinas. Su actividad antioxidante es fruto de la combinación de propiedades quelantes de hierro y secuestradores de radicales libres, además de la inhibición de oxidasas (Peñarrieta et al., 2014).

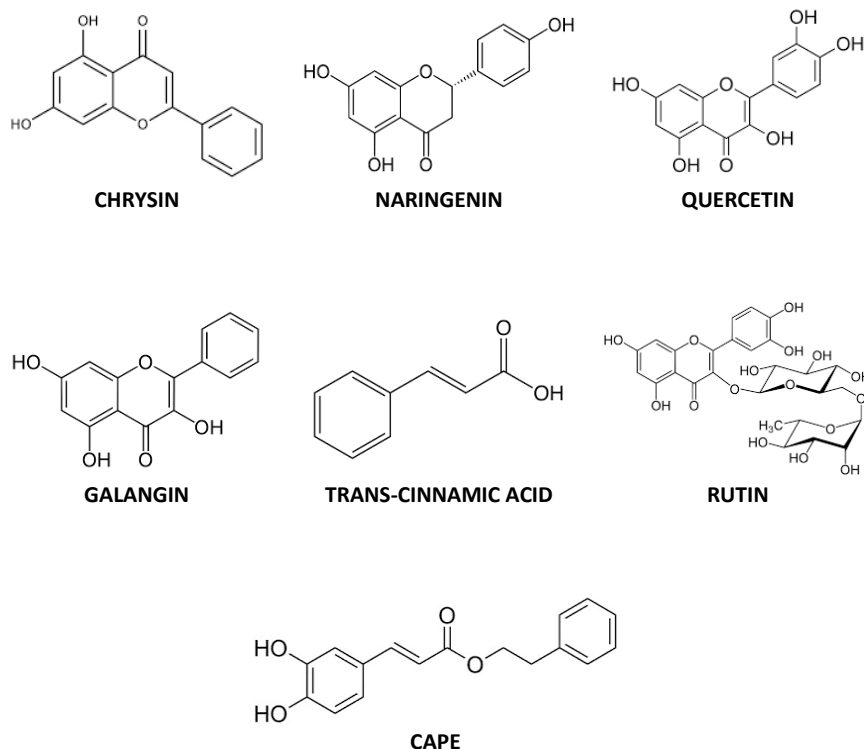


Figura 6. Estructura de importantes flavonoides.

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Los métodos e instrumentos empleados para medir la actividad de los antioxidantes han experimentado cambios en las últimas décadas. Los primeros se basaban en medir la eficacia de los antioxidantes contra la formación de determinadas especies de productos de oxidación. Hasta el momento, se han empleado varias pruebas químicas combinadas con tecnologías de detección altamente sensibles y automatizadas para evaluar la actividad antioxidante mediante métodos especiales.

Existe un gran número de ensayos para medir de manera directa la transferencia del átomo de hidrógeno o la transferencia de electrones de los antioxidantes a los radicales libres. La actividad antioxidante registrada en este tipo de ensayos está asociada a su capacidad de neutralizar ciertos tipos de especies de radicales, de las que pueden ser artificiales y biológicamente irrelevantes. Un método normalizado para medir la actividad antioxidante de un componente alimentario debe de cumplir una serie de requisitos, entre los que cabría destacar:

- La fuente de radicales empleada debe de ser biológicamente relevante.
- Es preferible que sea sencillo.

- Debe de tener definido un mecanismo químico.
- Tanto los productos químicos como los instrumentos empleados deben de estar fácilmente disponibles.
- Reproducibilidad dentro del ciclo y entre días adecuada.
- Debe permitir analizar antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos empleando distintas fuentes de radicales.
- El método se debe poder aplicar en los controles de calidad.

Las distintas técnicas existentes de evaluación de la capacidad antioxidante se dividen en tres categorías distintas (Munteanu & Apetrei, 2021).

1. Espectrometría.

- ORAC** (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno): Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por 2,2'-azobis-2-amidino-propane (AAPH).
- HORAC** (Capacidad antioxidante de los radicales Hidroxilo): Capacidad antioxidante para apagar los radicales OH generados por un sistema de tipo Fenton basado en Co (II).
- TRAP** (Parámetro Antioxidante de Captura Total de Radicales de Peroxilo): Capacidad antioxidante para eliminar los radicales derivados del luminol, generados por la descomposición del AAPH.
- CUPRAC** (Poder Antioxidante Reductor del Cúprico): Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes.
- FRAP** (Poder Antioxidante Férrico Reductor): Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III).
- PFRAP** (Poder Reductor del Ferricianuro de Potasio): Reducción del ferricianuro de potasio por antioxidantes y posterior reacción del ferrocianuro de potasio con el Fe³⁺.
- ABTS** (Ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]): Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico.
- DPPH** ([2,2-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazilo]): Reacción antioxidante con un radical orgánico.
- Análisis fluorimétricos**: Emisión de luz por un compuesto que ha absorbido alguna radiación electromagnética de diferente longitud de onda.

2. Técnicas electroquímicas

- Voltametría**: La reducción u oxidación de un compuesto en la superficie de un electrodo de trabajo, a un potencial aplicado adecuado, que da lugar al transporte en masa de nuevo material a la superficie del electrodo y a la generación de una corriente.
- Amperometría**: El potencial del electrodo de trabajo se ajusta a un valor fijo con respecto a un electrodo de referencia.
- Biamperometría**: La reacción del analito (antioxidante) con la forma oxidada de un par redox indicador.

3. Cromatografía

- Cromatografía de gases**: La separación de los compuestos de una mezcla se basa en la repartición entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil

líquida con diferentes polaridades, a un alto caudal y presión de la fase móvil.

- b. **Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):** La separación de los compuestos de una mezcla mediante la repartición entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida con diferentes polaridades, a un alto caudal y presión de la fase móvil.

Antes de la determinación analítica de estos compuestos, es necesario llevar a cabo una etapa de extracción de los mismos de la matriz alimentaria. Para ello existen distintos métodos (Oroian & Escriche, 2015):

1. **Extracción líquido-líquido o extracción con disolventes:** basada en el reparto del analito y las impurezas entre el medio orgánico y el acuoso a partir de las diferencias de solubilidad.
2. **Extracción líquido-sólido o extracción en fase sólida:** basada en el paso de la muestra líquida por una columna con material sorbente donde quedan retenidas de forma selectiva las especies interferentes o analitos. El rendimiento de la extracción de compuestos antioxidantes se ve influenciado por las condiciones en las que se lleva a cabo (González-Montelongo et al., 2010).
3. **SCF** (Extracción con fluidos supercríticos): se aprovecha el poder disolvente de los fluidos a unas temperaturas y presiones superiores a sus valores críticos para extraer ciertos compuestos químicos.
4. **MAE** (Extracción asistida por microondas): extracción con presión y temperatura controladas mediante el uso de recipientes cerrados, que además acortan el tiempo de extracción y aumentan su eficacia.
5. **HHP** (Alta Presión Hidrostática): incremento de la temperatura y presión que contribuyen al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumentando la eficiencia del proceso.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido analizar el contenido en flavonoides y ácidos fenólicos específicos, presentes en mieles originarias de distintos distritos de las cuatro regiones de Mozambique de mayor producción apícola (Manica, Nampula, Sofala y Zambezia).

Para alcanzar el objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de los compuestos fenólicos
2. Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras.
3. Evaluación del efecto de la región sobre el contenido de compuestos fenólicos de las mieles.
4. Evaluación del efecto del distrito sobre el contenido de compuestos fenólicos de las mieles de cada región.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS DE MIEL

En el presente estudio se analizaron 63 muestras de miel recolectadas en el año 2021 procedentes de distintas regiones de Mozambique: 11 muestras de Manica (distritos de Manica, Sussundenga y Tambara), 20 de Zambezia (distritos de Alto Molócue, Gilé, Mocubela y Mulevala), 12 de Sofala (distritos de Gorongonza, Maringue, y Caia) y 20 de Nampula (distritos de Angoche y Mogincual). Tras ser recepcionadas en el laboratorio de Control de Calidad de la Miel y los Productos Apícolas (LABMIEL) de la Universitat Politècnica de Valencia, España, éstas fueron almacenadas a 7-9 °C hasta la realización de los análisis pertinentes. La Tabla 1 muestra la información referente a los códigos de las muestras a su entrada a LABMIEL, así como su procedencia por región y distrito.

Tabla 1. Muestras de miel evaluadas en el presente estudio.

Región	Distrito	Nº de muestras	Código de LABMIEL
Manica	Manica	3	I-21170, I-21171, I-21172
	Sussundenga	5	I-21173, I-21174, I-21175, I-21176, I-21177
	Tambara	3	I-21178, I-21179, I-21180
Zambezia	Alto Molócue	5	I-21181, I-21182, I-21183, I-21184, I-21185
	Gilé	5	I-21186, I-21187, I-21188, I-21189, I-21190
	Mocubela	5	I-21191, I-21192, I-21193, I-21194, I-21195
	Mulevala	5	I-21196, I-21197, I-21198, I-21199, I-21200
Sofala	Gorongonza	4	I-21201, I-21202, I-21203, I-21204
	Maringue	3	I-21205, I-21206, I-21207
	Caia	5	I-21208, I-21209, I-21210, I-21211, I-21212
Nampula	Angoche	8	I-21213, I-21214, I-21215, I-21216, I-21217, I-21218, I-21219, I-21220
	Mogincual	12	I-21221, I-21222, I-21223, I-21224, I-21225, I-21226, I-21227, I-21228, I-21229, I-21230, I-21231, I-21232

3.2. ANALISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC)

3.2.1. REACTIVOS Y PATRONES

Se empleó un total de 24 patrones (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disponibles en el laboratorio: 4-hydroxibenzoic acid, 4-o-caffeoylquinic acid, apigenin, apigenin-7-glucoside, caffeic acid, CAPE, catechin, chrysin, ellagic acid, epicatechin, ferulic acid, galangin, gallic acid, kaempferol, luteolin, naringenin, p-coumaric acid, quercetin, quercetin 3-glucoside, quercitrin, quinic acid, rutin, sinapic acid, trans-cinnamic acid. Cabe destacar que todos los compuestos fenólicos aparecen a lo largo del estudio nombrados en inglés para facilitar la comparación de los resultados con el resto de los estudios realizados sobre contenido de ácidos fenólicos en miel.

El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC se adquirieron en VWR (Fontenay-sous-Bois, Francia). Durante todo el procedimiento se utilizó agua purificada (bidestilada) de un sistema mili-Q. Se obtuvieron disoluciones madre individuales de cada flavonoide y ácido fenólico a una concentración de 1000 mg/L en metanol, mezclando cada una de estas disoluciones individuales se preparó una solución intermedia de concentración final de 100 mg/L. Las soluciones patrón de trabajo se prepararon mediante la dilución de la cantidad apropiada de la solución intermedia para obtener 6 niveles de calibración hasta obtener concentraciones finales de 0.1, 0.5, 5, 10, 20 y 40 mg/L. La solución patrón madre y mezcla se almacenaban a una temperatura de -20 °C y la solución patrón trabajo a +4 °C.

3.2.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se pesaban 10 g de muestra y se añadían 15 mL de agua acidificada (pH2 con HCl concentrado). Se agitaba con el vórtex hasta homogeneizar y se centrifugaba durante de 5 minutos a 4000 rpm con la finalidad de eliminar posibles sólidos insolubles presentes en las muestras.

La extracción de los compuestos fenólicos se realizaba mediante el método de extracción en fase sólida (SPE), usando cartuchos Strata-X (200mg/3mL) (Phenomenex, US), previamente acondicionados con 3 mL de metanol y 3 mL de agua mili-Q. Se eliminaban las interferencias lavando los cartuchos pasando 5 mL de agua acidificada seguido de 15 mL de agua mili-Q y se dejaban secar durante 2 minutos a vacío. Finalmente se eluían los compuestos fenólicos con 3 mL de MeOH:ACN (2:1). Aproximadamente 1 mL de eluido se filtraba a través de un filtro de membrana de nylon (0.2 µm) antes del análisis cromatográfico.

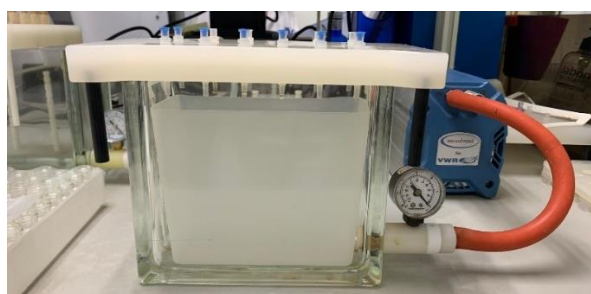


Figura 7. Colector de vacío para extracción en SPE.

3.2.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis de los compuestos se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1200 SL series Rapid Resolution, equipado con un desgasificador, una bomba binaria, un inyector automático y un compartimento termostatzado de columna, acoplado a un detector de diodo array (DAD) (figura 7). La adquisición y el procesamiento de los datos se realizó con el programa MassHunter Workstation Software versión B.09.00.

Para la separación de los compuestos se utilizó columna en fase reversa XBridge C18 (150x 4.6mm, 5 μ m) (Waters, Ireland), termostatzada a 31 °C. La fase móvil binaria estaba compuesta por una fase A (1 % ácido fórmico) y una fase B (acetonitrilo). El gradiente utilizado se muestra en la tabla 2, a un flujo de 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μ L.



Figura 8. HPLC Agilent 1200 SL series Rapid Resolution.

Tabla 2. Gradiente de la fase A y fase B utilizado durante el análisis cromatográfico.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Flujo (mL/min)	Límite de presión max. (bar)
0.00	90.0	10.0	0.500	400.00
3.00	85.0	15.0	0.500	400.00
18.00	60.0	40.0	0.500	400.00
24.00	60.0	40.0	0.500	400.00
27.00	34.0	66.0	0.500	400.00
27.10	50.0	50.0	0.500	400.00
33.00	30.0	70.0	0.500	400.00
40.00	10.0	90.0	0.500	400.00
43.00	90.0	10.0	0.500	400.00
45.00	90.0	10.0	0.500	400.00

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa Statgraphics Centurión, a través del análisis del ANOVA simple, con la finalidad de evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas para cada una de las variables consideradas en este estudio (concentraciones de los compuestos fenólicos) considerando el factor "región". Además, (para cada región de forma independiente), se evaluó también la existencia de diferencias significativas entre distritos (factor "distrito"). Se utilizó el intervalo LSD (diferencia mínima significativa) y $\alpha=0.05$. Se considera que existen diferencias estadísticamente significativas entre un conjunto de datos que obtenga un p-valor <0.05 , al 95 % de nivel de confianza y que no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se obtenga un p-valor $>0,05$, al 95 % de nivel de confianza (Romero & Zúnica, 1993).

Se utilizó el diagrama de box and whisker (cajas y bigotes) resultante del ANOVA para observar la variabilidad entre los conjuntos de datos obtenidos en las diferentes pruebas. Es un gráfico que representa de manera visual características como la dispersión y la simetría. Se observa la "caja" que abarca el 50 % de los valores centrales de los datos, extendiéndose por el primer y tercer cuartil. La mediana se representa por la línea central. Los "bigotes" se extienden desde el menor al mayor valor observado considerado "normal". Los valores que difieren del cuartil más cercano más de 1.5 veces el intervalo intercuartílico se representan como puntos aislados y son considerados como anómalos (Romero & Zúnica, 1993).

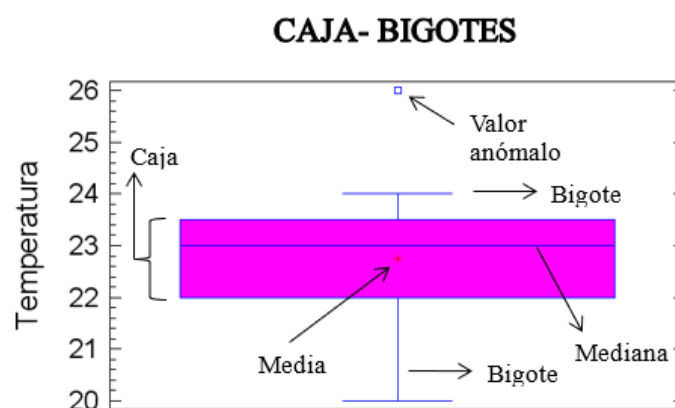


Figura 9. Diagrama de Box-Whisker. Fuente: Romero y Zúnica, 1993.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Inicialmente, se partió de una batería de 24 estándares disponibles en el laboratorio (4-hydroxibenzoic acid, 4-o-caffeoylquinic acid, apigenin, apigenin-7-glucoside, caffeic acid, CAPE, catechin, chrysin, ellagic acid, epicatechin, ferulic acid, galangin, gallic acid, kaempferol, luteolin, naringenin, p-coumaric acid, quercetin, quercetin 3-glucoside, quercitrin, quinic acid, rutin, sinapic acid, trans-cinnamic acid) llegando a identificar un total de 10 compuestos fenólicos en las muestras de miel analizadas: gallic acid, caffeic acid, rutin, ellagic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, ferulic acid, quercetin, trans-cinnamic acid y naringenin.

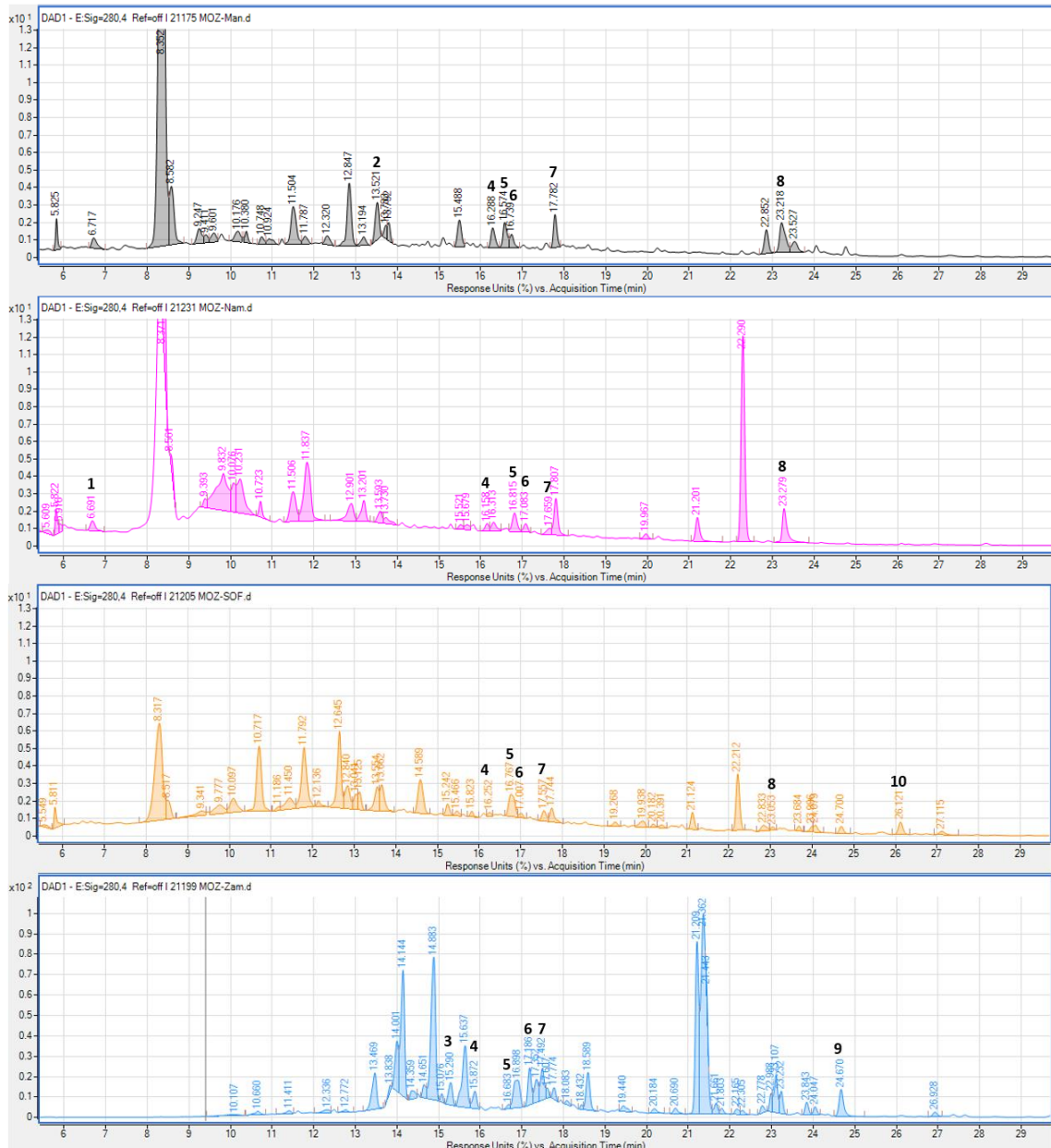
Los flavonoides y los ácidos fenólicos fueron identificados mediante la comparación de los tiempos de retención cromatográficos y características espectrales UV de los analitos presentes en las muestras con estándares auténticos. Los cromatogramas fueron registrados entre 200 y 400 nm. Se seleccionó el valor de λ en el que se presentaba mayor absorbancia para cada compuesto con la que posteriormente se realizó la cuantificación de cada uno. En la tabla 3 se detalla las longitudes de onda de máxima absorbancia y los tiempos de retención para cada compuesto.

Tabla 3. Tiempos de retención y longitudes de onda de máxima absorbancia para cada compuesto fenólicos detectado.

	Compuesto fenólico	RT	λ (nm)
1	Gallic acid	6.680	280
2	Caffeic acid	13.525	320
3	Rutin	15.203	260
4	Ellagic acid	16.063	250
5	p-Coumaric acid	16.738	320
6	Sinapic acid	17.242	320
7	Ferulic acid	17.522	320
8	Quercetin	23.266	380
9	Trans-Cinnamic acid	24.697	280
10	Naringenin	26.122	290

En la figura 10 se muestran ejemplos de cromatogramas pertenecientes las regiones de Manica, Nampula, Sofala y Zambezia, respectivamente. A simple vista se observa que existen diferencias entre las muestras de cada región. La región de Zambezia (D) presenta picos mucho más elevados, en general, que en el resto de las regiones.

Cabe destacar que en el cromatograma D perteneciente a la región de Zambezia, la escala es superior al resto de provincias esto es debido a que los compuestos son muy abundantes y por tanto los picos aparecen recortados en la imagen.



(1) Gallic acid; (2) Caffeic acid; (3) Rutin; (4) Ellagic acid; (5) p-Coumaric acid; (6) Sinapic acid; (7) ferulic acid; (8) Quercetin; (9) Trans-Cinnamic acid; (10) Naringenin

Figura 10. Ejemplos de cromatogramas de muestras de las regiones de Manica (A), Nampula (B), Sofala (C) y Zambezia (D).

4.2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La cuantificación de los distintos compuestos fenólicos, previamente identificados en las muestras, se realizó mediante curvas de calibración construidas con un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados, relacionando así el área correspondiente al pico de cada compuesto con su respectiva concentración (0.5-40 mg/L). Para ello, se prepararon disoluciones patrón con diferentes concentraciones del analito a medir (compuesto fenólico).

La figura 11 muestra las distintas rectas de calibrado obtenidas para todos los compuestos identificados. En todos ellos se observa un valor de r^2 entre 0.997 y 0.999 lo que demuestra una buena linealidad en el método utilizado, a excepción del ellagic acid cuyo valor de r^2 es inferior, 0.992. Por tanto, se puede afirmar que el método es adecuado para llevar a cabo una correcta cuantificación de los compuestos fenólicos analizados.

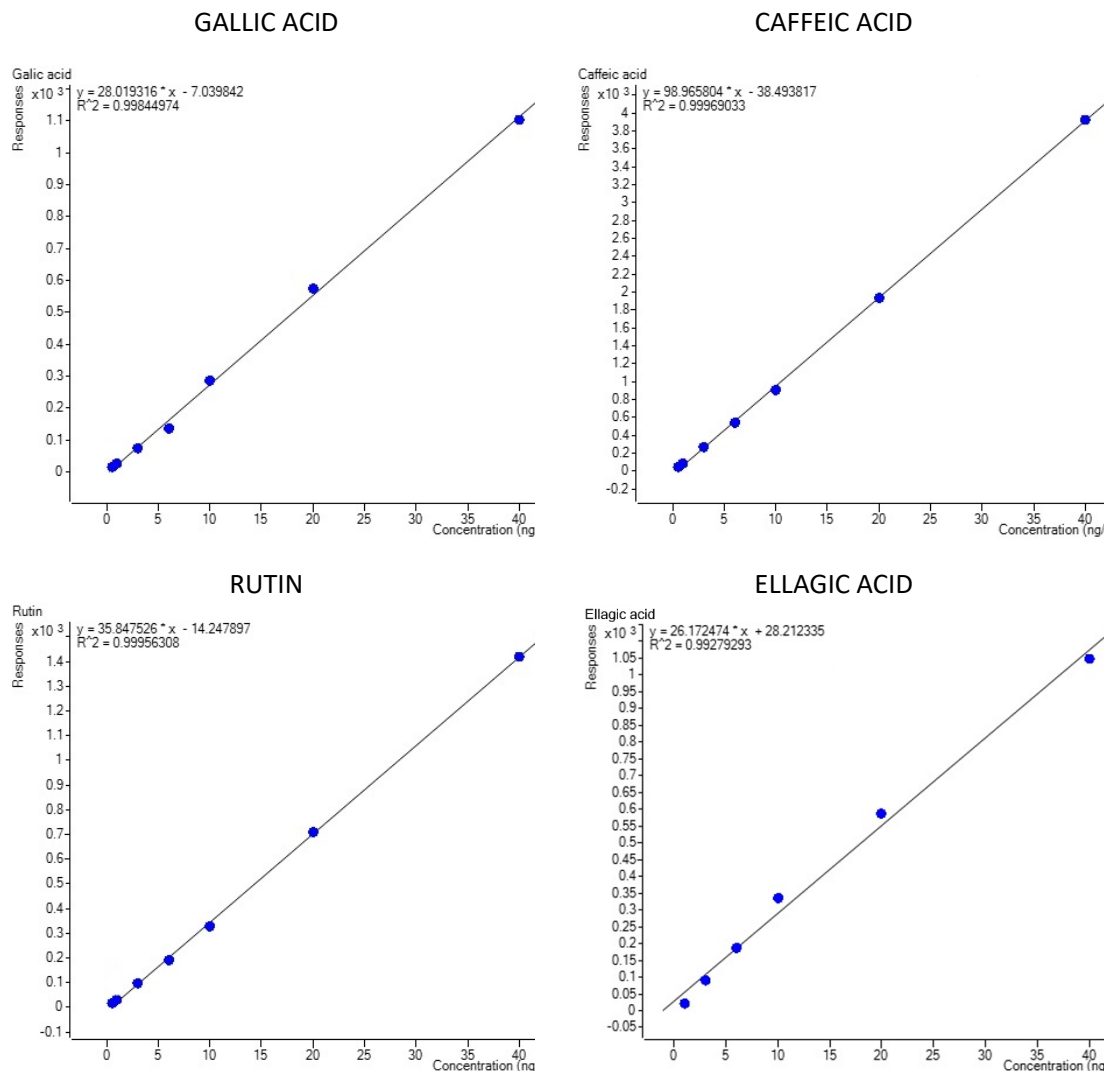


Figura 11A. Curvas de calibrado de los compuestos fenólicos.

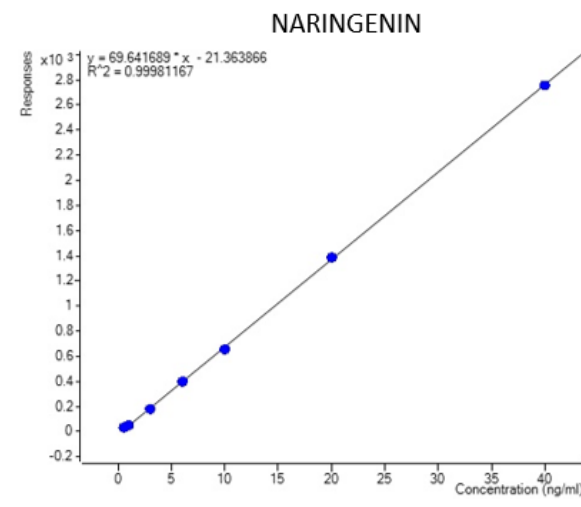
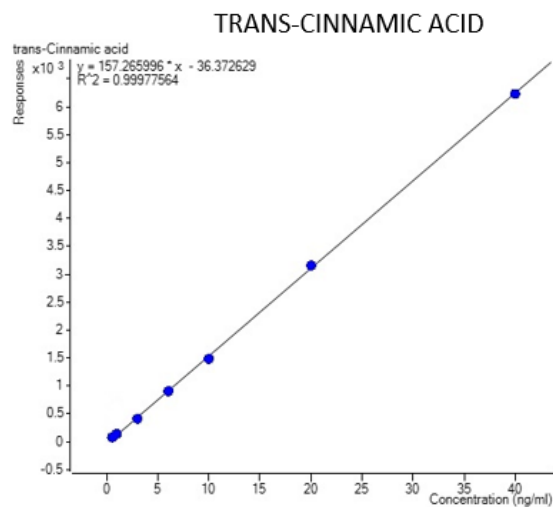
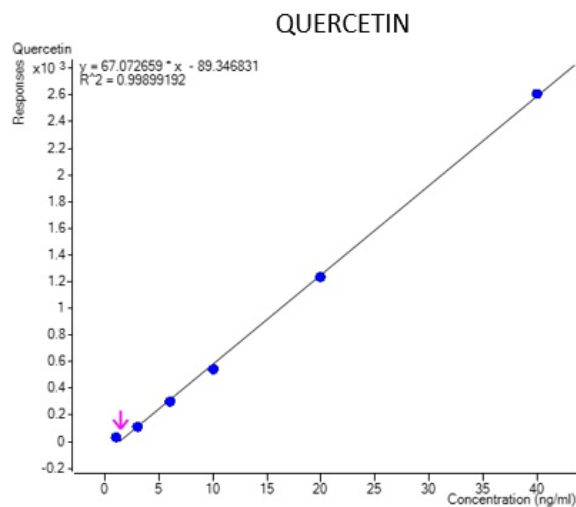
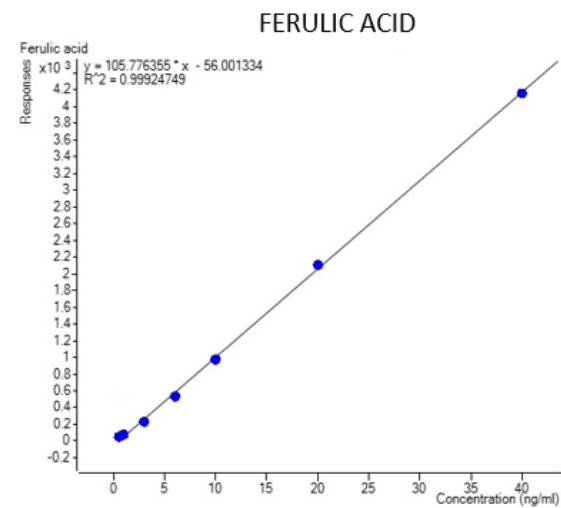
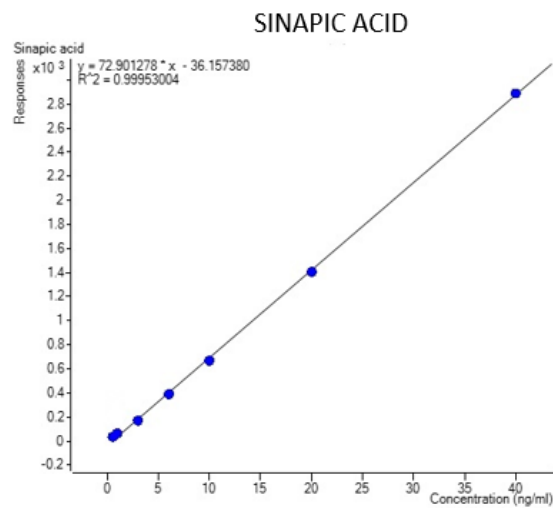
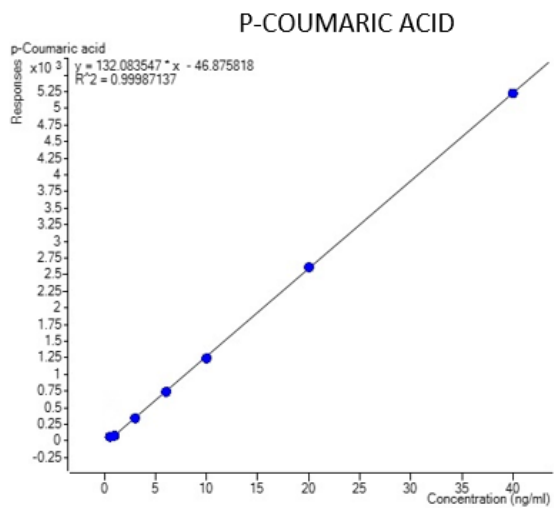


Figura 11B. Curvas de calibrado de los compuestos fenólicos

4.2.1. EFECTO DE LA REGIÓN EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS MIELES

La tabla 4 muestra la concentración de los 10 compuestos fenólicos previamente identificados agrupados en 2 categorías: 7 phenolic acids y 3 flavonoids. Dentro de los phenolic acids se han diferenciado hydroxycinnamic acids (caffeic acid; p-coumaric acid; sinapic acid; ferulic acid y trans-cinnamic acid) y hydroxybenzoic acids (ellagic acid y gallic acid). Los flavonoids se han agrupado en dos familias químicas: flavonols (rutin y quercetin) y flavanone (naringenin).

La tabla recoge los valores promedio de las concentraciones (mg/100g de miel) obtenidas para cada compuesto, así como los valores mínimos y máximos. Además, para cada región se muestra el sumatorio de las concentraciones de dichos compuestos por familia química, así como el sumatorio total de todos ellos. La tabla 4 también muestra los resultados del ANOVA, cociente F y diferencias significativas, de cada uno de los compuestos fenólicos (considerando la región como factor).

De los 10 compuestos analizados, 7 de ellos mostraron diferencias significativas entre muestras de las distintas regiones (caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, ferulic acid, trans-cinnamic acid, rutin, quercetin).

Zambezia fue la región con mayor contenido en hydroxycinnamic acids (10.01 mg/100g) frente a Manica (5.06 mg/100g), Sofala (3.76 mg/100g) y Nampula (2.74 mg/100g). Esto se debe principalmente a la cantidad ferulic acid presente en las muestras de Zambezia con un valor medio de 4.56 mg/100g siendo significativamente superior que el resto de las regiones: 1.32 mg/100g en Manica, 1.16 mg/100g en Nampula y 1.22 mg/100g en Sofala. Todos los compuestos presentaron diferencias significativas entre regiones, además el p-coumaric acid fue el compuesto con mayor diferencia significativa entre regiones, aunque este fue ligeramente superior en la región de Sofala.

En cuanto a los hydroxybenzoic acids, no se obtuvieron diferencias significativas entre regiones. El gallic acid solo fue detectado en la región de Nampula en pequeñas concentraciones. En el caso del ellagic acid es importante comentar que, aunque no se detectaron diferencias significativas entre las cuatro regiones, sí que existe una diferencia significativa con un nivel del 95.00% de confianza entre las regiones de Manica y Zambezia. Además, se observa que es el compuesto fenólico que está presente en mayor concentración en todas las regiones de Mozambique predominando Zambezia (37.53 mg/100g) y Sofala (31.57 mg/100g) seguido por Manica (16.46 mg/100g) y Nampula (11.67 mg/100g).

A pesar del alto contenido de ellagic acid de entre los ácidos fenólicos encontrados en este estudio, su contenido dentro del mismo continente africano es muy variable. En países como Algeria no fue detectado (Ouchemoukh et al., 2017) y en Sudán no se reportó contenido alguno (Makawi et al., 2009). En cambio, sí que se detectó, aunque en menor concentración en Túnez (hasta 0.85 mg/100g, según el origen botánico y geográfico de la miel) (Martos et al., 1997) y en el mismo país de Mozambique (siendo la máxima concentración en la región de Manica, 0.82 mg/100g) (Talenque-Alberto et al., 2020).

En general, las concentraciones de los ácidos fenólicos de la miel procedente de Mozambique varían del resto de países. Un ejemplo es la concentración del ferulic acid encontrada en el presente estudio (hasta 19.97 mg/100g) frente a países como Polonia (desde 0.08 hasta 2.67 mg/100g) (Jasicka-Misiak et al., 2011), Turquía (desde n.d. hasta 0.94 mg/100g) (Can et al., 2015) o Portugal (desde 0.01 hasta 1.42 mg/100g). Otro claro ejemplo es el del gallic

acid obteniéndose concentraciones mucho más abundantes en Portugal (desde 183.57 hasta 237.50 mg/100g) (Andrade et al., 1997) o en América (desde n.d. hasta 36.18 mg/100g) (do Nascimento et al., 2018) que en el presente estudio (de n.d. a 0.2 mg/100g) o en estudios previos en Mozambique (desde 0.3 hasta 1.61 mg/100g) (Talenque-Alberto et al., 2020).

En cuanto a los flavonoids, solamente los compuestos de la familia de flavonols resultaron diferentes significativamente entre regiones. Sofala fue la región con mayor número de compuestos no detectados. Esto se debe a que fue la única en la que no se detectó presencia de rutin mientras que en el resto de las regiones sí, siendo Zambezia la que mayor concentración obtuvo (17.3 mg/100g) frente a Manica (2.9 mg/100g) y Nampula (0.4 mg/100g). A pesar del contenido en rutin fue bastante considerable en la región de Zambezia, dentro del mismo continente africano sólo se detectó en el mismo país de Mozambique (Talenque-Alberto et al., 2020) aunque en una concentración menor (de 0.23 a 4.41 mg/100g) que la del presente estudio (hasta 82.40 mg/100g). En otros estudios no se detectó (Ouchemoukh et al., 2017) o directamente no se reportó (Martos et al., 1997; Makawi et al., 2009). También existen diferencias entre países siendo Turquía el que obtuvo mayor concentración (desde n.d. hasta 53.86 mg/100g) (Can et al., 2015) frente a Mozambique e Italia (n.d. a 0.01 mg/100g) (Dico et al., 2019).

Respecto al quercetin, fue en la región de Sofala en la que se detectó la mayor concentración (3.50 mg/100g) y en Manica en la que menor concentración (1.34 mg/100g). El naringenin (flavanone) se detectó en todas las regiones, aunque sin mostrar diferencias significativas. Zambezia fue la que mayor concentración obtuvo (3.82 mg/100g) seguida de Nampula (1.61 mg/100g), Manica (1.48 mg/100g) y Sofala (1.00 mg/100g).

En general, el contenido de ácidos fenólicos fue superior a los flavonoides en las mieles de todas las regiones. Al igual que en otros estudios con mieles procedentes de Turquía (Can et al., 2015), Brasil (Buono-Costa et al., 2016), Polonia (Jasicka-Misiak et al., 2011) y Algeria (Ouchemoukh et al., 2017).

Con el fin de observar mejor los resultados obtenidos, la figura 12 muestra los gráficos de box and whisker resultantes del ANOVA para aquellos compuestos con diferencias significativas. En ellos se observa que, aunque la región de Zambezia es la que tiene mayor contenido total en compuestos fenólicos, esta no destaca en todos los compuestos. En el caso del caffeic acid se muestra como la región de Manica es la que mayor contenido representa.

Por otro lado, en el caso de p-coumaric acid se observa que, a excepción de Nampula, el resto de las regiones contienen muestras con elevada concentración en dicho compuesto. Pero el diagrama nos indica que en la región de Sofala destaca sobre Manica y Zambezia, ya que todas sus muestras contienen una elevada concentración en p-coumaric acid, como mínimo de 1.03 g/100g, mientras que en las otras dos regiones existen muestras sin presencia alguna.

Otro caso es el del quercetin en el que también destaca la región de Sofala ya que la gran mayoría de muestras se concentran cercanas al valor máximo por lo que el valor medio de la concentración en dicho compuesto es superior al resto de las regiones.

En el resto de los compuestos se observa que predomina la región de Zambezia, además en casos como el del ferulic acid y rutin existen datos que sobrepasan la línea del valor máximo. Esto indica la presencia de muestras con abundante cantidad de cada compuesto destacando así sobre el resto de las muestras dentro de la misma región.

Tabla 4. Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de diferentes regiones de Mozambique (Manica, Nampula, Sofala y Zambezia), y ANOVA F-ratio para el factor “región”.

Compuesto fenólico (mg/100g miel)	Regiones				ANOVA Factor Región
	Manica	Nampula	Sofala	Zambezia	
PHENOLIC ACIDS					
Hydroxycinnamic acids					
Caffeic acid	1.68 ^b (<LQ-7.31)	0.10 ^a (<LQ-2.0)	0.30 ^a (<LQ -2.21)	0.19 ^a (<LQ -2.72)	7.32***
P-coumaric acid	0.47 ^{a,b} (<LQ-1.31)	0.19 ^a (<LQ -1.10)	1.36 ^c (1.03-1.80)	0.73 ^b (<LQ -1.48)	17.5***
Sinapic acid	0.77 ^a (<LQ-1.43)	0.78 ^a (<LQ -1.68)	0.70 ^a (0.65-0.81)	1.56 ^b (0.65-3.98)	6.69***
Ferulic acid	1.32 ^a (0.93-1.94)	1.16 ^a (0.96-1.37)	1.22 ^a (0.99-1.44)	4.56 ^b (0.85-19.97)	5.83**
Trans-cinnamic acid	0.82 ^a (<LQ-1.66)	0.51 ^a (<LQ-2.01)	0.18 ^a (<LQ-1.15)	2.97 ^b (<LQ-11.92)	5.71**
Σ Hydroxycinnamic acid	5.06	2.74	3.76	10.01	
Hydroxybenzoic acids					
Ellagic acid	16.46 ^a (<LQ-64.24)	11.67 ^{a,b} (<LQ-34.21)	31.57 ^{a,b} (<LQ-76.30)	37.53 ^b (<LQ-167.81)	ns
Gallic acid	n.d.	0.01 (<LQ-0.20)	n.d.	n.d.	ns
Σ Hydroxybenzoic acid	16.46	11.68	31.57	37.53	
FLAVONOIDS					
Flavonols					
Rutin	2.86 ^a (<LQ-9.30)	0.44 ^a (<LQ-8.89)	n.d. ^a	17.30 ^b (<LQ-82.40)	5.03**
Quercetin	1.34 ^a (<LQ-3.12)	2.29 ^b (<LQ-5.15)	3.50 ^c (<LQ-4.76)	1.72 ^{a,b} (<LQ-3.31)	9.0***
Σ Flavonols	4.20	2.73	3.50	19.02	
Flavanone					
Naringenin	1.48 (<LQ-9.90)	1.61 (<LQ-25.88)	1.00 (<LQ-2.67)	3.82 (<LQ-12.12)	ns
Σ Total	27.20	18.76	39.83	70.39	

Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% obtenido por el estudio LSD. ns: no significativo; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 LQ=0.05

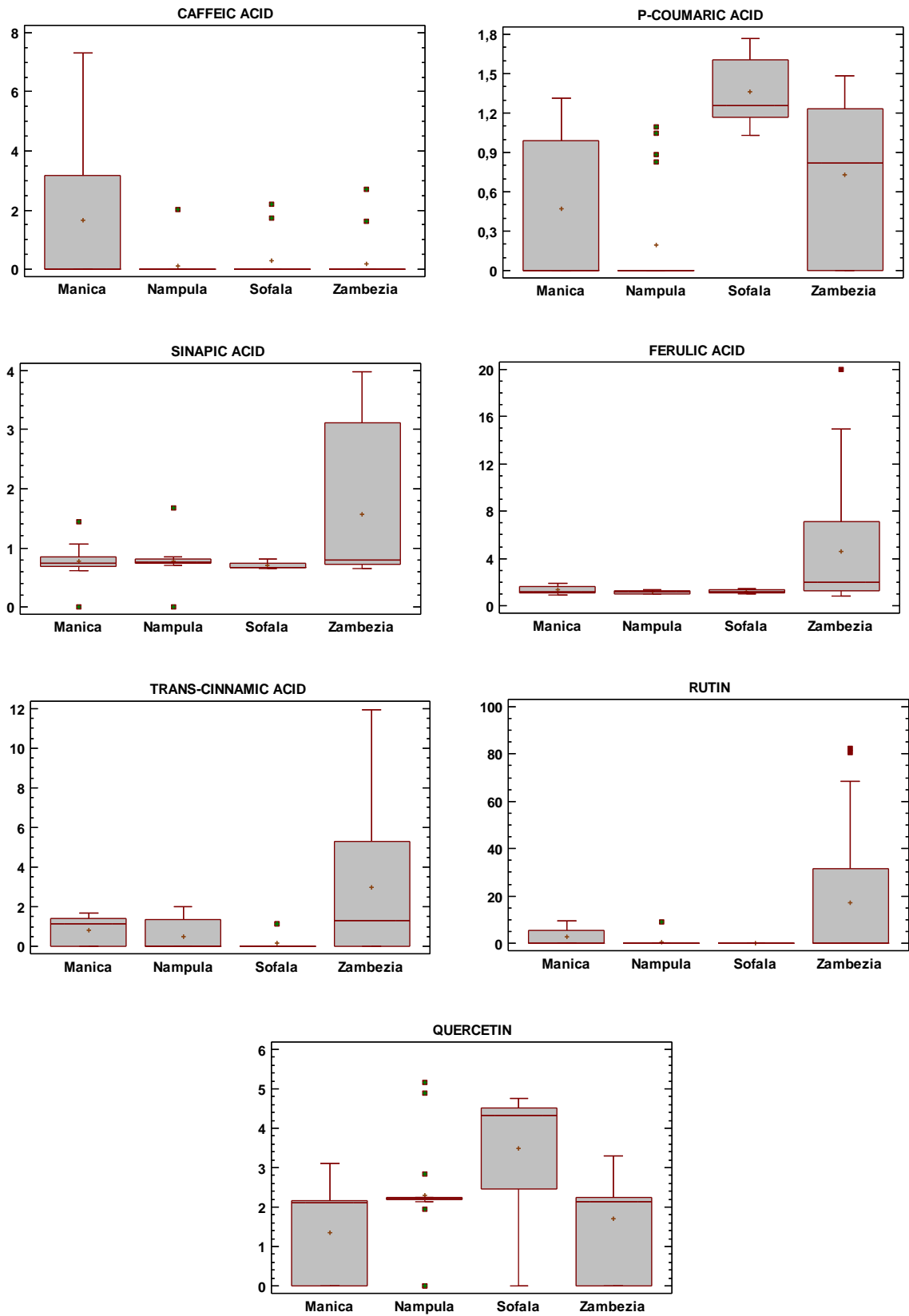


Figura 12. Diagramas box and whiskers de los compuestos con diferencias significativas entre regiones

4.2.2. EFECTO DEL DISTRITO EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS MIELES DE CADA REGIÓN

Además de estudiar el efecto de la región en el contenido de compuestos fenólicos, se estudió, para cada región, el efecto de los distintos distritos en el contenido de dichos compuestos. Para ello, se realizó para cada región un ANOVA considerando el factor 'distrito'. Las Tablas 5A, 5B Y 5C, muestran la concentración de los distintos compuestos fenólicos en los distritos de Manica y Nampula, Sofala y Zambesia, respectivamente y el resultado de los ANOVAS respectivos.

En la tabla 5A se observa que en la región de Manica, el distrito de Tambara fue el que mayor concentración total de ácidos fenólicos obtuvo (45.83 mg/100g) frente al distrito de Manica (28.03 mg/100g) y Sussundenga (15.18 mg/100g). Esto se debe principalmente a las concentraciones más elevadas de hydroxybenzoic acids (27.32 mg/100g) y flavonols (13.88 mg/100g) detectadas en Tambara. Aunque el análisis ANOVA no resultó significativo en ninguno de los compuestos, es importante destacar el ellagic acid ya que mediante la prueba de múltiples rangos se obtuvo una diferencia significativa con un nivel del 95.0% de confianza entre el distrito de Sussundenga (1.98 mg/100g) y Tambara (26.64 mg/100g).

También aparecen reflejadas las concentraciones de los compuestos fenólicos de la región de Nampula, siendo el distrito de Angoche (24.35 mg/100g) la que mayor concentración debido al contenido en hydroxybenzoic acids (14.28 mg/100g) y flavanones (3.83 mg/100g) frente a Mogincual (15.06 mg/100g). Cabe destacar que para ninguno de los compuestos las diferencias no fueron significativas.

En la tabla 5B se recogen las concentraciones de la región de Sofala. Entre los tres distritos destaca Maringue por su contenido fenólico total (82.33 mg/100g), frente a Caia (40.54 mg/100g) y Gorongonza (13.67 mg/100g). Esto se debe casi exclusivamente al contenido en hydroxybenzoic acids (73.49 mg/100g). Entre los diez compuestos, dos no fueron detectados en ninguno de los distritos (gallic acid y rutin) siendo así la región con menor variedad de compuestos fenólicos presentes en las muestras. Es interesante destacar el p-coumaric acid, ya que existe una diferencia significativa con un elevado valor-F, como consecuencia de la gran variabilidad entre los valores de los tres distritos, tal y como se observa tanto en la tabla 5B con los valores mínimos y máximos: Maringue (<LQ-2.48), Caia (2.38-4.76) y Gorongonza (4.33-4.76).

En la figura 13 se representan los diagramas de box and whisker de los compuestos con diferencias significativas dentro de la región de Sofala. En ellos se puede observar que en todos los compuestos destaca la región de Maringue a excepción del quercetin en la que predomina Gorongonza (4.49 mg/100g) frente a Caia (3.67 mg/100g) y Maringue (1.55 mg/100g). En el caso del naringenin se observa que en el distrito de Caia existe una gran dispersión de las concentraciones mientras que en Maringue todas las muestras contienen concentraciones muy similares por lo que los datos se encuentran agrupados en un pequeño rango siendo los valores mínimo y máximo 2.60 mg/100g y 2.67 mg/100g, respectivamente.

En cuanto a la tabla 5C se observan las concentraciones de los compuestos fenólicos diferenciados entre los distritos de Zambesia. Es el distrito de Mulevala el contenido total en compuestos fenólicos (198.71 mg/100g) fue bastante más elevado que en los otros tres: Mocubela (41.46 mg/100g), Gilé (17.36 mg/100g) y Alto Molócue (7.97 mg/100g). En estos valores influye el contenido de la familia de hydroxybenzoic acids (118.90 mg/100g), concretamente del ellagic acid ya que el gallic acid no fue detectado en ninguna muestra de los distintos distritos.

Es importante destacar en la familia de las flavanones el compuesto naringenin ya que el análisis ANOVA nos indica una diferencia estadísticamente significativa con un valor-F de 294.88. Con respecto al Naringenin es de destacar importantes diferencias ya que en las mieles de los distritos de Alto Molóculé y Mulevala no se ha detectado, por el contrario en el distrito de Mocubela se cuantificó 2.73 mg/100g y en el de Gilé 11.44 mg/100g (figura 14).

En la figura 14, en la que se han representado los diagramas de box and whisker de los compuestos que presentan diferencias significativas, además, se observa como la caja correspondiente al distrito de Mulevala es la que mayor concentración de cada compuesto indica, a excepción de naringenin, comentado en el párrafo anterior y el compuesto caffeic acid ya que este solo fue detectado en el distrito de Alto Molóculé (1.08 mg/100g). Además, en los casos de p-coumaric acid y ferulic acid se observa que la dispersión de los datos en el distrito de Mulevala es menor por lo que la mayoría de las muestras cuentan con una concentración en estos compuestos similar.

Tabla 5A. Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de diferentes distritos de Manica y Nampula y ANOVA F-ratio para el factor “distrito”.

Compuesto fenólico (mg/ 100g miel)	MANICA			ANOVA Factor Distrito	NAMPULA		ANOVA Factor Distrito
	Manica	Sussundenga	Tambara		Angoche	Mogincual	
PHENOLIC ACIDS							
Hydroxycinnamic acid							
Caffeic acid	1.31 (<LQ-3.16)	1.78 (<LQ-7.31)	1.14 (<LQ-3.22)	ns	n.d.	0.17 (<LQ-2.01)	ns
P-coumaric acid	0.74 (<LQ-1.04)	0.64 (<LQ-1.31)	0.16 (<LQ-0.82)	ns	0.11 (<LQ-0.88)	0.25 (<LQ-1.10)	ns
Sinapic acid	0.88 (0.66-1.43)	0.78 (0.62-0.95)	0.86 (<LQ-1.71)	ns	0.90 (0.73-1.68)	0.69 (<LQ-0.83)	ns
Ferulic acid	1.18 (0.93-1.63)	1.35 (1.01-1.94)	1.03 (<LQ-1.63)	ns	1.13 (0.96-1.34)	1.19 (0.96-1.37)	ns
Trans-cinnamic acid	0.97 (<LQ-1.57)	0.48 (<LQ-1.41)	0.92 (<LQ-1.61)	ns	0.71 (<LQ-1.44)	0.38 (<LQ-2.01)	ns
Σ Hydroxycinnamic acid	5.08	5.03	4.11		2.85	2.68	
Hydroxybenzoic acid							
Ellagic acid	16.82 ^{a,b} (<LQ-64.24)	1.98 ^a (0.25-6.11)	26.64 ^b (<LQ-55.21)	ns	14.28 (3.61-34.21)	9.94 (<LQ-17.77)	ns
Gallic acid	n.d.	n.d.	0.68 (<LQ-3.38)	ns	n.d.	0.02 (<LQ-0.20)	ns
Σ Hydroxybenzoic acid	16.82	1.98	27.32		14.28	9.96	
FLAVONOIDS							
Flavonols							
Rutin	4.15 (<LQ-8.58)	4.00 (<LQ-9.30)	12.71 (<LQ-63.55)	ns	1.11 (<LQ-8.90)	n.d.	ns
Quercetin	1.60 (<LQ-2.15)	1.53 (<LQ-3.12)	1.17 (<LQ-2.17)	ns	2.28 (2.13-2.83)	2.29 (<LQ-5.15)	ns
Σ Flavonols	5.75	5.53	13.88		3.39	2.29	
Flavanone							
Naringenin	0.38 (<LQ-1.53)	2.64 (<LQ-9.90)	0.52 (<LQ-2.58)	ns	3.83 (<LQ-25.88)	0.13 (<LQ-1.56)	ns
Σ Total	28.03	15.18	45.83		24.35	15.06	

Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% obtenido por el estudio LSD. ns: no significativo; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 LQ=0.05

Tabla 5B. Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles de los distritos de Sofala y ANOVA F-ratio para el factor “distrito”.

Compuesto fenólico (mg/ 100 g miel)	SOFALA			ANOVA Factor Distrito
	Caia	Gorongonza	Maringue	
PHENOLIC ACIDS				
Hydroxycinnamic acids				
Caffeic acid	0.79 (<LQ-2.21)	n.d.	n.d.	ns
P-coumaric acid	1.40 ^b (1.20-1.61)	1.12 ^a (1.03-1.23)	1.72 ^c (1.70-1.77)	18.46***
Sinapic acid	0.69 (0.66-0.81)	0.69 (0.65-0.81)	0.75 (0.74-0.75)	ns
Ferulic acid	1.25 ^b (1.13-1.42)	1.08 ^a (0.99-1.21)	1.41 ^b (1.38-1.43)	9.36**
Trans-cinnamic acid	n.d. ^a	n.d. ^a	0.77 ^b (<LQ-1.15)	7.69**
Σ Hydroxycinnamic acid	4.13	2.89	4.65	
Hydroxybenzoic acids				
Ellagic acid	31.71 ^a (<LQ-69.49)	6.29 ^a (0.54-10.30)	73.49 ^b (69.03-76.30)	9.31**
Gallic acid	n.d.	n.d.	n.d.	ns
Σ Hydroxybenzoic acid	31.71	6.29	73.49	
FLAVONOIDS				
Flavonols				
Rutin	n.d.	n.d.	n.d.	ns
Quercetin	3.67 ^b (2.38-4.76)	4.49 ^b (4.33-4.76)	1.55 ^a (<LQ-2.48)	8.95**
Σ Flavonols	3.67	4.49	1.55	
Flavanone				
Naringenin	1.03 ^a (<LQ-2.59)	n.d. ^a	2.64 ^b (2.60-2.67)	8.24**
Σ Total	40.54	13.67	82.33	

Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% obtenido por el estudio LSD. ns: no significativo; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 LQ=0.05

Tabla 5C. Valores promedio de las concentraciones (mg/100 g de miel), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados en las mieles del distritos de Zambezia y ANOVA F-ratio para el factor “distrito”.

Compuesto fenólico (mg/ 100 g miel)	ZAMBEZIA				ANOVA Factor Distrito
	Alto Molócue	Gilé	Mocubela	Mulevala	
PHENOLIC ACIDS					
Hydroxycinnamic acids					
Caffeic acid	1.08 ^b (<LQ- 2.72)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	4.63*
P-coumaric acid	0.68 ^b (0.52-0.82)	0.17 ^a (<LQ-1.05)	0.69 ^b (<LQ-1.16)	1.37 ^c (1.23-1.48)	10.41***
Sinapic acid	0.73 ^a (0.65-0.85)	0.73 ^a (0.71-0.76)	1.83 ^{a,b} (0.72-3.98)	2.63 ^b (0.97-3.59)	4.93*
Ferulic acid	1.03 ^a (0.85-1.35)	1.29 ^a (1.05-1.40)	3.15 ^a (2.02-7.24)	11.82 ^b (1.08-19.97)	11.55***
Trans-cinnamic acid	0.66 ^a (<LQ-1.33)	n.d. ^a	2.28 ^a (<LQ-5.32)	8.27 ^b (<LQ-11.92)	12.71***
Σ Hydroxycinnamic acid	4.18	2.19	7.95	24.09	
Hydroxybenzoic acids					
Ellagic acid	2.62 ^a (0.64-4.39)	1.55 ^a (<LQ-2.12)	18.59 ^a (9.55-58.39)	118.90 ^b (28.77-167.81)	22.56***
Gallic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ns
Σ Hydroxybenzoic acid	2.62	1.55	18.59	118.90	
FLAVONOIDS					
Flavonols					
Rutin	n.d. ^a	n.d. ^a	9.98 ^a (<LQ-41.82)	54.68 ^b (<LQ-82.40)	10.5***
Quercetin	1.17 ^{a,b} (<LQ-2.75)	2.18 ^{a,b} (2.07-2.25)	2.21 ^a (<LQ-3.31)	1.04 ^b (<LQ-2.16)	n.s
Σ Flavonols	1.17	2.18	12.19	55.72	
Flavanone					
Naringenin	n.d. ^a	11.44 ^c (10.58-12.12)	2.73 ^b (<LQ-3.42)	n.d. ^a	294.88***
Σ Total	7.97	17.36	41.46	198.71	

Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% obtenido por el estudio LSD. ns: no significativo; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 LQ=0.05

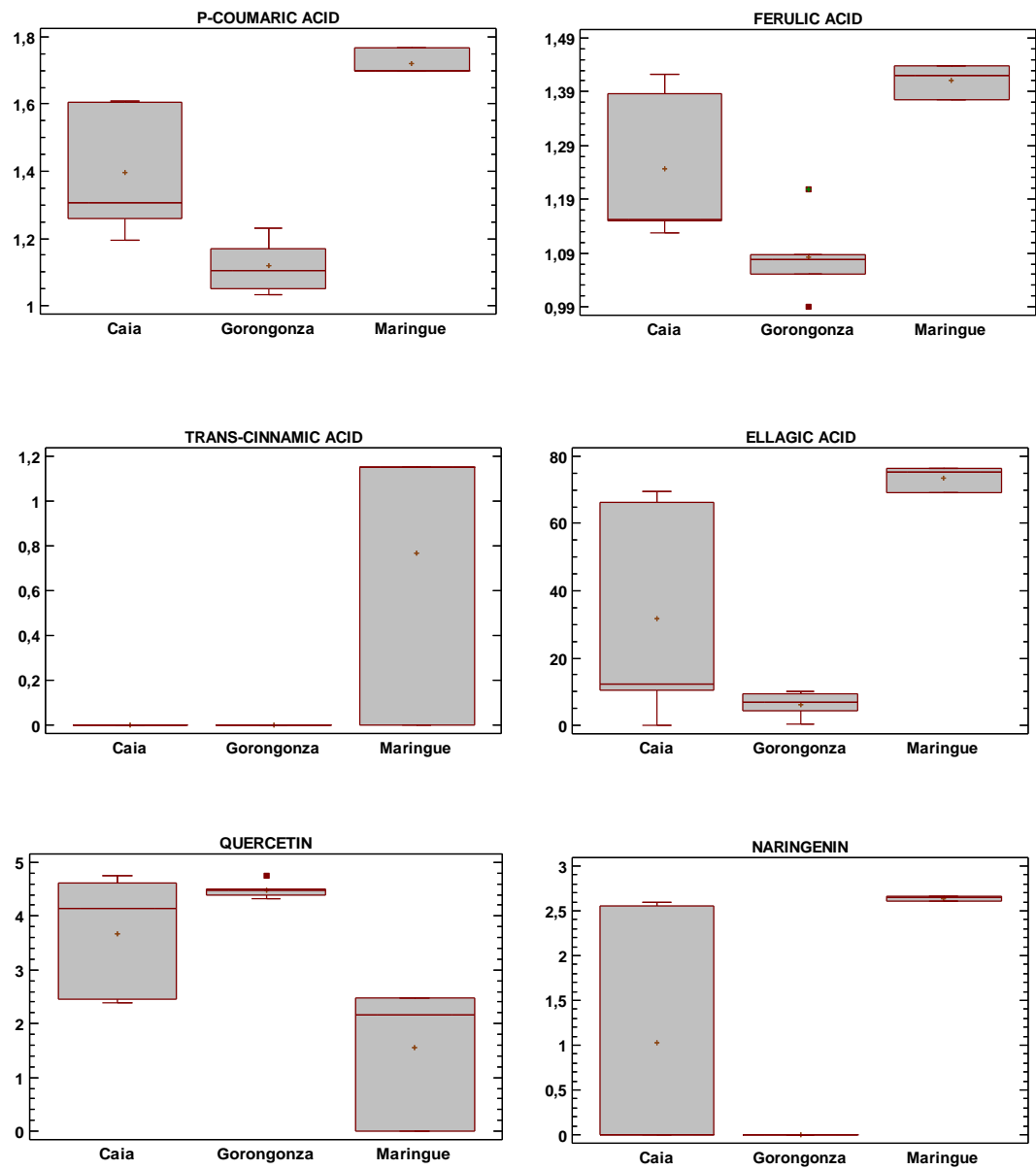


Figura 13. Diagramas box and whiskers de los compuestos con diferencias significativas entre distritos de Sofala.

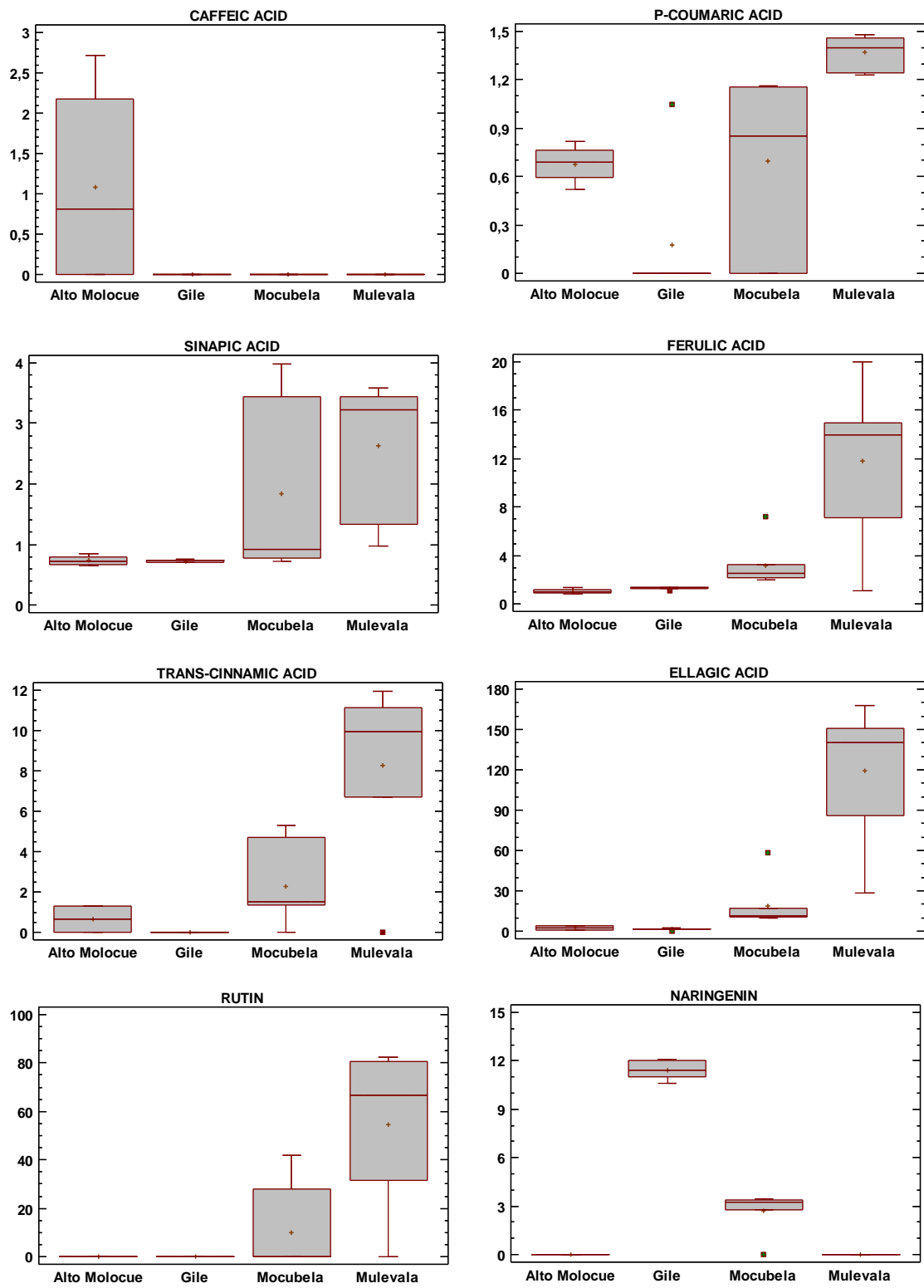


Figura 14. Diagramas box and whiskers de los compuestos con diferencias significativas entre distritos de Zambezia.

5. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se han identificado diez compuestos fenólicos. Siete de ellos son phenolic acids clasificados en dos familias químicas: hydroxycinnamic acids (caffeic acid; p-coumaric acid; sinapic acid; ferulic acid y trans-cinnamic acid) y hydroxybenzoic acids (ellagic acid y gallic acid); y tres de ellos son flavonoids: flavonols (rutin y quercetin) y flavanone (naringenin).

La concentración de compuestos fenólicos ha resultado significativamente distinta entre las cuatro regiones de Mozambique, siendo Zambezia en la que se observaron los valores más elevados mientras que en Nampula los menores.

En todas las regiones el contenido de phenolic acids fue siempre superior al de flavonoids. En las mieles del presente estudio, el ellagic acid fue siempre el compuesto mayoritario, con niveles muy superiores a los reportados en mieles de otras procedencias.

Considerando los distritos estudiados de cada región, en los de Manica y Nampula no se observaron diferencias significativas entre ellos para los compuestos fenólicos cuantificados en las mieles. Por el contrario, Maringue en Sofala y Mulevala en Zambezia mostraron significativamente mayores concentraciones. Estas diferencias se deben fundamentalmente a determinados compuestos como el p-coumaric acid para los distritos de Sofala y el naringenin en los de Zambezia.

Este estudio ha puesto de manifiesto que las mieles analizadas son ricas en compuestos antioxidantes, especialmente en ácidos fenólicos. Un mayor conocimiento de las características de las mieles de las zonas rurales de Mozambique permitirá darles un valor añadido para su comercialización. Además, es de destacar que este estudio se enmarca en el objetivo 8 “trabajo decente y crecimiento económico”, de los objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas (2015)

6. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, S., & Othman, N. H. (2013). Honey as a potential natural anticancer agent: a review of its mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., ... & Othman, N. H. (2018). Honey as a potential natural antioxidant medicine: an insight into its molecular mechanisms of action. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

Andrade, P., Ferreres, F., & Amaral, M. T. (1997). Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20(14), 2281-2288.

Bueno-Costa, F. M., Zambiasi, R. C., Bohmer, B. W., Chaves, F. C., da Silva, W. P., Zanusso, J. T., & Dutra, I. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 333-340.

Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food chemistry*, 180, 133-141.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.

Dico, G. M. L., Ulrici, A., Pulvirenti, A., Cammilleri, G., Macaluso, A., Vella, A., ... & Ferrantelli, V. (2019). Multivariate statistical analysis of the polyphenols content for the discrimination of honey produced in Sicily (Southern Italy). *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103225.

do Nascimento, K. S., Sattler, J. A. G., Macedo, L. F. L., González, C. V. S., de Melo, I. L. P., da Silva Araújo, E., ... & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian Apis mellifera honeys. *LWT*, 91, 85-94.

González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, 71(3), 347-355.

Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Dereń, M., & Kafarski, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 131(4), 1149-1156.

Jiménez, A. G. (2018). La protección jurídica y administrativa de las abejas. *Actualidad Jurídica Ambiental*, 80, 39-72.

Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-5.

López-Velasco, Daniel Salvador, Sosa-Montes, Eliseo, Pro-Martínez, Arturo, González-Cerón, Fernando, & Vargas-Galicia, Artemio Jovanny. (2021). Efecto antioxidante de la miel de abeja sobre la carne de conejo almacenada en refrigeración. *CienciaUAT*, 15(2), 135-143. Epub 14 de abril de 2021.

Lotito, S. B., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727-1746.

Makawi, S. Z. A., Gadkariem, E. A., & Ayoub, S. M. H. (2009). Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *E-Journal of Chemistry*, 6(S1), 429-437.

Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2824-2829.

Maza, J. A. (2022). Caracterización físico-química y determinación del perfil polifenólico de miel de abeja (*Apis mellifera* L.) en tres zonas de la región San Martín.

Ministerio de Asuntos Exteriores, Unión Europea y Cooperación. Ficha país república de Mozambique. Visto el 9 de mayo de 2022.

https://www.exteriores.gob.es/Documents/FichasPais/MOZAMBIQUE_FICHA%20PAIS.pdf

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.

Naciones Unidas (2015) Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Visto el 30 de junio de 2022 <https://www.un.org/>

Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., & Suzuki, N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food chemistry*, 75(2), 237-240.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Norma para la miel CXS 12-1981. Visto el 25 de mayo de 2022 www.fao.org

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.

Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Gómez-Romero, M., Aboud, F., Giuseppe, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2017). Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 460-469.

Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., & Singal, P. K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5-6), 746-761.

Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química*, 31(2), 68-81.

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.

Romero, R. & Zúnica, L. Estadística. Diseño de experimentos. Modelos de regresión. Editorial:SPUPV 93.637. Valencia, 1993.

Tanleque-Alberto, F., Juan-Borrás, M., & Escriche, I. (2020). Antioxidant characteristics of honey from Mozambique based on specific flavonoids and phenolic acid compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103377.

Ulloa, J. A., Mondragon C. P., Rodríguez Rodríguez, R., Reséndiz Vázquez, J. A., & Rosas Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *CONACYT*.

Youngson, R. (2003). Antioxidantes y radicales libres (Vol. 132). Edaf.