

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS,
MINERALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MIELES FLORALES DE
Citrus sinensis Y *Persea americana***

POR:

WILLIAM JORDAN MORALES SARMIENTO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS
EN NUTRICIÓN.**

Noviembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



TESIS

**BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS,
MINERALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MIELES FLORALES DE
Citrus sinensis Y *Persea americana***

PRESENTA

WILLIAM JORDAN MORALES SARMIENTO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MONTERREY, N.L, MÉXICO

Noviembre, 2022

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis aprueba la tesis titulada **“BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS, MINERALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MIELES FLORALES DE *CITRUS SINENSIS* Y *PERSEA AMERICANA*”** presentada por la William Jordan Morales Sarmiento, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Presidente : Dr. Marcelo Hernández Salazar

Secretario : Dr. Heriberto Castro García

Vocal : Dra. Beatriz Adriana Rodriguez Romero

Monterrey, Nuevo León a noviembre de 2022

**BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS,
MINERALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MIELES FLORALES DE
CITRUS SINENSIS Y *PERSEA AMERICANA*.**

Aprobación de Tesis

Presidente : Dr. Heriberto Castro García

Secretario : Dr. Marcelo Hernández Salazar

Vocal : Dra. Beatriz Adriana Rodríguez Romero

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Heriberto Castro García, Asesor de mi tesis y al Dr. Marcelo Hernández Salazar, Co director de mi tesis. Así como a la Dra. Beatriz Adriana Rodríguez Romero y la Dra. Julia Mariana Márquez Reyes por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

A mi esposa Luisa, por ser mi pilar y sustento en estos dos años de arduo trabajo y esfuerzo. Por las noches de desvelo y los días en que tuve que entregarme por completo a este proyecto, estuviste siempre ahí conmigo. sin ti esto no habría sido posible.

A mi familia, por siempre creer en mí y animarme a alcanzar las metas importantes en mi vida, su motivación me ha impulsado a siempre ir más allá.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigaciones de la Facultad de Agronomía (FA) por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|--------|---|-----------|
| 1.1. | Definición de miel..... | 15 |
| 1.2. | México y la miel..... | 16 |
| 1.3. | Composición química..... | 16 |
| 1.3.1 | Humedad..... | 16 |
| 1.3.2 | Carbohidratos..... | 18 |
| 1.3.3 | Aminoácidos..... | 20 |
| 1.3.4. | Enzimas | 21 |
| 1.3.5. | Ácidos orgánicos..... | 23 |
| 1.3.6. | Vitaminas y minerales | 23 |
| 1.3.7. | Compuestos fenólicos..... | 24 |
| 1.4. | Los compuestos fenólicos y sus efectos en la salud | 28 |
| 1.4.1 | Estrés oxidativo e inflamación | 29 |
| 1.4.2 | Capacidad antioxidante | 30 |
| 1.4.3 | Enfermedad cardiovascular | 32 |
| 1.4.4. | Cáncer | 36 |
| 1.4.5 | Diabetes | 41 |
| 1.5. | Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos..... | 43 |
| 6.1 | Objetivos específicos | 50 |
| 7.1. | Muestras de estudio..... | 51 |
| 7.2. | Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante..... | 51 |
| 7.2.1 | Fenoles totales | 51 |
| 7.2.2. | Ensayo FRAP..... | 52 |

| | | |
|--------|--|----|
| 7.2.3. | Ensayo DPPH | 52 |
| 7.3. | Efecto de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> sobre el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante | 53 |
| 7.3.1 | Digestión <i>In vitro</i> | 53 |
| 7.3.2. | Extracción sólido-líquido | 54 |
| 7.4. | Evaluación de la bioaccesibilidad | 55 |
| 7.5. | Plan de análisis | 59 |
| 7.6. | Consideraciones éticas y de bioseguridad | 59 |
| 8.1. | Contenido de fenoles totales | 60 |
| 8.2. | Capacidad antioxidante | 61 |
| 8.2.1. | Capacidad antioxidante medida por DPPH | 61 |
| 8.2.2. | Capacidad antioxidante medida por FRAP | 62 |
| 8.3. | Contenido de minerales | 63 |
| 8.3.1. | Potasio | 63 |
| 8.3.2. | Zinc | 64 |
| 8.3.3. | Calcio | 65 |
| 8.3.4. | Cobre | 66 |
| 8.3.5. | Magnesio | 67 |
| 9.1. | Contenido de fenoles totales | 69 |
| 9.2. | Determinación de capacidad antioxidante | 70 |
| 9.2.1. | Determinación de capacidad antioxidante por DPPH | 70 |
| 9.2.2. | Determinación de capacidad antioxidante por FRAP | 71 |
| | RESUMEN CURRICULAR | 91 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Constituyentes de los azúcares de la miel (Adaptado de Ulloa et al., 2010)..... | 19 |
| Tabla 2. Ácidos fenólicos y flavonoides comunes en la miel (Adaptado de Álvarez-Suárez et al., 2013)..... | 26 |
| Tabla 3. Operacionalización de las variables..... | 58 |
| Tabla 4. Contenido de fenoles totales a lo largo de la digestión in vitro en muestras de mieles florales de Citrus Sinensis y Persea americana..... | 61 |
| Tabla 5. Capacidad antioxidante medida por DPPH a lo largo de la digestión in vitro en muestras de mieles florales de Citrus Sinensis y Persea americana. .. | 62 |
| Tabla 6. Capacidad antioxidante medida por FRAP a lo largo de la digestión In vitro en muestras de mieles florales de Citrus Sinensis y Persea americana. .. | 63 |
| Tabla 7. Contenido de potasio en mieles florales de Citrus sinensis y Persea americana a través de la digestión in vitro por absorción atómica. | 64 |
| Tabla 8. Contenido de Zinc en mieles florales de Citrus sinensis y Persea americana a través de la digestión in vitro por absorción atómica. | 65 |
| Tabla 9. Contenido de Zinc en mieles florales de Citrus sinensis y Persea americana a través de la digestión in vitro por absorción atómica. | 66 |
| Tabla 10. Contenido de cobre en mieles florales de Citrus sinensis y Persea americana a través de la digestión in vitro por absorción atómica. | 67 |
| Tabla 11. Contenido de cobre en mieles florales de Citrus sinensis y Persea americana a través de la digestión in vitro por absorción atómica. | 68 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de los flavonoides más comunes en la miel (adaptado de Álvarez-Suárez et al., 2013). | 28 |
| Figura 2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular: A) modificables y B) no modificables. | 33 |
| Figura 3. Efectos cardioprotectores del consumo de miel (adaptado de Al-Waili et al., 2013)..... | 34 |

Figura 4. Mecanismos de regulación de la presión mediados por flavonoides (adaptado de Malaaki et al., 2019). 35

Figura 5. Potenciales mecanismos anticáncer de la miel (Adaptado de Waheed et al., 2019). 37

Figura 6. Diagrama del proceso de dializado en la digestión in vitro (Reimpreso de Rodríguez, 2012). 56

Figura 7. Estrategia experimental. 57

NOMENCLATURA

Abs
DPPH
FRAP
Mg
Kg
MCs
MPa
T

Absorbancia
2,2-difenil-1-picrilhidracilo
Poder reductor Férrico
Miligramos
Kilogramos
Miel ce *Citrus sinensis*
Miel de *Persea americana*
Trolox

RESUMEN

Introducción: La miel es un alimento que contiene compuestos fenólicos, principalmente flavonoides pero también otros elementos como minerales y enzimas que pueden llevar a cabo un efecto biológico debido a su capacidad antioxidante. Si bien, estos compuestos se encuentran presentes en la miel, poco se sabe del efecto que el proceso digestivo por el que este alimento debe atravesar pueda tener sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y minerales presentes en la misma, afectando finalmente su biodisponibilidad y el efecto biológico que la miel produce.

Objetivo: Evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante de mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana*.

Material y Métodos: Las muestras fueron sometidas a una digestión simulada *in vitro* con la técnica descrita por Hernández–Salazar *et al.* (2013), con algunas modificaciones. El contenido de fenoles totales fue medido por el método Folin Ciocalteu (Zalibera *et al.* 2007). La capacidad antioxidante se midió por los métodos DPPH y FRAP siguiendo la metodología descrita por Sdiri *et al.* (2012) y Firuzi *et al.* (2005), respectivamente. El contenido de los minerales K, Ca, Zn, Cu y Mg fue determinado por el método de absorción atómica descrito por Márquez–Reyes *et al.* (2019).

Resultados: Los valores de fenoles totales de miel de *Persea americana* (Mpa) (291.31 mg eq AG/kg) muestran una mayor disminución significativa (Anova una vía y Tukey) respecto a su valor inicial (1508.53 mgeqAG/kg) comparada con miel de *Citrus sinensis* (MCs) (valor inicial: 277.39, valor final: mgeqAG/kg 165.01 mgeqAG/kg) luego de la digestión *in vitro*. Resultados similares fueron obtenidos para capacidad antioxidante medida por DPPH en ambas mieles Mpa, valor inicial: 1397.10 mgeqT/kg, valor final: 261.31 mgeqT/kg, mientras que el valor inicial de MCs fue de 259.06 mgeqT/kg y su valor final fue de 131.80 mgeqT/kg. Mientras que para FRAP Mpa tuvo una disminución significativa de sus valores (inicialmente 2320.08 mgeqT/kg, valor final: 502.95 mgeqT/kg) los valores no tienen cambios significativos para MCs (275.7 mgeqT/kg). Se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los valores de Ca en Mpa (82.64 mg/kg – 42.74 mg/kg) y un aumento en la concentración de Mg en MCs (54.82 mg/kg – 191.08 mg/kg) al final de la fase duodenal. Los minerales Zn y Mg tuvieron diferencias significativas a través de la digestión *In vitro* en MCs, así como Ca y Cu en Mpa.

Conclusiones: El contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en Mpa fue significativamente mayor en todas las pruebas realizadas con respecto a la MCs después de la digestión *in vitro*; sin embargo, Mpa sufrió un mayor descenso. La alta variabilidad en los valores de minerales obtenidos en otros estudios con distintas mieles coinciden con los encontrados en este estudio, atribuyendo esto a las posibles interacciones de minerales con otros compuestos presentes en la miel, así como su origen botánico y color.

ABSTRACT

Introduction: Honey is a food that contains phenolic compounds, mainly flavonoids but other elements such as minerals and enzymes that can carry out a biological effect due to their antioxidant capacity. Although these compounds are present in honey, little is known about the effect that the digestive process that this food must go through may have on the bioaccessibility of the phenolic and mineral compounds present in it, finely affecting its bioavailability and the biological effect that would be produced.

Aim: The aim of the present study was to evaluate the effect of in vitro simulated digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, potassium, zinc, calcium, copper and magnesium minerals and their antioxidant activity in *Persea americana* and *Citrus sinensis* honeys.

Materials and methods: The samples were subjected to in vitro simulated digestion with the technique described by Hernández-Salazar et al. (2013). Total phenol content was measured by the Folin Ciocalteu method (Zalibera et al. 2007). The antioxidant capacity was measured by the DPPH and FRAP methods following the methodology described by Sdiri et al., (2012) and Firuzi et al., (2005) respectively. The content of minerals K, Ca, Zn, Cu and Mg was determined by the atomic absorption method described by Márquez-Reyes et al. (2019).

Results: The values of total phenols of Mpa (291.31 mgeqAG/kg) show a greater significant decrease with respect to their initial value (1508.53 mgeqAG/kg) compared to MCs (277.39 mgeqAG/kg -165.01 mgeqAG/kg) after in vitro digestion. Similar results were obtained for antioxidant capacity measured by DPPH in both honeys MCS 259.06 mgeqT/kg - 131.80 and Mpa 1397.10 mgeqT/kg - 261.31 mgeqT/kg. While for FRAP Mpa had a significant decrease in its values (2320.08 mgeqT/kg-502.95 mgeqT/kg). A significant decrease in Ca values in Mpa (82.64mg/kg – 42.74mg/kg) and an increase in Mg concentration in MCs (54.82mg/kg – 191.08mg/kg) were observed at the end of the duodenal phase. . The minerals Zn and Mg had significant differences through In vitro digestion in MCs, as well as Ca and Cu in Mpa.

Conclusions: The content of total phenols and antioxidant capacity in MPa was significantly higher in all the tests carried out with respect to MCs after in vitro digestion, however, MPa suffered a greater decrease. The high variability in the values of minerals obtained in other studies with different honeys coincide with those found in this study, attributing this to the possible interactions of minerals with other compounds present in honey, as well as its botanical origin and color.

INTRODUCCIÓN

El estudio de alimentos funcionales ha derivado en importantes hallazgos que justifican la implementación de nuevas estrategias nutricionales, que incluyan alimentos que contengan compuestos bioactivos con la capacidad de exhibir actividades biológicas antioxidantes para incidir en el curso de las enfermedades que mayor incremento han tenido en las últimas décadas.

La miel representa una opción natural de bajo costo que podría aportar un alto contenido de compuestos fenólicos y elementos que por sí mismos pueden exhibir actividad antioxidante; sin embargo, aunque estos componentes pueden estar presentes a distintas concentraciones dependiendo de factores como el origen botánico y la zona geográfica de cada miel particular, poco se sabe del efecto que el proceso digestivo, por el que este alimento debe atravesar, pueda tener sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y minerales presentes en la miel, afectando finamente su biodisponibilidad y el efecto biológico que se produciría una vez consumida (Da Silva *et al.*, 2016).

En México, gracias a la producción agrícola de aguacate, una especie endémica, existe una importante producción de miel de *Persea americana*, pues las abejas *apis mellifera* son las principales polinizadoras de dicho cultivo junto con las moscas y avispas, pero solo las abejas son capaces de producir miel (Pérez-Balam, 2012).

El propósito del presente estudio fue conocer de qué manera afecta la digestión a la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y minerales K, Zn, Ca, Cu y Mg en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana*.

1. ANTECEDENTES

1.1. Definición de miel

El Codex Alimentarius define a la miel como “La sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas, de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias que depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje”. Así, la miel es el resultado de una serie de procesos que comprenden desde la producción inicial del néctar en las plantas, hasta el almacenado y condensación de los solutos que transforman el néctar inicial rico en humedad en la viscosa mezcla final que se conoce comunmente como miel (Codex Alimentarius, 2019; Hermanns *et al.*, 2019).

Las características tanto fisico-químicas como organolépticas de la miel varían en función de una gran variedad de condiciones, entre los que se encuentran tanto factores asociados con la producción, tales como la región geográfica, la temperatura ambiental, el origen botánico de la floración de la cuál es extraído el néctar como materia prima para la elaboración de la miel por parte de las abejas, las condiciones de almacenamiento en panal, temperatura, humedad relativa y operculado, hasta factores post cosecha, como procesos de filtrado, calentamiento, condiciones de almacenamiento como tiempo, temperatura y humedad a la que haya sido expuesta la miel durante esta fase del proceso. Todos estos factores pueden alterar no solo las características organolépticas sino también la composición química de la miel producto de una compleja serie de procesos atenuados o acelerados por las condiciones ambientales a que haya sido sometido el producto (Machado-De Melo *et al.*, 2017).

1.2. México y la miel

Las abejas representan una parte fundamental para la polinización de diversas plantas, este tipo de insectos pertenecen al orden *Hymenoptera*, con más de 20,000 especies alrededor del mundo. En México se pueden encontrar alrededor de 1900 especies, sin embargo, gran parte de esas especies no son productoras de miel. Dentro de las productoras se pueden encontrar *Apis mellifera*, y algunas nativas, tal es el caso de *Tribu Meliponini*, la cual no posee aguijón y son dóciles por naturaleza. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

1.3. Composición química

Existen distintos tipos de miel, cada uno con características no solo fisico-químicas sino organolépticas dependiendo de su origen floral, por lo que no debe hablarse de la miel sino de las mieles. Dichas características se desarrollan a lo largo del proceso de producción por parte de las abejas y se enriquecen con todos los factores implicados mencionados anteriormente; sin embargo, sí que es posible identificar patrones en la composición química que comparten en general todas las mieles sin importar su origen o los diversos factores implicados en su producción, los cuales pueden servir como parámetros para conocer la calidad de la miel, además de que se relacionan con las propiedades funcionales atribuidas al alimento (Otero-Bernolo, 2020).

1.3.1 Humedad

La humedad en la miel es uno de los factores más determinantes en su composición y calidad, esta depende tanto de factores propios de la miel (origen botánico y geográfico) como de los factores ambientales como la humedad, la temperatura ambiental y los procesos postcosecha. Por esto es importante comprender que la humedad en la miel sufre una serie de cambios que contribuyen a su maduración y concentración de azúcares que darán como resultado el producto final, tanto con las características organolépticas propias del alimento, como las características fisicoquímicas que brindan a la miel su capacidad de conservación (Ulloa *et al.* 2010).

El porcentaje de humedad presente en la miel se reduce durante el proceso de producción realizado por las abejas desde que los néctares son libados de la planta, momento en que tiene un alto porcentaje de humedad, pasa por los apéndices adaptados de boca en boca de las abejas hasta ser depositada en las celdas del panal, donde factores como la humedad relativa del ambiente, la temperatura provocada por la luz solar e incluso el viento producido por el movimiento de las alas de las propias abejas reduce su proporción hasta que finalmente es operculada dentro de la celda, momento en el que generalmente alcanza un porcentaje cercano a 18%. Esta cantidad de humedad está relacionada con la actividad del agua (a_w), que determina la cantidad de líquido no ligado a solutos como glucosa y que por tanto es disponible para microorganismos en términos de su reproducción, por lo que una humedad menor, se relaciona a una actividad del agua reducida que supone un impedimento para la reproducción de microorganismos y por ende ayuda a la conservación de la misma, razón por la que el *Codex Alimentarius* establece un límite máximo de humedad de no más del 20%. De esta manera la humedad está estrechamente relacionada con el contenido de azúcares y su concentración (Machado-De Melo *et al.*, 2017; Codex Alimentarius, 2019).

1.3.2 Carbohidratos

En la miel, los carbohidratos provienen de los azúcares producidos por el metabolismo primario de las plantas a través de la fotosíntesis, tomando como sustratos principales la energía solar y CO₂ para sintetizar energía química en forma de carbohidratos para su alimentación y reproducción sexual, esta última relacionada con el néctar que utilizan como cebo para llamar polinizadores que realicen el proceso de polinización y así cumplir su ciclo vital (Solarte *et al.*, 2010). Aunque al inicio el nectar libado por la abeja recolectora tiene poca densidad de azúcares gracias a su alto contenido de humedad, este es llevado a la colmena, en donde, luego de haber sido pasado de un apéndice a otro, a través de varias abejas, es almacenado en las celdas del panal. Las condiciones ambientales como el calor del sol, la humedad relativa del viento y el tiempo de almacenaje reducen el contenido de humedad, concentrando los azúcares y aumentando su viscosidad (Cianciosi *et al.*, 2018).

Los azúcares son la fracción más grande de los componentes sólidos en la miel, cerca del 95%; la fructosa y glucosa representan cerca del 75% de los carbohidratos de su matriz, 39% y 31% respectivamente; los disacáridos como la sacarosa representan entre el 10% y el 15% y una pequeña fracción restante es representada por los azúcares complejos como oligosacáridos (Tabla 1)(Da silva *et al.*, 2017; Bogdanov *et al.*, 2008).

Tabla 1. Constituyentes de los azúcares de la miel (Adaptado de Ulloa et al., 2010).

| Monosacáridos | Disacáridos | Trisacáridos | Sacáridos complejos |
|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|
| Fructosa | Gentibiosa | Centosa | Isomaltopentosa |
| Glucosa | Isomaltosa | Eriosa | Isomaltotetraosa |
| | Maltosa | Isomaltotriosa | |
| | Maltulosa | Isopanosa | |
| | Nigerosa | Laminaritriosa | |
| | Palatinosa | Maltotriosa | |
| | Sacarosa | Melezitosa | |
| | Turalosa | Panosa | |

La fructosa y glucosa, también conocidos como azúcares reductores, debido al carbono libre que presentan en su estructura lo que les permite reaccionar con otros compuestos reduciéndolos, sufren cambios debido a una serie de reacciones bioquímicas llevadas a cabo principalmente por la enzima invertasa que hidroliza enlaces de moléculas más complejas y resintetiza fructosa y glucosa como productos, por lo que el contenido de estos azúcares puede ser un buen indicador para detectar malas prácticas pecuarias, por lo que el límite mínimo aceptado para azúcares reductores en la miel es de 60g/100g (Ulloa *et al.*, 2010; Solares 2014; Geana *et al.*, 2020; Codex Alimentarius, 2019).

Las interacciones en las hexosas y pentosas pueden resultar en productos no deseados como los furanos, principalmente furfural, derivado de las pentosas y 5-hydroxymetilfurfural (5-HMF), derivado de las hexosas como fructosa y glucosa. Dado que el 5-HMF se produce por un proceso de inolización exacerbado por las condiciones térmicas, el sobrecalentamiento en el procesamiento industrial de la miel o el tiempo prolongado de almacenamiento postcosecha aumenta la concentración de este compuesto, por lo que es un

indicador del estado de la miel. Por esto mismo el *Codex Alimentarius* establece un límite máximo de 40mg/kg y hasta 80mg/kg en países cuyo clima sea considerado tropical (Codex Alimentarius, 2019; Da Silva *et al.*, 2016)

Aunque anteriormente se consideraba al 5-HMF como un compuesto indeseable presente en los alimentos, generalmente como producto de la reacción de pardeamiento no enzimático de *Maillard*, debido a sus efectos mutágenos, genotóxicos, organotóxicos e inhibidores de enzimas, recientemente se ha encontrado que este se convierte en un compuesto no excretable conocido como 5-sulfoximetilfurfural, el cual exhibe propiedades antioxidantes, antialérgica, efectos antiinflamatorios, anti-hipóxicos, anti-falciformes y anti-hiperuricémicos (Shapla *et al.*, 2018).

1.3.3 Aminoácidos

La mayor parte del nitrógeno presente en la miel proviene de proteínas, enzimas y aminoácidos, aunque su aporte a la matriz nutricional es casi nulo y su concentración es baja, llegando a representar de 0.1% a 3.3% dependiendo del tipo de miel y especie de abeja; los aminoácidos libres son la fracción más abundante entre los compuestos nitrogenados de la miel (Won *et al.*, 2009).

El origen de estos compuestos es atribuido en parte a las secreciones salivares y faríngeas de las abejas; sin embargo, la principal fuente de proteínas y aminoácidos libres en la miel es el polen. Así, estos pueden variar en su concentración dependiendo del origen botánico; cada planta tendrá distintas cantidades de aminoácidos dependiendo de su género y por ende las mieles monoflorales compartirán una concentración similar de aminoácidos, incluso una alimentación monofloral prolongada podría ser deficiente en algún aminoácido esencial específico y esto podría comprometer el estado nutricional de las abejas,

condicionando así el óptimo de la colmena (Bonoan *et al.*, 2019; Da Silva *et al.* 2016).

En general, todas las mieles presentarán cantidades significativas de aminoácidos como: prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, histidina, glicina, treonina, alanina, arginina, alanina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, triptófano, fenilalanina, ornitina, lisina, serina, asparagina y otros, siendo la prolina el aminoácido más abundante en la miel en general, gracias a esto, su cuantificación puede ser un indicador de adulteración de la miel con edulcorantes de menor calidad, por ello su valor debe ser al menos de 180 mg/kg (Kowalski *et al.*, 2017; Bogdanov, 1999).

Otra característica importante de los aminoácidos presentes en la miel, como lisina, prolina, arginina y ácido butírico, es que pueden reaccionar debido a su grupo carboxilo con los azúcares reductores, principalmente cuando son sobre calentados en el procesamiento industrial o cuando son almacenados a altas temperaturas por un largo periodo de tiempo, produciendo la reacción de *Maillard* y luego formación de compuestos de Amadori, entre los cuáles se encuentran las melanoidinas, que pueden alterar las cualidades organolépticas de la miel, por ejemplo oscureciendo su color (Iglesias *et al.*, 2006).

1.3.4. Enzimas

Dentro de los compuestos nitrogenados, una pequeña fracción es representada por las enzimas, en las mieles se encuentran distintas; sin embargo, diastasa, glucosa oxidasa e invertasa son las más reelevantes, pues interaccionan en niveles importantes con otros compuestos presentes en la miel, provocando cambios en sus concentraciones y actividades específicas. Algunas enzimas provienen de secreciones propias de las abejas, como la invertasa y glucosa oxidasa, otras como catalasa y ácido fosfatasa provienen del néctar de

las plantas, mientras que algunas otras podrían ser productos del metabolismo de microorganismos relacionados con las plantas o insectos colectores de miel (Ulloa *et al.*, 2010; Machado-De Melo *et al.*, 2010)

La invertasa es la enzima que es considerada responsable de la enorme complejidad de los azúcares presentes en la miel, debido a que su acción cataliza la conversión de sacarosa en glucosa y fructosa, los azúcares reductores principales de la miel. Por su parte, la diastasa hidroliza los enlaces 1-4 de los azúcares complejos, produciendo dextrinas, y formando finalmente maltosa, que puede ser hidrolizada finalmente en moléculas simples de glucosa por la acción de la enzima maltasa. Otras enzimas presentes son la glucosa oxidasa, que produce peróxido de hidrógeno, responsable de la mayor parte de la actividad antibacteriana de la miel, la catalasa, que aporta actividad antioxidante, entre otras. Debido a su carácter termolábil, las enzimas pierden su actividad cuando son expuestas a temperaturas mayores de 60 °C, o cuando son almacenadas por largos periodos de tiempo, por lo que pueden ser un útil indicador de la calidad de la miel indicando sobrecalentamiento o un largo periodo de tiempo de almacenado. Adicionalmente, la diastasa que proviene generalmente de las secreciones salivales de las abejas pero que está correlacionada con el origen geográfico de la miel también puede ser un indicador de adición de azúcares de baja calidad o de un largo tiempo de alimentación artificial con sacarosa a las colmenas, práctica que se lleva a cabo comúnmente en periodos donde no hay floración. Además, abejas más jóvenes o muy viejas también pueden producir miel con baja actividad de diastasa, por lo que el *Codex Alimentarius* establece un límite mínimo de actividad de la diastasa de 8.00 Göthe (Rybak-Chmielewska 2003; Ulloa *et al.*, 2010; Codex Alimentarius, 2019; Guler *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2016).

1.3.5. Ácidos orgánicos

Los ácidos son resultado del metabolismo enzimático de algunos azúcares, y son responsables del pH ácido característico de la miel, el cual va generalmente de 3.5 a 5, que, sumado al producto como el peróxido de hidrógeno, suponen una barrera limitante para el crecimiento de microorganismos. Aunque también ácidos volátiles pueden estar presentes cuando la humedad supera niveles deseables y la fermentación ocurre (Da Silva, *et al.*, 2016).

Se han identificado distintos ácidos orgánicos presentes en la miel, incluso más de 165, tales como ácido aspártico, butírico, cítrico, acético, fórmico, fumárico, galacturónico, glucónico, glutámico, glutárico, butírico, glioxílico, 2-hidroxi-butírico, α -hidroxiglutarico, isocítrico, α -cetoglutarico, láctico, málico, malónico, metilmalónico, 2-oxopentanoico, propiónico, pirúvico, quínico, shikímico, succínico, tarárico, oxálico y otros, y aunque sus concentraciones pueden variar mínimamente, la composición de los mismos es similar en distintas mieles, siendo el ácido glucorónico el que se encuentra presente en mayor cantidad, el cual es originado por una reacción enzimática llevada a cabo por la glucosa oxidasa utilizando como sustrato glucosa. (An *et al.*, 2020; Da Silva *et al.*, 2016).

1.3.6. Vitaminas y minerales

Si bien las cantidades de vitaminas y minerales en la miel relacionadas a la ingesta diaria recomendada son prácticamente insignificantes, estas llevan a cabo papeles interesantes como cofactores en las interacciones bioquímicas que se generan entre los componentes de la miel y son parcialmente responsables de sus efectos biológicos. Aunque el contenido de estos compuestos puede variar dependiendo del tipo de miel, se pueden identificar ciertas vitaminas que

están presentes en la mayoría de mieles, como tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8) y ácido fólico (B9); así como vitamina C, las cuáles se preservan debido al bajo pH característico de la miel. Estas vitaminas provienen principalmente del polen. Por su parte, los minerales presentes en la miel pueden variar ampliamente en su concentración en función del origen botánico de la misma, siendo las mieles más oscuras las que presentan concentraciones hasta 5 veces más altas; el potasio es el mineral más presente en la miel; sin embargo, se pueden encontrar otros, tales como magnesio, calcio, hierro, fósforo, sodio, manganeso, yodo, zinc, litio, cobalto, níquel, cadmio, cobre, bario, cromo, selenio, arsénico y plata. Estos provienen de las plantas, las cuales los sustraen del suelo, por lo que la calidad de elementos en la tierra va a determinar la concentración de estos mismos en la miel (Da Silva *et al.*, 2016; Ulloa *et al.*, 2010)

Una característica importante de los minerales es su capacidad de fungir como conductores de electricidad, y debido a que estos elementos son prácticamente indestructibles, medir la conductividad eléctrica de la miel puede brindar información sobre la concentración de minerales en la misma, lo que puede servir como otro indicador útil para conocer la calidad de la miel y prevenir adulteraciones. Aunque el valor nutrimental del aporte de estos minerales en la miel es casi nulo, forman parte elemental de enzimas que tienen importantes actividades biológicas, por lo que su presencia en el alimento se vuelve sumamente importante. Por esto mismo el rango de conductividad eléctrica en la miel es de 0.60 y 2.17 mS/cm (milisiemens/centímetro) (Ulloa *et al.*, 2010; Pohl *et al.*, 2012).

1.3.7. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas, biosintetizados a través de rutas metabólicas como la del ácido shikímico

o la del acetato-malonato. Estos son aportados al néctar por medio de las plantas y finalmente concentrados en la miel. Debido a que no todos los compuestos fenólicos se encuentran uniformemente distribuidos, es decir, distintas especies de plantas y de distintas regiones geográficas pueden contener distintas concentraciones de compuestos fenólicos, el contenido de estos en la miel puede variar de acuerdo a su origen botánico, razón por la que también pueden ser utilizados como indicadores de autenticidad (Martín, 2018).

Los compuestos fenólicos pueden ser subdivididos en flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas y chalconas) y ácidos fenólicos; en la miel, los más representativos son los flavonoides, que incluyen a los flavonoles, flavones y flavanoles, pero también se encuentran los ácidos fenólicos, como ácidos benzoicos, ácidos fenilacético e hidroxicinámico. A continuación se muestra una tabla de los ácidos fenólicos y flavonoides más comunes en la miel (Tabla 2) (Álvarez-Suárez *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2016).

Tabla 2. Ácidos fenólicos y flavonoides comunes en la miel (Adaptado de Álvarez-Suárez et al., 2013).

| Ácido fenólico | Flavonoides |
|------------------------------|---------------------------|
| Ácido 4-dimetilaminobenzoico | Apigenina |
| Ácido cafeico | Genisteína |
| Ácido p-cumárico | Pinocembrina |
| Ácido gálico | Tricetina |
| Ácido valínico | Crisina |
| Ácido siríngico | Luteolina |
| Ácido clorogénico | Quercetina |
| | Quercetina 3-metil eter |
| | Quercetina diglucósida |
| | Quercetina-3-O-rutinosida |
| | Quercetina-3-ramnósido |
| | Kaempferol |
| | Kaempferol-8-OMe |
| | Kaempferol-3-OMe |
| | Kaempferol-7-O-ramnósido |
| | Kaempferol-3-O-glicosilo |
| | Kaempferol-7-O-glicosilo |
| | Galangina |
| | Pinobanksina |
| | Miricetina |
| | Miricetina 3-OMe |
| | Miricetina 3,7,4',5'-OMe |

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilos los cuales pueden variar hasta formar estructuras

muy complejas y de gran peso molecular. Los ácidos fenólicos (hidroxibenzóico e hidroxicinámico) tienen la capacidad de regular la acción de radicales libres eliminándolos y previniendo la oxidación de los lípidos, los ácidos hidroxibenzóicos tienen una estructura C1-C6, estos pueden encontrarse en el interior de las células ligados a azúcares o ácidos orgánicos o a ligninas. Por su parte, los ácidos hidroxicinámicos tienen una estructura C3-C6 y los flavonoides C6-C3-C6 (figura 1) (Da Silva *et al.*, 2016).

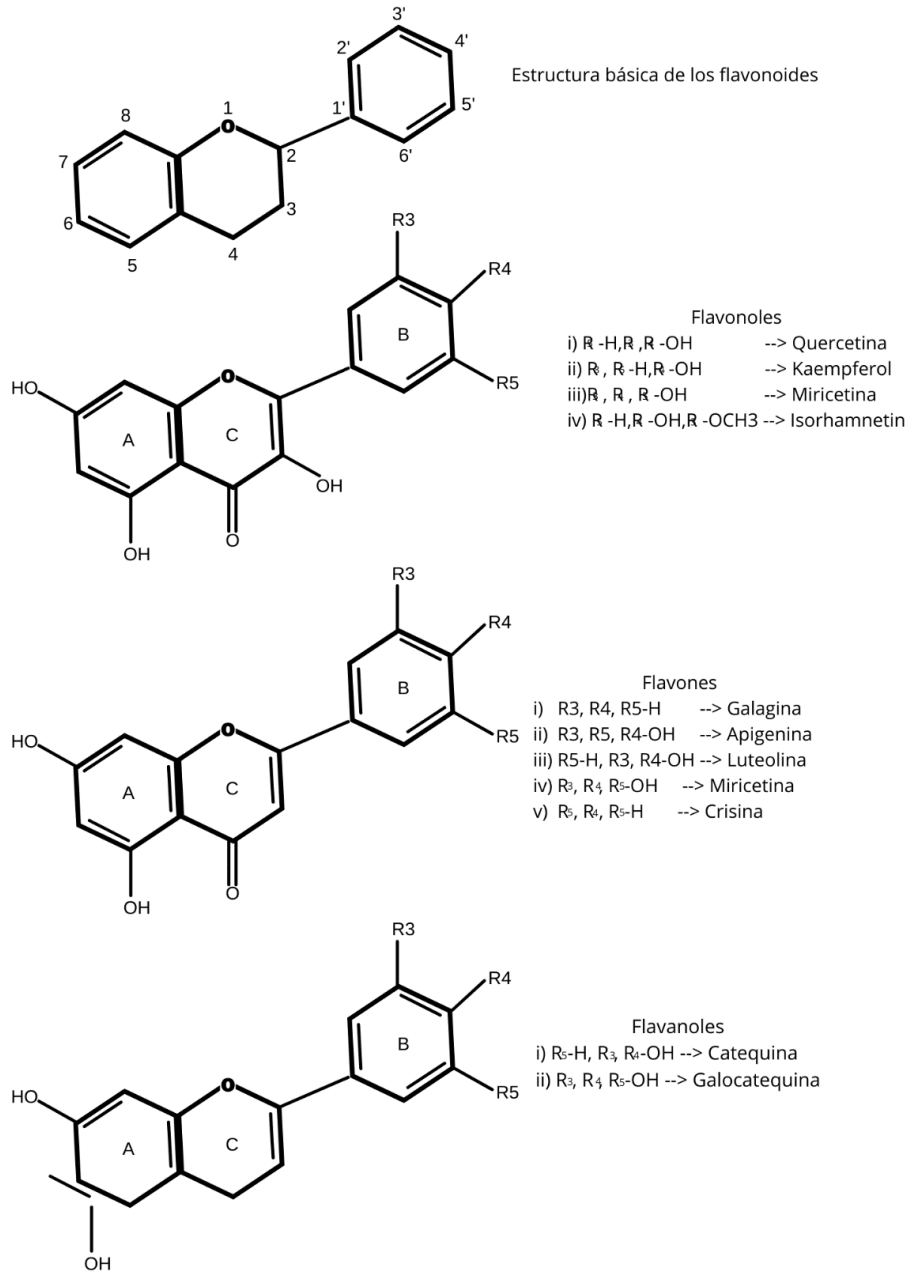


Figura 1. Estructura de los flavonoides más comunes en la miel (adaptado de Álvarez-Suárez et al., 2013).

1.4. Los compuestos fenólicos y sus efectos en la salud

En el desarrollo de las enfermedades crónicas, la inflamación es la clave que permite entender la conexión entre patologías como el cáncer, la diabetes, enfermedad cardiovascular y enfermedades neurodegenerativas. Ahora se sabe que el estrés oxidativo juega un papel determinante en el desarrollo de estas enfermedades como causante de inflamación y posterior desregulación sistémica, que puede estar estrechamente correlacionada con la etiología de las enfermedades no transmisibles. Es esta la razón del auge que ha tomado la investigación de nuevos alimentos funcionales que contengan compuestos con actividad biológica capaces de combatir los efectos producidos por los radicales libres como especies reactivas de oxígeno (ERO's) y especies reactivas de nitrógeno (ERN's), causantes del desbalance que da inicio al proceso desregulador del complejo sistema encargado de mantener el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes. En este sentido la miel ha cobrado gran importancia gracias a investigaciones que han permitido demostrar sus efectos, generalmente atribuidos a su contenido de compuestos fenólicos, pero también de otros componentes interesantes con actividad biológica como componentes de enzimas y algunos minerales (Ranneh *et al.*, 2021).

Los flavonoides representan cerca del 50% de todos los compuestos fenólicos presentes en la miel, debido a esto y su capacidad de reducir la formación de radicales libres, principalmente especies reactivas de oxígeno, son los compuestos más ampliamente estudiados y considerados como los responsables de la mayor parte de la actividad biológica de la miel como alimento funcional (Da Silva *et al.*, 2016; Farag *et al.*, 2020).

1.4.1 Estrés oxidativo e inflamación

El estrés oxidativo se caracteriza por la pérdida del equilibrio entre óxido-reducción que mantiene un estado de homeostasis entre la producción y eliminación de radicales libres principalmente ERO's, pero también ERN's,

producidas en su mayoría por las mitocondrias, los cuales tienen un electrón desapareado, lo que da inestabilidad a estas moléculas y las hace altamente reactivas, pudiendo dañar a otras moléculas contiguas, conocido como daño oxidativo, que induce en las células daño por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos. Este daño a nivel celular activa procesos inflamatorios que, aunque en inicio son parte de la respuesta innata del sistema inmune, su activación prolongada provoca daños a niveles sistémicos que se han relacionado positivamente con enfermedades como cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedad neurodegenerativa y cardiovascular (Dorado *et al.*, 2003).

1.4.2 Capacidad antioxidante

Los antioxidantes han tomado un gran auge recientemente debido a resultados interesantes en estudios realizados que demuestran su capacidad tanto para disminuir la producción de radicales libres como para inhibir la oxidación y de este modo prevenir enfermedades, por la reducción directa de los radicales, que consiste en la capacidad de estos compuestos por donar un átomo de hidrógeno o por el aumento en la producción de enzimas con capacidad antioxidante (Niki, 2011).

La capacidad antioxidante de la miel se correlaciona positivamente con su contenido de compuestos fenólicos, el cuál también se relaciona con la tonalidad del color específico de cada miel, determinado por su origen botánico, siendo dichos compuestos los responsables de la capacidad de reducir a los radicales libres y exhibir el efecto antioxidante (Velázquez *et al.*, 2020; Smetanska *et al.*, 2020; Maric *et al.*, 2021). En 2020, Zhu *et al.*, encontraron una significativa correlación entre el contenido de minerales y compuestos fenólicos de la miel de *Amorpha fruticosa L.*, *A. fruticosa* (miel AFH) y su capacidad para reducir los radicales libres, evaluado mediante el método poder antioxidante reductor férrico

(FRAP) y DPPH, demostrando en un modelo celular que la miel AFH exhibe un efecto protector sobre el ADN del plásmido pBR322 y el daño de linfocitos de ratón del estrés oxidativo. Por su parte, Goslinski *et al.* (2019), reportaron que la miel de mielada (honeydew) tenía concentraciones de compuestos fenólicos similares a la miel de manuka (MH), y estos se correlacionaron positivamente a su capacidad antioxidante, siendo esta más alta que otras mieles con un contenido menor de compuestos fenólicos, como multifloral y de Linden. Sin embargo, la capacidad antioxidante de la miel puede verse comprometida por diversos factores, por ejemplo el procesamiento térmico. En 2021, Braghini *et al.*, encontraron que el procesamiento térmico mayor a 71°C por 0.24 min redujo significativamente la capacidad antioxidante de la miel por el método reactivo Folin-Ciocalteu (FCR), en los métodos FRAP y DPPH la reducción de la capacidad antioxidante se observó en procesos terminos de 52°C/ 470 min, 55 °C/170 min, and 57 °C/60 min. En 2020, Cianciosi *et al.*, observaron en la miel MH, que la digestión gástrica *in vitro* redujo significativamente el contenido de polifenoles y flavonoides totales, lo que redujo su capacidad antioxidante y los efectos anticancerígenos en comparación con las muestras no digeridas (Crudas). Resultados similares fueron observados en el ensayo de Simonetti *et al.* (2020), en el que analizaron la capacidad antioxidante de distintas mezclas de miel y queso, con el objetivo de evaluar el efecto de la digestión *in vitro* sobre la capacidad antioxidante de dichas muestras; los resultados demostraron que la digestión *in vitro* reduce significativamente la capacidad antioxidante de las muestras de miel y queso, añadiendo que la mezcla de miel y queso mostró una menor reducción de la capacidad antioxidante versus la muestra de solo queso. Seraglio *et al.*, 2021 concluye que la capacidad antioxidante de la miel puede diferir hasta en un 80% entre muestras de miel cruda y miel sometida a digestión gástrica, lo que supone un aspecto determinante para alcanzar las actividades biológicas descritas de los componentes activos en la miel.

1.4.3 Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular es un término que engloba a una serie de condiciones patológicas del corazón y los vasos sanguíneos. Los mecanismos explicativos propuestos hasta el momento incluyen aterosclerosis, caracterizada por la desregulación del perfil lipídico en sangre y consecuente acumulación de esto en la íntima del endotelio, pero también estrés oxidativo como agente de daño endotelial (Roche *et al.*, 2009). Esto puede desembocar en manifestaciones como cardiopatía coronaria, que consiste en la acumulación de placa en las arterias principales del corazón; insuficiencia cardíaca, que ocurre cuando el músculo del corazón se debilita y pierde su capacidad de contraerse eficientemente; arritmias, condición originada por una desregulación del sistema eléctrico que controla la frecuencia cardíaca, provocando latidos más rápidos, más lentos o arrítmicos; enfermedades de las válvulas cardíacas, que ocurren cuando una o más válvulas no realizan correctamente su apertura o cierre y permiten el flujo de sangre en la dirección incorrecta, condición conocida como regurgitación, arteriopatía periférica, que ocurre por la acumulación de placa en las arterias de piernas y pies, ocasionando daño degenerativo de los tejidos en extremidades; hipertensión arterial sistémica (HAS), identificada por el aumento de la presión que ejerce el volumen sanguíneo sobre las paredes del endotelio; accidente cerebrovascular, causado por la falta de flujo sanguíneo al cerebro por obstrucción o sangrado interno y también cardiopatía congénita, caracterizada por el mal funcionamiento o problema con la estructura del corazón presente desde el nacimiento (Goldman, 2020).

La cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular encabezan la lista de las 10 enfermedades que más muertes causaron en 2019 según la OMS, lo que permite identificar a la enfermedad cardiovascular como una alarma para el sistema sanitario y la más importante enfermedad no transmisible en la actualidad (OMS, 2020). Si bien la causa de una enfermedad crónica como la enfermedad cardiovascular es muy difícil de determinar con exactitud, se han

podido identificar factores de riesgo asociados a su aparición y desarrollo, tales como obesidad, hipercolesterolemia, resistencia a la insulina y tabaquismo; sin embargo, recientemente se ha dilucidado el importante papel que tiene como contribuyente al desarrollo de la enfermedad el estrés oxidativo, razón por la que la actividad antioxidante de alimentos como la miel, toma gran relevancia en la enfermedad cardiovascular (Bustos *et al.*, 2003).

Es importante resaltar que los factores asociados a la enfermedad cardiovascular se pueden dividir en dos grupos, entre los que se encuentran factores modificables y no modificables (figura 2). Entre los no modificables se encuentran edad, género, etnia y antecedentes heredofamiliares; entre los modificables se encuentran hipertensión, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, obesidad, y resistencia a la insulina (diabetes), pero es necesario notar que los factores modificables están asociados a estrés oxidativo e inflamación (Farooqui & Farooqui, 2011).

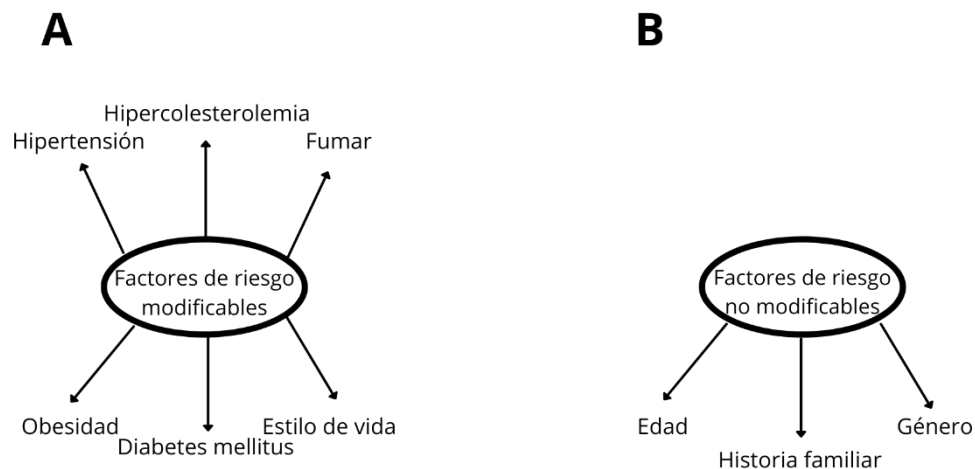


Figura 2. Factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular: A) modificables y B) no modificables.

Los efectos protectores del consumo de miel en la enfermedad cardiovascular son atribuidos en su mayoría a los compuestos fenólicos que contiene, éstos efectos se pueden identificar de la siguiente manera: A) efecto

antioxidante – reducción del estrés oxidativo, B) inhibición de la agregación plaquetaria, C) reducción de la presión sanguínea, D) mejora de la función endotelial, E) reducir la respuesta inflamatoria, F) aumentar la dilatación coronaria y G) reducir la oxidación de lipoproteínas LDL, aunque también se han descrito otros (figura 3) (Hossen *et al.*, 2017).

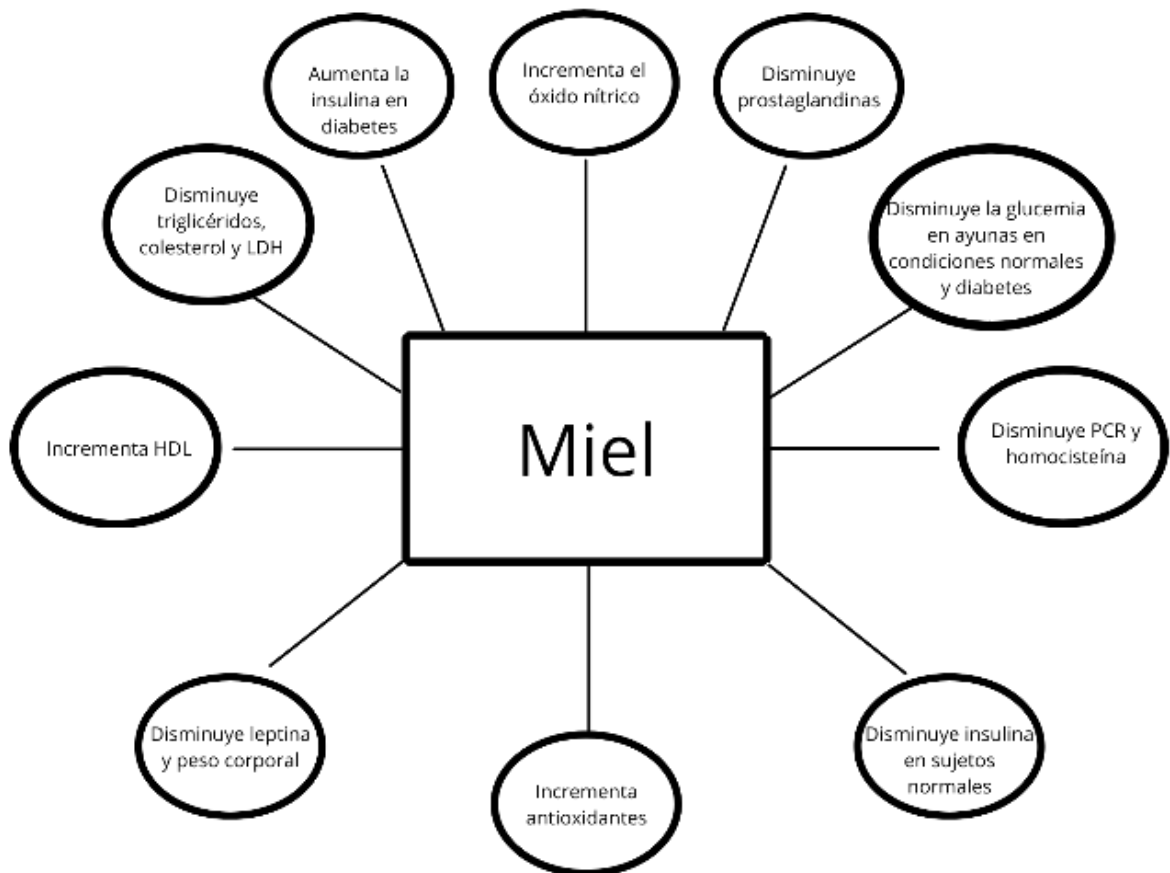


Figura 3. Efectos cardioprotectores del consumo de miel (adaptado de Al-Waili *et al.*, 2013).

Se ha comprobado que los flavonoides exhiben un efecto protector en la enfermedad cardiovascular importante. Existe una relación inversa entre el consumo de flavonas y riesgo de accidente cerebrovascular y entre el consumo de flavonoles y riesgo de diabetes mellitus tipo 2, también entre el consumo de antocianidinas y riesgo de infarto de miocardio. Además, los flavonoides como las catequinas y las quercitinas presentes en la miel también imparten un efecto

reductor de la presión arterial, aumentando la disponibilidad de óxido nítrico, reduciendo el estrés oxidativo en las células endoteliales evitando el daño por oxidación, mejorando la función endotelial y modulando la vasodilatación vía canales iónicos K^+ y Ca^{2+} (figura 4) (Malaaki *et al.*, 2019).

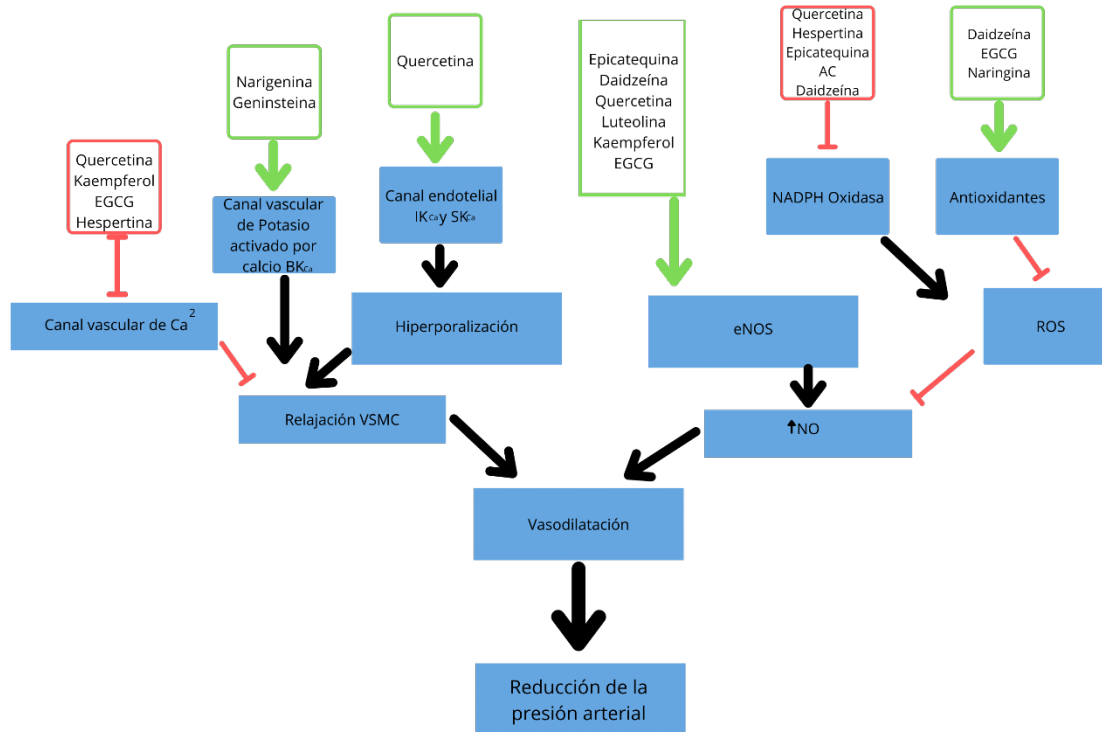


Figura 4. Mecanismos de regulación de la presión mediados por flavonoides (adaptado de Malaaki *et al.*, 2019).

Gutierrez-Venegas *et al.* (2014) observaron que los flavonoides exhiben un potente efecto antiinflamatorio mediando la fosforilación de MAPK, una proteína activada por mitógeno perteneciente al grupo de receptores/señalizadores extracelulares que inducen la respuesta inflamatoria, en ratas tratadas con ácido lipoteicoico, para inducir la producción de óxido nítrico promoviendo una respuesta inflamatoria en el miocardio. Los flavonoides inhibieron la expresión de óxido nítrico, y además bloquearon la activación de otros receptores pro inflamatorios (ERK, JNK y p38), regulando así la respuesta

inflamatoria y exhibiendo importantes efectos antiinflamatorios y cardioprotectores (Gutiérrez-Venegas *et al.*, 2014). Por su parte, Guerrero *et al.* (2005) demostraron en un modelo *in vitro* que flavonoides presentes en la miel, como apigenina, quercitina, luteolina y catequina, inhibieron la agregación plaquetaria, uniéndose al receptor de tromboxanos A2, el mismo mecanismo de acción descrito para la aspirina (ácido acetilsalisílico). Mas recientemente, Martina, *et al.* (2019) demostraron la acción antiagregante plaquetaria de la miel comparada incluso contra la aspirina, el antiagregante plaquetario más conocido. El objetivo fue probar los efecto antiplaquetarios de la miel y compararlos con los de la aspirina en función del tiempo de sangrado en ratones. Los flavonoides presentes en la miel, como la hesperetina, han sido estudiados por sus potenciales efectos antiplaquetarios (Ahmed *et al.*, 2011; Bojić *et al.*, 2011); sin embargo, en este estudio se pudieron demostrar resultados significativos entre el grupo control y los grupos miel y aspirina , no habiendo encontrado diferencias significativas entre el grupo miel y aspirina, comprobando que la miel tiene un efecto antiplaquetario similar al de la aspirina, exhibiendo su potencial uso para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares. Finalmente, Ab Wahab *et al.* (2018) llevaron a cabo un estudio en 2018, en el que sometieron a un total de 100 mujeres postmenopáusicas a las que trataron con dos diferentes tipos de miel, encontrando que la miel de Tualang fue efectiva para reducir la presión diastólica y la glucemia en ayuno.

1.4.4. Cáncer

La actividad anti cancerígena de los compestos fenólicos presentes en la miel se ha organizado en: A) actividad antioxidante, B) actividad antiinflamatoria, C) Regulación de P53, E) detención del ciclo celular, F) actividad inmunomoduladora, G) actividad antimutagénica, H) modulación de estrógenos, I) inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y J) modulación del factor de necrosis tumoral (TNF) (Otero-Bernolo, 2020). Sin embargo, los efectos del consumo de

miel son interesantes, no solo por la prevención de los mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer, sino por sus efectos coadyuvantes al tratamiento farmacológico y quimoterapéutico, ayudando a mejorar las condiciones del paciente relacionadas a la reducción de los efectos secundarios del tratamiento, principalmente la mucositis (Badolato *et al.*, 2017).

De todos los flavonoides presentes en la miel, el kaempferol, la catequina, quercitina y ácidos fenólicos como caféico y gálico son los que han sido demostrados como los más importantes compuestos fenólicos presentes en la miel con actividad anticancerígena, por su acción antioxidante, apoptótica, inhibición de TNF, antiproliferativa, inmunomoduladora, antiestrogénica y antiinflamatoria (Figura 5) (Waheed *et al.*, 2019).



Figura 5. Potenciales mecanismos anticáncer de la miel (Adaptado de Waheed *et al.*, 2019).

La inflamación juega un papel importante en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, este proceso mediado por las citocinas proinflamatorias entre las cuales una de las más notorias es la interleucina 6 (IL-6), esta ha sido descrita como uno de los principales factores desencadenantes del proceso inflamatorio y también de la progresión de tumores malignos (Taniguchi & Karin, 2014). Aryappalli *et al.* (2019) demostraron que los flavonoides de la miel de manuka, principalmente luteolina, quercitina, galangina y crisina inhiben de manera eficiente al transductor de señal fosforilada en tirosina y activador de transcripción 3 (P-STAT3) en células de cáncer de mama y pulmón. P-STAT3 es un factor de transcripción que ha sido encontrado de manera constitutiva en cerca del 50% de células de cáncer de mama y pulmón y se considera responsable del aumento de expresión de genes involucrados en la proliferación, supervivencia, angiogénesis, migración, invasión y metástasis de células cancerosas (Rocavec *et al.*, 2014).

Los flavonoides luteolina, quercitina, galangina y crisina presentes en la miel, demostraron inhibir la fosforilación de P-STAT3 uniéndose al receptor de IL-6 en más o menos un 60%, desactivando la vía de activación de P-STAT3, activada por la unión de IL-6 al receptor, que forma un heterodímero con el receptor gp130, que activa las cinasas JAK1 y JAK2, las cuales fosforilan al factor de transcripción P-STAT3. Además, el tratamiento con miel de manuka se asoció a niveles más bajos de gp130, JAK1 y JAK2, mostrando un efecto dependiente de dosis, comprobando así que los flavonoides presentes en la miel tienen un potencial efecto anticancerígeno vía la inhibición de la IL-6 por la unión a su receptor y la inhibición a distintos niveles de P-STAT3 (Aryappalli *et al.*, 2019).

Almeer *et al.* (2018) encontraron que dos distintos tipos de miel cruda exhiben un efecto anticancerígeno vía la regulación de matrixinas (MMP's), cuya expresión se encuentra aumentada en carcinomas, y de inhibidores de metaloproteinasas en tejido (TIMP's), evaluando la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 luego de 6, 24 y 48 horas, encontrando que luego

de 48 horas, el tratamiento con miel silvestre cruda redujo hasta en un 91% la viabilidad de las células cancerosas. Además, Takruri *et al.* (2017) sometieron a tratamiento con 50 g/kg dieta *ad libidum* durante 50 días a ratas a las que se les indujo cáncer de mama utilizando 7,12-dimetilbenzatraceno (DMBA), versus un grupo control al que también se le indujo cáncer de mama y compartieron la misma dieta pero sin tratamiento con miel. Posteriormente se analizaron las muestras histopatológicas de los tejidos de las mamas en las ratas sacrificadas y se observó que el grupo tratado con miel tuvo una incidencia significativamente reducida de células de cáncer de mama, demostrando que la miel multiflorar tiene un efecto anticancerígeno en el inicio, progresión y desarrollo del cáncer de mama inducido vía DMBA en ratas Sprague Dawley. Un estudio más reciente llevado a cabo por Celebioglu (2020) demostró que la miel también puede generar sinergia con algunos probióticos aumentando su potencial citotóxico contra células de cáncer, en este estudio *in vitro* se probaron los efectos probióticos de la miel de castaño sobre cepas de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, observando que esta permitió una mayor tasa de crecimiento; posteriormente los efectos citotóxicos de la mezcla de miel de castaño y ambas cepas fueron probados en células de cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer colorrectal (Caco-2), junto a células de mama no cancerosas (MCF-10A). Los resultados permitieron observar que los probióticos cultivados en miel de castaño tienen un mayor efecto citotóxico sobre células cancerosas que la miel de castaño o los probióticos por separado.

El efecto citotóxico de la miel también ha sido analizado en células de cáncer colorrectal. Afrin *et al.* (2017) evaluaron el contenido de flavonoides y ácidos benzoicos en distintos tipos de miel, encontrando que la miel de madroño de Berchidda presentó las concentraciones más altas, por lo que se comparó su efecto citotóxico en células de cáncer colorrectal (HCT-116) y LoVo contra la miel de manuka (MH) debido a que ésta última reportó las concentraciones más bajas. Los resultados demostraron que, si bien ambas mieles exhibieron efectos citotóxicos *in vitro* contra las células HCT-116 y LoVo aumentando las

concentraciones intracelulares de ROS, inhibiendo su crecimiento e induciendo apoptosis, sin generar toxicidad a células no cancerosas, la miel de madroño tiene un mayor efecto citotóxico a menores concentraciones sobre dichas células comparada con la miel MH, demostrando la relación entre el contenido de compuestos fenólicos y sus efectos anticancerígenos. En la segunda parte del estudio publicado en 2019, la miel de madroño demostró inducir la producción de EROs y disminuir las defensas antioxidantes en células HCT-116 y LoVo por la vía de la inactivación de Nrf2-ARE y NF- κ B, además inhibió la invasión y metástasis en dichas células (Afrín *et al.*, 2019). La miel de manuka (MH) también ha sido estudiada por sus potenciales efectos citotóxicos en células cancerosas; por ejemplo, Cianciosi *et al.* (2020a) demostraron que la miel de manuka induce la apoptosis en células madre cancerosas colorrectales, similares a las esferoides, induciendo la producción de Ros. Sin embargo, en un trabajo posterior del mismo año, observaron que el efecto de la digestión *in vitro* reduce los efectos citotóxicos de la miel MH en comparación con la miel no digerida (cruda) (Cianciosi *et al.*, 2020b). En concordancia con esto, previamente Afrin *et al.* (2017) observaron que la miel de manuka induce apoptosis en células de cáncer de colon, pero además exhibe un importante efecto sinérgico quimiopreventivo con el 5-fluorouracilo (5-FU), mejorando la apoptosis inducida por el 5-FU, el estrés oxidativo en las células de cáncer de colon e inhibiendo la metástasis por la inactivación de factores de transcripción MMP-2 y MMP-9; efecto que no se vio en un grupo control tratado con una mezcla solamente de azúcares reductores a concentraciones idénticas a las de la miel, demostrando que la miel MH es un buen coadyuvante al tratamiento farmacológico del cáncer de colon por la actividad biológica de los compuestos fenólicos que contiene.

Ahora bien, la epigenética es la rama de la ciencia que estudia los cambios estructurales de la cromatina, alterando la dinámica de la expresión de los genes contenidos en dicha macroestructura (Martínez-López *et al.*, 2013). Los nuevos enfoques brindados por nuevas ciencias como la epigenética han permitido observar los efectos positivos que pueden tener los compuestos bioactivos de la

dieta, como los flavonoides presentes en la miel sobre mecanismos determinantes en el desarrollo y progresión del cáncer. Por ejemplo, la quercitina ha demostrado tener importantes efectos reguladores de la cromatina con potencial anticancerígeno, como producir la desmetilación del gen CDKN2A, que reduce en un 40% el crecimiento de células de cáncer colorrectal RKO; en células de cáncer de próstata, la quercitina también redujo el crecimiento en hasta 70% por la desmetilación de genes del receptor de estrógenos- β (ER- β), CDKN2A y RASSF1A (Russo & Ungaro, 2019). Kedhari, *et al.* (2019) Reportaron que la quercitina es capaz de reducir la metilación global del ADN por la inhibición de las metiltransferasas de DNA (DNMT's), desacetilasas de histonas (HDAC's), metiltransferasas de histonas (HMT's), permitiendo así la expresión de genes implicados en la apoptosis en células de cáncer cervical. El kaempferol, también ha demostrado tener actividad epigenética, regulando la actividad de las HDAC's, y provocando la desmetilación de DACT2, un conocido supresor de tumores, permitiendo el aumento en su expresión en células de distintos tipos de cáncer. La luteolina demostró tener un importante efecto inhibitorio de la DNMT, enzima generalmente sobreexpresada en distintos tipos de cáncer como de mama, colorrectal y gástrico, entre otros, suprimiendo su actividad hasta en un 70% (Khan, *et al.*, 2020).

1.4.5 Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por niveles anormalmente altos de glucosa en sangre, asociados a una falta de producción o de actividad de la insulina (OPS, 2019). Aunque la miel es un alimento rico en carbohidratos, puede tener efectos positivos dependientes de dosis en personas con diabetes mellitus tipo 2, reduciendo el índice glicémico, mejorando la actividad de la insulina y reduciendo la resistencia a la misma (IR), sobre todo en combinación con los medicamentos antidiabéticos convencionales como metformina, tanto por su contenido en flavonoides, que pueden exhibir un efecto

funcional importante en el desarrollo de la patología, como por su alto contenido en fructosa, que produce un vaciamiento gástrico más lento y reduciendo la absorción a nivel intestinal (Álvarez-Suarez *et al.*, 2013; Otero & Bernolo, 2020; Ullah *et al.*, 2020).

La epigallocatequina es capaz de inducir efectos protectores contra la diabetes, mejorando la sensibilidad a la insulina, a través de la inhibición de HDAC's y HDAC2, en los reguladores de células T (Treg) y reduciendo la concentración nuclear de factor potenciador-de-cadena-ligera-Kappa de células B activadas (NF-κB) disminuyendo el estrés oxidativo y la inflamación en las células pancreáticas. Así mismo la quercitina, ácidos gálico y caféico, demostraron tener efectos reguladores positivos sobre mecanismos epigenéticos relacionados con la diabetes y sus complicaciones, disminuyendo o promoviendo la expresión de targets como histona desacetilasa (HDAC), ADN metiltransferasa (DNMT), micro ARN (miARN), histona acetiltransferasa (HAT) y sirtuína (SIRT) (Ullah *et al.*, 2020).

Los efectos positivos encontrados en distintos estudios sobre el consumo de miel relacionados a la diabetes son dependientes del contenido de compuestos con potencial bioactivo presentes en la miel. En 2017, Naznin *et al.*, reportaron que la miel exhibe un menor impacto sobre el índice glucémico contra la misma cantidad de glucosa en un estudio en el que se utilizó la prueba de tolerancia a la glucosa como herramienta de medición de glucemia post prandial (Naznin, *et al.*, 2017).

Aunque la diabetes es una enfermedad compleja y multifactorial, es bien conocido que la inflamación sistémica derivada del estrés oxidativo está estrechamente relacionada con la etiología de la enfermedad, por lo que los compuestos con potencial activo como los flavonoides contenidos en la miel pueden ser el camino a seguir para la supresión de las vías inflamatorias involucradas en el desarrollo de la patología (Tsalamndris *et al.*, 2019).

1.5. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (CF)s es la fracción disponible para absorción intestinal de un nutriente ingerido (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Los efectos positivos relacionados con la salud de los compuestos fenólicos presentes en la miel son prometedores; sin embargo, la bioaccesibilidad de estos compuestos es determinante para que los efectos observados *in vitro*, ocurran en las pruebas *in vivo*.

La liberación de los compuestos fenólicos y minerales de la matriz alimentaria comienza desde la masticación, en donde la acción física del aparato bucal y la actividad de la enzima β -glucosidasa causa una escisión de algunos restos glucosídicos en los flavonoides en su estado natural glucosilado, es decir, unido a moléculas de glucosa (Dinnella *et al.*, 2007; Viskupičová *et al.*, 2008). Una vez llegados al estómago algunos flavonoides liberados (aglicones) son absorbidos por las células gástricas. El ambiente gástrico (pH menor) induce a la hidrólisis y la transformación de las estructuras de algunos CF, principalmente desprotonando los grupos hidroxilos presentes en los anillos aromáticos, reduciendo la cohesión de los enlaces O-H, provocando un aumento en la capacidad de donación de moléculas de hidrógeno, aumentando su capacidad para donar electrones (Tyraowska *et al.*, 1999). Las condiciones ácidas del estómago provocan la ruptura de estructuras poliméricas y oligoméricas de proteínas y carbohidratos, así como la liberación de fitoquímicos de la matriz alimentaria y se hidroliza dependiendo de su estructura química. (Viskupičová *et al.*, 2008;). En esta porción se lleva a cabo también la absorción de algunos elementos, como el magnesio y el cobre (Aranda *et al.*, 2000). Además, se ha sugerido que algunas antocianinas y ácidos fenólicos podrían absorberse en el estómago (Cáceres-Aragón *et al.*, 2018).

En el duodeno, los cambios en el pH hacia un entorno más alcalino provocan cambios conformacionales en las estructuras de los compuestos fenólicos, principalmente los flavonoles, las antocianinas y los ácidos benzóicos. Los CF son transportados al citosol de los enterocitos por distintos mecanismos (difusión pasiva, transporte activo, transporte paracelular o difusión facilitada) en donde son hidrolizados por la acción de distintas enzimas como lactasa-floricina hidrolasa (LPH), β -glucosidasa citosólica, UDP-glucuronosiltransferasas (UDPGT), sulfotransferasa (SULT), catecol-O-metiltransferasa (COMT) y β -glucosidasa citosólica (CBG) (Viskupičová et al, 2008; Rodríguez, 2013; Cáceres-Aragón et al., 2018).

Es en esta misma porción dónde minerales como el calcio son absorbidos, el cual guarda una proporción inversa con el pH del medio, absorbiéndose mayormente en la primer porción del duodeno y descendiendo a medida que el pH aumenta a lo largo de la fase duodenal (Mota-Blancas & Perales, 1999). Por su parte el zinc y el magnesio se absorben por vía paracelular y por transporte activo por medio de un canal de alta afinidad (Baca-Ibañez *et al.*, 2015). Así mismo el 90% del potasio ingerido es absorbido en el duodeno por transporte activo (Miyahira, 2018). El cobre dietético requiere ser previamente reducido a cobre cuproso antes de poder ser absorbido en la membrana apical por el transportador de alta afinidad (Nishito & Kambe, 2018).

Finalmente, los compuestos no absorbidos pasan a la porción colónica, en donde son transformados por la microbiota, principalmente grandes polímeros de flavonoides, que son transformados por ácidos fenólicos por enzimas producidas por las bacterias que conforman la microbiota colónica, como ramnoglucosidasas y glucosidasas (Viskupičová et al, 2008; Cáceres-Aragón *et al.*, 2018).

Por esto es importante resaltar que los efectos de la digestión pueden alterar mediante distintas vías la bioaccesibilidad de los compuestos presentes en la miel. Por ejemplo, Cianciosi *et al.*, 2020a probaron los efectos de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la actividad anticancerígena de la miel de manuka, observando que las concentraciones de compuestos fenólicos y por ende sus efectos anticancerígenos, fueron significativamente menores en la miel MH digerida en comparación de la miel cruda (sin digerir) (Cianciosi *et al.*, 2020a; Seraglio, 2021; Simonetti, 2020).

En otro estudio, se observó una pérdida significativa de compuestos fenólicos derivado de la digestión *in vitro* sobre los compuestos fenólicos totales en miel de manuka MH, de entre 3.59% y 1.52%, reducción en el contenido de flavonoides de 15% a 19% y así mismo menor actividad antioxidante (12.39% - 13.67%) en la miel MH digerida en comparación con la miel MH cruda (Cianciosi, *et al.*, 2019). Previamente Seraglio, *et al.* Habían reportado en 2017 que la digestión, principalmente duodenal en la miel de bracatinga sometida a digestión *in vitro*, reduce significativamente la capacidad antioxidante medida por FRAP y DPPH; sin embargo, la concentración de compuestos fenólicos y minerales se mantuvo constante, e incluso, incrementó en algunos casos luego de la digestión duodenal, demostrando que la miel es un alimento que puede ser considerado una importante fuente de compuestos fenolicos bioaccessibles y que otros compuestos como los minerales podrían jugar un papel crucial tanto en la bioaccesibilidad como en la capacidad antioxidante de la miel de bracatinga (Seraglio *et al.*, 2017).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el desarrollo de las enfermedades crónicas, la inflamación es la clave que permite entender la conexión entre patologías, sobre todo de tipo cardiovascular. El estrés oxidativo juega un papel determinante en el desarrollo de estas enfermedades como causante de inflamación y posterior desregulación sistémica, que puede estar estrechamente correlacionada con la etiología de las enfermedades no transmisibles.

La miel ha cobrado gran importancia gracias a investigaciones que han permitido demostrar sus efectos, generalmente atribuidos a su contenido de compuestos fenólicos, pero también de otros componentes interesantes con actividad biológica como enzimas y algunos minerales. Los efectos positivos relacionados con la salud de los compuestos fenólicos presentes en la miel son prometedores; sin embargo, la bioaccesibilidad de estos compuestos es determinante para que los efectos biológicos observados *in vitro*, ocurran en las pruebas *in vivo*. Actualmente, se ha incrementado el interés por la investigación de nuevos alimentos funcionales que contengan compuestos con actividad biológica capaces de regular o prevenir las alteraciones a nivel fisiológico de diversas patologías. Con base a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante de mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana*.

3. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud alerta sobre el dramático aumento en las cifras mundiales de enfermedades no transmisibles, las cuales hoy a 2022 matan a más de 40 millones de personas, es decir, más del 70% de las muertes que ocurren en el mundo se relacionan a estas enfermedades (WHO, 2021). Esto evidencia la necesidad de investigar nuevas estrategias de intervención que permitan prevenirlas e incluso tratar dichas enfermedades y sus causas.

La miel de abeja se caracteriza por ser un alimento complejo con diversos componentes. A diferencia de los endulzantes refinados, se ha documentado la presencia de enzimas antioxidantes (Meo *et al.*, 2017), compuestos fenólicos (Serra Bonvehi *et al.*, 2019) y oligosacáridos con función prebiótica (Narayanan & Subramonian, 2015). México se ha destacado como un gran productor de miel, reportando cifras de hasta 34,892 toneladas en lo que va de este año (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

La miel, por sus compuestos bioactivos, es un alimento que podría intervenir en el desarrollo y prevalencia de diversas patologías (Waheed *et al.*, 2019; Ullah *et al.*, 2020). Sin embargo, se sabe que el proceso digestivo puede afectar significativamente la bioaccesibilidad y, por ende, la biodisponibilidad y el efecto biológico de dichos compuestos presentes en la miel (Cianciosi *et al.*, 2019; Seraglio *et al.*, 2017), por lo que evaluar el efecto del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante en mieles florales de azahar (*Citrus sinensis*) y aguacate (*Persea americana*) podría brindar información para mejorar la comprensión de las propiedades biológicas que este alimento puede exhibir.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana*?

5. HIPÓTESIS

El proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* disminuye la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana* .

6. OBJETIVO GENERAL

6.1 . Objetivo general

Evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal simulada sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante de mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana*.

6.1 Objetivos específicos

1. Analizar la concentración de compuestos fenólicos totales por medio del método de Folin-Ciocalteu.
2. Examinar la capacidad antioxidante *in vitro* por medio de los métodos espectrofotométricos DPPH y FRAP.
3. Estimar el valor de minerales a través del sistema de espectrometría por absorción atómica.
4. Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante a través de la simulación del proceso de digestión gastrointestinal.

7. METODOLOGÍA

7.1. Muestras de estudio

En este estudio se emplearon dos muestras de miel floral nacional con distinto origen geográfico y floral, además de dos controles distintos, uno con una mezcla heterogénea de azúcares emulando el contenido común en la miel, que se utilizó para la cuantificación de fenoles totales y capacidad antioxidante, y un segundo control con una mezcla de enzimas digestivas con las mismas concentraciones utilizadas en el ensayo con las muestras sustituyendo la cantidad de miel por agua destilada, que sirvió para determinar la cantidad de minerales aportado por las propias enzimas digestivas. La miel floral de *Persea americana* fue adquirida de la empresa Hermes Honey Aguascalientes, Ags., México; empresa que cuenta con certificación Tipo Inspección Federal (TIF), entre otras certificaciones para asegurar que el producto es orgánico, tales como Agricultura ecológica en Europa, USDA normativa orgánica de NOP para Estados Unidos, Kosher Pareve México, Orgánico SAGARPA México, y México calidad suprema (<https://hermeshoney.com/calidad/>). La muestra de miel floral de *Citrus sinensis* fue adquirida de la empresa Apiaro Hacienda La Española; empresa certificada por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL (150707/N1697) y por SAGARPA (B00.02.05.1245/16).

7.2. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante

7.2.1 Fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con la metodología descrita por Zalibera et al. (2008) con algunas modificaciones. A 50 μ L de muestra se le adicionaron 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 200 μ L de agua destilada. La mezcla se sonificó por 5 min y posteriormente se adicionó 625 μ L de carbonato de sodio al 20% (p/v). La absorbancia se leyó después de 2 h a 760 nm. Se empleó una curva estándar de ácido gálico (0-80 mg/mL) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mg Eq AG/g).

7.2.2. Ensayo FRAP

El poder reductor se determinó empleando la metodología propuesta por Firuzi *et al.* (2005). La técnica se basó en la reducción de un complejo de 2,4,6-tripiridil 1,3,5-triazina con hierro (Fe^{+3} -TPTZ) a su complejo ferroso colorido (Fe^{+2} -TPTZ) en la presencia del antioxidante, a un pH bajo (3.6). La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 595 nm. El reactivo FRAP contuvo 4 mL de una solución de TPTZ (2.4.6-tripiridil-1.3.5- triazina) 10 mM, 4 mL de FeCl_3 20 mM y 40 mL de solución amortiguadora de acetato 0.3 M (pH 3.6). Esta solución se preparó diariamente y se mantuvo a 37°C. Se adicionaron 25 μ L de muestra y se mezclaron con 1000 μ L de la solución FRAP. Se empleó un estándar de Trolox para la curva de calibración y los resultados se expresaron como mg equivalentes trolox por kg de muestra (mg eq T/kg). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

7.2.3. Ensayo DPPH

El poder reductor se determinó empleando la metodología propuesta por Sdiri *et al.* (2012). La técnica se basó en la reducción del radical conocido 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Absorbancia fue leída a una longitud de onda de 520 nm. Para preparar la solución de DPPH se pesaron 0.0015 g para 25 ml de DPPH, en un matraz aforado forrado con papel aluminio, se agregaron 20.5 ml

de metanol y se completaron hasta el aforo con agua. Esta solución se preparó diariamente. Se adicionaron 50 μL de muestra y se mezclaron con 1000 μL de la solución DPPH. Se empleó un estándar de Trolox para la curva de calibración y los resultados se expresaron como mg equivalentes trolox por kg de muestra (mg eq T/kg). Las determinaciones se llevarán a cabo por triplicado.

7.3. Determinación de contenido de minerales por absorción atómica.

Para la determinación de minerales K, Ca, Mg, Cu y Zn se emplearon los estándares recomendados por el fabricante de Thermo Scientific con una adaptación de la metodología descrita por Márquez-Reyes, 2020. Posteriormente, se midió en el equipo de absorción atómica el estándar de mayor concentración de manera individual. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco específica para cada elemento cuantificado y una lámpara de deuterio para la corrección de fondo. Una vez definidos los parámetros de partida del equipo a partir de los estándares certificados de 1000 mg/L, se preparó una dilución de las muestras con ácido nítrico que luego fue cuantificada por separado para cada elemento correspondiente. Los resultados se expresaron en mg/L de muestra, que posteriormente fueron interpolados a mg/kg de miel.

7.4. Efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante

7.4.1 Digestión *In vitro*

Las muestras de miel fueron sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, empleando la técnica reportada por Hernández-Salazar *et al.* (2013) con algunas modificaciones comprendiendo fase gástrica, duodenal y diálisis. Para determinar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y el

efecto de la digestión en la actividad antioxidante de las muestras, la muestra de miel (15 g) se diluyó en agua destilada (40 mL) y se acidificó a pH 2 usando HCl 6 N con agitación constante. Posteriormente, se adicionó 1.5 mL de una solución de pepsina porcina (160 mg/mL) en HCl 0.1 N y se llevó a un volumen de 50 mL. La mezcla se agitó durante 1.5 h a 37°C. Después de la digestión gástrica, el pH se incrementó hasta pH 5 con NaHCO₃ 0.9 N y se le agregaron 12 mL de una solución de pancreatina-bilis (pancreatina 4 mg/mL, bilis 25 mg/mL en NaHCO₃). El pH se incrementó hasta 7 con una solución de NaHCO₃ 0.9 N y se dejó agitando durante 1 h a 37°C. De la solución sometida a la digestión pancreática se tomaron 40 mL, se colocaron en una probeta y se hará interactuar con un tubo de celulosa que contendrá 25 mL de NaCl (9 mg/mL). La solución se mantendrá en agitación constante durante 1 h a 37 °C. Para la determinación de fenoles totales y actividad antioxidante se tomará 1 mL de solución dializada (D_{Dentro}, solución dentro del tubo de diálisis) y se someterá a una extracción sólido-líquido.

El control con azúcares fue elaborado con una mezcla de 20g de fructosa, 16g de glucosa y 1g de sacarosa aforando a 100ml, para posteriormente someterlos al mismo proceso descrito previamente para las muestras de MPa y MCs. Por su parte, en el control para contenido de minerales el volumen de muestra fue reemplazado por agua destilada, sometiendo al proceso el volumen total de 100ml de agua destilada, añadiendo las enzimas correspondientes en ambos casos de la misma manera descrita para las muestras de MPa y MCs.

7.4.2. Extracción sólido-líquido

Para las muestras digeridas y dializadas (miel floral de *Citrus sinensis* y *Persea americana*) se llevó a cabo una extracción sólido-líquido, en la cual se utilizó un colector de extracción marca Waters acoplado a una bomba de vacío (marca Felisa) y un cartucho de resina C18 (1 cc, marca Waters). El cartucho C18 se activó con metanol (5 mL) y agua (5 mL). Cien miligramos de miel se diluyeron en 900 µL de agua acidificada (pH 2), el agua se acidificó con HCl

concentrado, posteriormente la miel diluida en el agua acidificada se pasó por la columna. El cartucho se lavó con 10 mL de agua acidifica (pH 2) y 5 mL de agua destilada. Finalmente, los compuestos fenólicos se eluyeron con metanol (2 mL).

7.5. Evaluación de la bioaccesibilidad

Después del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* el valor de fenoles totales y capacidad antioxidante por DPPH y FRAP fueron evaluados en la fase gástrica, duodenal y dializado por las técnicas previamente descritas. Cabe destacar que, previo a la determinación de lo antes mencionado, se realizó una extracción sólido-líquido con cartuchos C18, técnica que también ya fue explicada.

El valor de fenoles totales y capacidad antioxidante se determinó empleando la concentración de compuestos fenólicos en el equilibrio en la fase gástrica, dudodenal y dializada (Fenoles-DDentro EQ) empleando la siguiente ecuación:

$$Fenoles - DDentroEQ = \frac{mg \text{ de fenoles en la muestra} * \text{volumen de digesta}}{\text{volúmen total en el equilibrio}}$$

donde Fenoles-DDentro EQ es la concentración de compuestos fenólicos después de la digestión (Figura 6)(mg/g de miel).

Asimismo, el índice de bioaccesibilidad se calculó tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$\%IB = \frac{100 * Fenoles DDentro}{Fenoles DDentroEQ}$$

En la figura 7 se describe la estrategia experimental que se llevó a cabo en el presente estudio, la cual comprende dos fases. La primera en la que se

llevó a cabo la cuantificación de contenido mineral y capacidad antioxidante en crudo y la segunda en la cual se cuantifican los mismos parámetros en las muestras que fueron sometidas al proceso de digestión *in vitro*. Finalizando con el análisis estadístico y la interpretación de resultados.

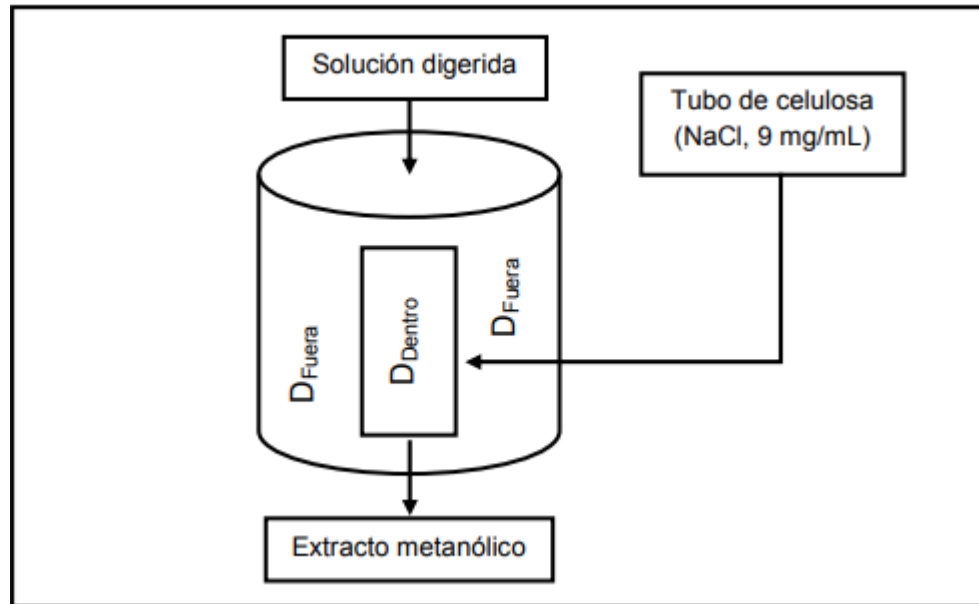


Figura 6. Diagrama del proceso de dializado en la digestión *in vitro* (Reimpreso de Rodríguez, 2012).

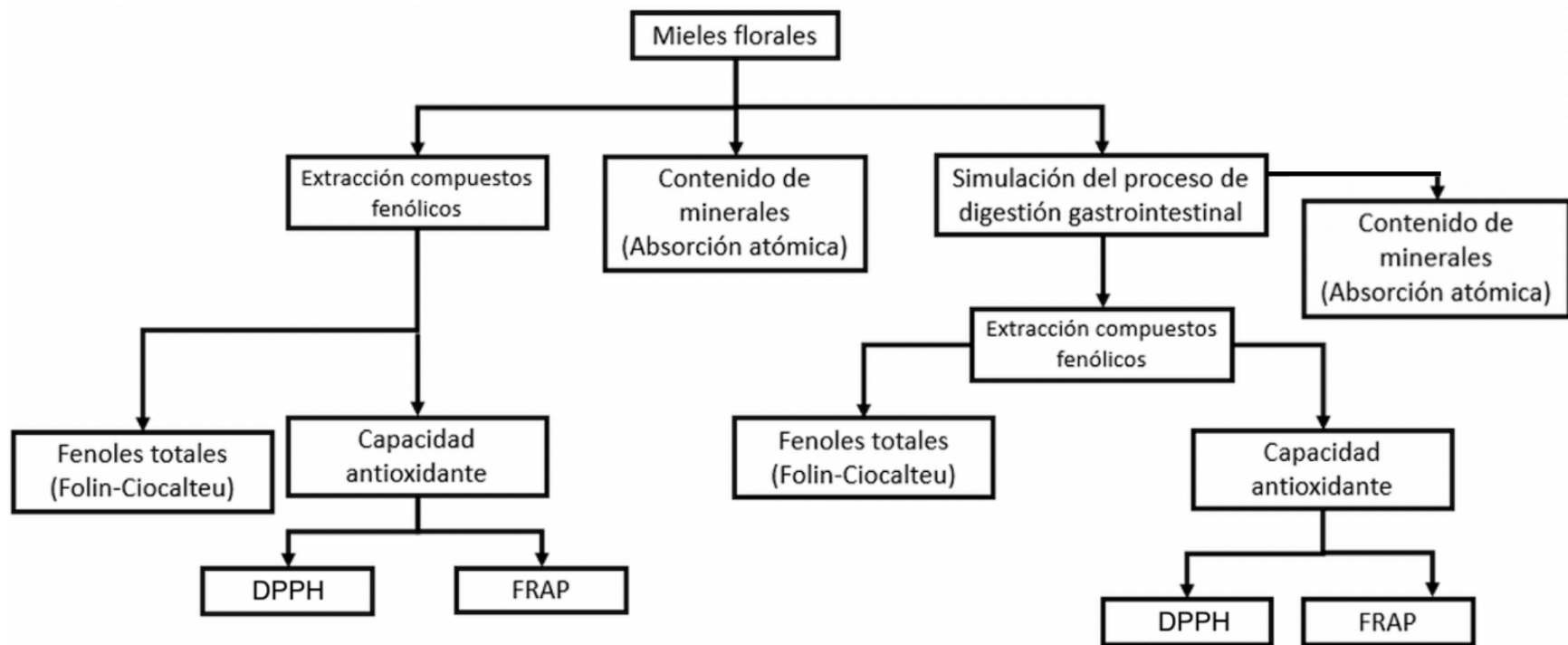


Figura 7. Estrategia experimental.

Tabla 3. Operacionalización de las variables.

| Variable | Tipo de variable | Definición operacional | Unidad de medición |
|-------------------------------|--|--|--|
| Fenoles totales | Dependiente (En base al origen geográfico y floral de las muestras de miel) | Se medirán los niveles de fenoles totales a partir de extractos metanólicos | mg Equivalentes de ácido gálico/Kilogramo de muestra (mg eq Ag/kg) |
| Capacidad antioxidante | Dependiente (En base a la concentración de fenoles totales) | Se medirá el nivel de capacidad antioxidante a partir de extractos metanólicos | Método DPPH: microgramos equivalentes de trolox/Kilogramo de muestra (mg eq T/kg) Método FRAP: microgramos equivalentes de trolox/gramo de muestra (mg eq T/ kg) |
| Contenido de minerales | Dependiente (En base al origen geográfico y floral de las muestras de miel) | Se medirán los niveles de minerales en las muestras de miel previamente tratadas con ácido clorhídrico (HCl) | Mg de mineral por kg de muestra (mg/kg) (Potasio, magnesio, calcio, cobre y zinc) |
| Bioaccesibilidad | Dependiente (En base al origen geográfico y floral de las muestras de miel, además del efecto de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>) | Se medirá el porcentaje de bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. | % de compuestos fenólicos bioaccesibles |

7.6. Plan de análisis

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar (MES). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico JMP versión 9.0, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA de 1 factor) para estudiar las diferencias entre los dos tipos de mieles (*Citrus sinensis* y *Persea americana*), antes y durante el proceso de digestión *in vitro*; se empleó la prueba Tukey con prueba *post hoc*, a un nivel de significancia $\alpha= 0.05$.

7.7. Consideraciones éticas y de bioseguridad

El proyecto de investigación se apega a las condiciones y lineamientos de los laboratorios, así como al Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud (COBICIS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los comités y laboratorios se apegan a las disposiciones emitidas por organismos nacionales e internacionales en materia de investigación y establecen pautas a seguir para el adecuado manejo de reactivos químicos. Dentro de los lineamientos destacan el uso de bata, guantes, cubre calzas, cofia, cubrebocas y lentes protectores.

8. RESULTADOS

Los datos siguientes representan las observaciones obtenidas de las pruebas para determinar capacidad antioxidante por DPPH y FRAP, contenido de fenoles totales y minerales K, Zn, Ca, Cu y Mg, tanto en las muestras crudas como en las muestras que fueron sometidas a la digestión *in vitro*.

La bioaccesibilidad se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Seraglio *et al.* (2017):

$$\text{Fracción bioaccesible (\%)} = (\text{C digestión} / \text{C crudo}) \times 100.$$

Donde C digestión es la concentración de la muestra en la fase determinada, C crudo es la concentración de la muestra cruda.

8.1. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales exhibió un comportamiento distinto en ambas muestras de mieles florales. Mientras que la miel de *Persea americana* (Mpa) tuvo un contenido de fenoles totales de 1508.53 mg eq AG/kg, este tuvo un descenso a 291.31 mg eq AG/kg al final de la digestión *In vitro* (Tabla 4). Por su parte, la miel de *Citrus sinensis* (MCs) tuvo un descenso menor al encontrado en Mpa, de 277.39 mg eq AG/kg en crudo a 165.01 mg eq AG/kg al final de la fase de diálisis, sin embargo presentó el mayor valor de compuestos fenólicos en la fase duodenal (354.48 mg eq AG/kg).

Tabla 4. Contenido de fenoles totales a lo largo de la digestión *in vitro* en muestras de mieles florales de *Citrus Sinensis* y *Persea americana*.

| FENOLES TOTALES (mg eq AG/kg) | | | | |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Tipo de miel | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 277.39 ±20.58 ^{Bb} | 194.57 ±14.62 ^{Cb} | 354.48 ± 7.75 ^{Ab} | 165.01 ±11.05 ^{Cb} |
| Bi % | N.D. | 70% | 128% | 60% |
| MPa | 1508.53 ±75.89 ^{Aa} | 1391.78 ±147.96 ^{Aa} | 590.57 ±45.16 ^{Ba} | 291.31 ±17.79 ^{Ba} |
| Bi % | N.D. | 92% | 39% | 19% |
| Control | N.D. | 82.51±2.45 ^{Bb} | 137.32±6.73 ^{Ac} | 85.43±2.32 ^{Bc} |
| Bi % | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D.= No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.2. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante fue medida por dos métodos distintos para garantizar la efectividad de la medición y los resultados dada la diferencia en los principios de cada método (Moon & Shibamoto, 2009).

8.2.1. Capacidad antioxidante medida por DPPH

La capacidad antioxidante mostró un comportamiento similar al contenido de compuestos fenólicos totales en ambas mieles florales. Mientras que Mpa tuvo un valor inicial de 1397.1 mg T/kg, al final de la fase de diálisis su valor descendió a 261.31 mg T/kg, es decir solo una quinta parte de su valor en crudo (Tabla 5). Por otro lado, MCs desciende de 250.1 mg T/kg a 131.8 mg T/kg al final de digestión *In vitro*, es decir, un descenso mucho menor en proporción. Aunque es

importante señalar que siguen habiendo diferencias estadísticas entre ambas mieles, Mpa es superior en todas las fases de la digestión *in vitro*.

Tabla 5. Capacidad antioxidante medida por DPPH a lo largo de la digestión *in vitro* en muestras de mieles florales de *Citrus Sinensis* y *Persea americana*.

| Tipo de miel | DPPH (mg eq T/kg) | | | |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 259.06±15.70 ^{Ab} | 52.79±2.95 ^{Cb} | 130.45±4.08 ^{Bb} | 131.80±13.27 ^{Bb} |
| MPa | 1397.10±33.64 ^{Aa} | 424.53±14.59 ^{Ba} | 412.68±10.04 ^{Ba} | 261.31±8.48 ^{Ca} |
| Control | N.D. | 29.94±1.02 ^{Bb} | 135.19±5.24 ^{Ab} | 162.94±14.49 ^{Ab} |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D.= No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.2.2. Capacidad antioxidante medida por FRAP

Los valores de capacidad antioxidante medida por FRAP, muestran una tendencia similar a la observada en la medida por DPPH, mientras que el descenso en la miel de *Persea americana* es de casi una quinta parte de su valor inicial (2320.08 mg T/kg - 502.95 mg T/kg) los valores para MCs se muestran estables al final de la fase de diálisis (Tabla 6). Sin embargo es importante destacar que estos presentan un aumento significativo en la fase duodenal respecto de las demás fases de la digestión *in vitro* (329.6 mg T/kg).

Tabla 6. Capacidad antioxidante medida por FRAP a lo largo de la digestión *in vitro* en muestras de mieles florales de *Citrus Sinensis* y *Persea americana*.

| Tipo de miel | FRAP (mg eq T/ Kg) | | | |
|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 275.7±12.31 ^{Bb} | 273.59±6.0 ^{Bb} | 329.60±7.88 ^{Ab} | 242.10±9.26 ^{Bb} |
| MPa | 2320.08±139.07 ^{Aa} | 2229.89±187.35 ^{Aa} | 1145.55±119.23 ^{Ba} | 502.95±29.33 ^{Ca} |
| Control | N.D. | 77.38±1.35 ^{Cb} | 132.64±3.88 ^{Bb} | 160.40±4.58 ^{Ac} |

Los resultados representan las medias \pm el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D.= No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.3. Contenido de minerales

8.3.1. Potasio

No se encontró diferencia significativa a través de las fases de la digestión *in vitro* en ninguna de las dos mieles; sin embargo, los valores de potasio en Mpa son significativamente más altos desde las muestras analizadas en crudo y a lo largo de todas las fases de la digestión simulada como se muestra en la tabla 7. Comportamientos distintos fueron observados a lo largo de las fases en ambas mieles, mientras que el valor más alto en Mpa fue observado en la fase gástrica; en MCs el valor más alto se obtuvo después de la fase de diálisis (132.19 y 148.06%).

Tabla 7. Contenido de potasio en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana* a través de la digestión *in vitro* por absorción atómica.

| Tipo de miel | Potasio (mg/kg) | | | |
|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 784.14 ± 56.0 ^{Ab} | 461.60 ± 78.8 ^{Ab} | 551.37 ± 82.6 ^{Ab} | 1161.01 ± 20.5 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | 58.88% | 70.31% | 148.06% |
| MPa | 1304.75 ± 26.4 ^{Aa} | 1724.80 ± 24.5 ^{Aa} | 1380.69 ± 73.9 ^{Aa} | 1171.20 ± 20.9 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | 132.19% | 105.82% | 89.76% |
| Control | N.D. | 26.41 ± 4.0 ^{Bb} | 275.43 ± 99.9 ^{ABb} | 414.4 ± 12.8 ^{Ab} |
| Bi % | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D. = No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.3.2. Zinc

Los valores en crudo de zinc son significativamente más altos en Mpa; sin embargo, aunque en la fase duodenal los valores de MCs aumentan y los de Mpa disminuyen, al punto en que no hay diferencia estadística entre las muestras, al final de la fase de diálisis vuelve a haber una diferencia significativa entre los valores de Mpa y MCS, siendo más altos los de Mpa (Tabla 8). El aumento más notable en los valores de MCs se observan en la fase duodenal, mientras que los valores más altos de la muestra MPa se obtuvieron en la fase gástrica.

Tabla 8. Contenido de Zinc en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana* a través de la digestión *in vitro* por absorción atómica.

| Tipo de miel | Zinc (mg/kg) | | | |
|--------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 0.64 ± 0.08 ^{Ab} | 0.11 ± 0.00 ^{Bb} | 0.49±0.09 ^{Aa} | 0.51 ± 0.05 ^{Ab} |
| Bi % | N.D. | 17.21% | 76.56% | 79.68% |
| MPa | 2.10 ± 0.528 ^{Ba} | 4.53 ± 0.22 ^{Aa} | 1.68±0.61 ^{Ba} | 1.1 ± 0.05 ^{Ba} |
| Bi % | N.D. | 215.71% | 80.0% | 52.38 % |
| Control | N.D. | 0.32 ± 0.05 ^{Ab} | 0.247 ± 0.134 ^{Aa} | 0.277 ± 0.047 ^{Ac} |
| Bi % | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey . N=6. N.D. = No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.3.3. Calcio

El contenido de calcio se mantuvo estable a través de las fases digestivas en la miel de MPa de 82.64 mg/kg a 88.36 mg/kg al final de la fase de diálisis, mientras que la miel de *Citrus sinensis* mostró un aumento de su valor a partir de la fase duodenal y al final de la fase de diálisis (21.20 mg/kg y 34.47 mg/kg). Como se observa en la tabla 9, en todas las fases de la digestión, la miel de *Persea americana* tuvo valores de calcio significativamente mayores que la de *Citrus sinensis*, excepto al final de la fase diálisis, en la que no se observó una diferencia significativa entre las dos muestras.

Tabla 9. Contenido de Zinc en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana* a través de la digestión *in vitro* por absorción atómica.

| Tipo de miel | Calcio (mg/kg) | | | |
|--------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 8.75 ± 5.96 ^{Bb} | 9.41 ± 0.31 ^{Bb} | 21.20 ± 1.27 ^{Abb} | 34.47 ± 4.81 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | 107.54% | 242.28% | 393.94% |
| MPa | 82.64 ± 27.2 ^{Aa} | 13.22 ± 0.61 ^{Aa} | 42.73 ± 1.43 ^{Aa} | 88.36 ± 36.81 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | 15.99% | 51.70% | 106.92% |
| Control | N.D. | 8.78 ± 0.714 ^{Bb} | 22.77 ± 1.17 ^{Ab} | 20.97 ± 5.44 ^{Aba} |
| Bi % | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D. = No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.3.4. Cobre

Los valores de cobre en las muestras en crudo eran estadísticamente distintos, siendo mayor el de Mpa, sin embargo al final de la digestión en la fase de diálisis no se observó una diferencia significativa entre las muestras, pues hubo un descenso drástico en los valores de Mpa, principalmente al final de la fase diálisis mientras que los valores de MCs se mantuvieron relativamente estables a lo largo de todo el proceso de la digestión simulada (Tabla 10).

Tabla 10. Contenido de cobre en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana* a través de la digestión *in vitro* por absorción atómica.

| Tipo de miel | Cobre (mg/kg) | | | |
|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 0.19 ± 0.05 ^{Ab} | 0.07 ± 0.02 ^{Ab} | 0.10 ± 0.11 ^{Ab} | 0.11 ± 0.01 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | 36.84% | 52.63% | 57.89% |
| MPa | 1.29 ± 0.03 ^{Aa} | 0.84 ± 0.07 ^{Ba} | 1.10 ± 0.11 ^{Aba} | 0.162 ± 0.05 ^{Ca} |
| Bi % | N.D. | 65.11% | 85.27% | 12.55% |
| Control | N.D. | 0.052 ± 0.02 ^{Bb} | 0.4 ± 0.10 ^{Ab} | 0.12 ± 0.10 ^{Aba} |
| Bi % | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D. = No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

8.3.5. Magnesio

Como se observa en la tabla 11, el contenido de magnesio en ambas mieles en la fase cruda es estadísticamente similar; sin embargo, las muestras se ven alteradas de manera distinta a lo largo de las fases, mientras que Mpa tuvo un aumento de 65.25 mg/kg en la fase cruda a 195.24 mg/kg, en la fase gástrica y este se mantiene hacia el final de la fase de siálisis, MCs presentó un aumento significativo de sus valores desde la fase gástrica y sostenido hacia la fase de diálisis, presentando los valores más altos en la fase duodenal, fase desde la cual no se observaron diferencias significativas entre las dos muestras.

Tabla 11. Contenido de cobre en mieles florales de *Citrus sinensis* y *Persea americana* a través de la digestión *in vitro* por absorción atómica.

| Tipo de miel | Magnesio (mg/kg) | | | |
|--------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | Crudo | Gástrico | Duodenal | Diálisis |
| MCs | 54.82 ± 37.35 ^{Ba} | 77.48 ± 11.62 ^{Abb} | 192.08 ± 9.0 ^{Aa} | 165.41 ± 44.0 ^{Aba} |
| Bi % | N.D. | 141.33% | 350.38% | 301.73% |
| MPa | 65.25 ± 27.53 ^{Aa} | 195.24 ± 9.77 ^{Aa} | 172.0 ± 80.41 ^{Aa} | 118.63 ± 34.68 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | 299.21% | 263.60% | 181.80% |
| Control | N.D. | 6.46 ± 0.46 ^{Bc} | 19.88 ± 4.13 ^{Ba} | 108.80 ± 19.92 ^{Aa} |
| Bi % | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

Los resultados representan las medias ± el error standard. Letras mayúsculas (A,B,C...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre fases de la digestión por prueba Tuckey. Letras minúsculas (a,b,c...) indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre las muestras por prueba Tuckey. N=6. N.D. = No determinado. Bi % = Porcentaje de bioaccesibilidad.

9. DISCUSIÓN

9.1. Contenido de fenoles totales

En la matriz alimentaria de la miel existen distintos componentes, como enzimas digestivas que pueden interactuar con otros compuestos, tales como los fenoles modificando sus estructuras y formando nuevos compuestos, alterando el contenido de los mismos y por ende su capacidad de actividad biológica (Tyrakowska *et al.*, 1999; Seraglio, 2021). Los valores de fenoles totales que se muestran en la Tabla 4, se vieron afectados significativamente a través de las fases de la digestión *In vitro*, principalmente en la miel de *Persea americana* (Mpa); aunque los valores de fenoles totales en esta miel son estadísticamente superiores en todas las fases respecto a MCs, el descenso de su valor en crudo de 1508.53 mg eq Ag/kg a 291.31 mg eq AG/kg representa una disminución mucho mayor que en MCs, que solo decae de 277.39 mg eq AG/kg en crudo a 165.01 mg eq AG/kg al final de la fase de diálisis. En general las mieles de tonalidades ámbar oscuro se asocian a contenidos más altos en compuestos bioactivos como flavonoides y minerales (Da Silva *et al.*, 2017; Seraglio *et al.*, 2020). Otros autores como O'Sullivan *et al.* (2013) encontraron en miel de manuka, una miel de tonalidad ambar oscuro similar a la de *Persea americana*, que aunque en crudo los valores de fenoles totales eran altos (1270 mg eq Ag/kg) al final de la digestión *In vitro* estos valores descendieron 6 veces el valor inicial (203 mg eq Ag/kg). Este hallazgo fue atribuído a que ciertos compuestos fenólicos son más sensibles a los cambios del pH. Por su parte Seraglio *et al.* (2017) reportaron una alta bioaccesibilidad en general de compuestos fenólicos en miel brasileña de bracatinga en la fase gástrica y aún mayor en la fase duodenal (178%). Estos hallazgos fueron asociados a posibles interacciones con los componentes de la matriz alimentaria y del sistema digestivo. En este estudio,

la capacidad antioxidante y el contenido de minerales en MCs parece ser más estable a lo largo de las fases de la digestión *in vitro*.

Los ácidos fenólicos fueron propuestos como más estables para el proceso digestivo que los flavonoides en miel de manuka por Cianciosi *et al.* (2019), lo cual se atribuyó a la desmetilación de las enzimas salicilato de metilo presentes en las mieles e interacciones con los azúcares provocando un efecto protector en el proceso digestivo.

En la matriz alimenticia de la miel, existen diferentes enzimas que podrían modificar y procesar aún más los flavonoides y, en consecuencia, alterar su bioaccesibilidad (Seraglio *et al.*, 2017). Por esto, la composición química particular de cada miel, compuestos fenólicos, minerales, enzimas aportadas por la propia abeja, el polen y otros, es determinante para las interacciones que sus componentes pueden sufrir a través del proceso digestivo sometido en la digestión *in vitro*, principalmente debido a los cambios en el pH (Seraglio *et al.*, 2021.).

9.2. Capacidad antioxidante

9.2.1. Capacidad antioxidante por DPPH

En la miel existen otros compuestos, tales como vitamina C, ácidos orgánicos, enzimas y proteínas, además de los fenoles que pueden exhibir una capacidad antioxidante propias e interactuar con los mismos y mantener su capacidad antioxidante a pesar de los cambios estructurales que pueden sufrir durante la digestión (Cianciosi, 2019). La capacidad antioxidante medida por DPPH (Tabla 5) mostró una tendencia particular para cada miel; mientras que Mpa sufrió una disminución a lo largo de las fases, representando finalmente una quinta parte de su valor inicial (1397.01 mg eq T/kg), al final de la fase de diálisis (261.31 mg eq T/kg), la miel de *Citrus sinensis* descendió en menor proporción respecto a Mpa, pues su valor inicial fue de 250.06 mg eq T/kg y al final de la

digestión *in vitro* 131,8 mg eq T/kg, es decir un 52% de su valor inicial. Es pertinente resaltar el aumento que se observa en la fase duodenal en la capacidad antioxidante por DPPH de MCs, ya que mientras en la fase gástrica su valor descendió a 52.79 mg eq T/kg, en la fase duodenal este aumentó a 130.45 mg eq T/kg, manteniéndose estable hacia el final de la fase de diálisis. Esto último podría atribuirse al contenido químico particular de la miel de *Citrus cinensis*, pues aunque la miel de *Persea americana* tiene un mayor contenido total de fenoles y minerales, estos sufren una pérdida considerable a través de la digestión *in vitro*, mientras que MCs es virtualmente más estable a través de las fases de este proceso, esto podría deberse a que los componentes en la matriz química de MCs podrían comportarse de manera distinta a los cambios del pH y enzimas propios de la digestión *in vitro*.

Seraglio *et al.* (2017) reportaron un incremento específico de la capacidad antioxidante medida por DPPH en miel de bracinga en la fase duodenal, atribuyendo esto a la desprotonación de los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos, reduciendo la energía de disociación de los enlaces O-H, facilitando la donación de hidrógeno y disminuyendo el potencial de ionización, y así aumentando la capacidad antioxidante. Azza *et al.* (2013) reportaron 77.7 mg/kg de vitamina C en muestras crudas de *Citrus sinensis*, la cuál podría interactuar con otros componentes en la miel que provoquen un efecto protector a través de la digestión *in vitro* y una actividad antioxidante propia.

9.2.2. Capacidad antioxidante por FRAP

Diferentes resultados pueden ser obtenidos en la capacidad antioxidante cuando esta es medida por dos métodos distintos, esto debido a que el mecanismo de acción, las moléculas que interactúan y los medios en los que las reacciones ocurren son distintas para cada ensayo, por lo que se recomienda

medir la capacidad antioxidante al menos por dos métodos distintos con el fin de obtener información más adecuada sobre la capacidad antioxidante de la muestra (Moon y Shibamoto, 2009). La capacidad antioxidante medida por FRAP (Tabla 6) mostró una tendencia parecida y congruente con la medida por DPPH, con particularidades a resaltar. Mientras que Mpa tuvo un valor en crudo de 2320.08 mg eq T/kg, al final de la fase de diálisis su valor había descendido a solamente 502.95 mg eq T/kg, es decir 21.6% de su valor inicial, indicando una pérdida considerable de su capacidad antioxidante provocada por las interacciones ocurridas durante el proceso de digestión *In vitro*. Interesantemente, no se observó diferencia significativa entre los valores de MCs al inicio y al final de la digestión *In vitro*; no obstante, es importante destacar que los valores más altos de esta muestra se observaron en la fase duodenal (329.6 mg eq T/kg); probablemente asociado a los cambios estructurales de sus compuestos fenólicos determinados por el pH duodenal que potencian su capacidad antioxidante (Cianciosi *et al.*, 2020a).

Se ha sugerido que el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos (CF) puede ser mayor en el intestino delgado, el cual se encuentra en un rango de pH de 7-8, ya que esta característica de los CF es pH-dependiente (Rodríguez, 2013). Por otra parte, Cianciosi *et al.* (2019) reportan un descenso al 45% de la capacidad antioxidante medida por FRAP en miel de manuka, atribuido a la sensibilidad de algunos compuestos fenólicos a cambios en el pH durante el proceso de digestión. Es decir, un comportamiento similar a lo observado en la miel de *Persea americana* utilizada en este estudio. En contraste, Alevia *et al.* (2021), reportan que los valores de capacidad antioxidante medida por DPPH y FRAP aumentan luego de la digestión *In vitro* atribuyendo esto a la resistencia de algunos compuestos bioactivos a la acción de enzimas y su liberación en la fase final de la digestión.

9.3. Contenido de minerales

Los minerales son elementos importantes de la miel que se encuentran generalmente en concentraciones más altas en mieles oscuras en comparación con las de tonalidad ambar claro (Phol *et al.*, 2012). Dichos elementos participan en una amplia gama de interacciones biológicas en el cuerpo humano, y su concentración en la miel depende principalmente del origen botánico y de las condiciones geográficas de las que proviene el néctar libado por las abejas, así como de la capacidad de absorción de la propia planta y de las condiciones del suelo (Seraglio *et al.*, 2017). El contenido de minerales obtenido en este estudio mostró un comportamiento particular para cada mineral cuantificado a lo largo de las fases, variando tanto en función de la miel como en función de la fase específica. Por ejemplo, los valores de potasio en crudo fueron estadísticamente diferentes en MCs y Mpa, 784.14 mg/kg y 1304.75 mg/kg, respectivamente; sin embargo, aunque Mpa tuvo un valor estadísticamente mayor al final de la fase duodenal (1380.69 mg/kg), respecto a MCs (551.37 mg/kg) (Tabla 7), esta diferencia se desvanece en la fase de diálisis, en la que los valores de ambas muestras vuelven a ser estadísticamente similares, indicando una alta bioaccesibilidad de potasio en MCs. Los valores de potasio obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por otros autores en mieles florales similares (Seraglio *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019).

El contenido de zinc en ambas mieles tuvo una tendencia particular en cada miel, si bien al final de la fase diálisis no hay diferencia en ninguna de las dos muestras respecto a los valores en crudo, en la fase gástrica ambas mieles presentan diferencias. Como se observa en la Tabla 8, mientras que Mpa presentó un aumento de 2.10 mg/kg en crudo a 4.53 mg/kg en la fase gástrica, MCs presentó un descenso de 0.64 mg/kg, en crudo, a 0.11 mg/kg en la fase

gástrica; esto posiblemente provocado por la acción de las enzimas digestivas que interactúan con componentes particulares de la matriz de cada miel y estos a su vez interactúan con el mineral provocando distintos valores en ambas muestras.

Los valores de calcio en Mpa se mantuvieron sin cambios a lo largo de las fases de la digestión simulada; sin embargo, MCs mostró un comportamiento distinto, mientras que la muestra en crudo tuvo valores bajos (8.74 mg/kg) (Tabla 9). Estos ascendieron a 34.47 mg/kg al final de la fase de diálisis. Mientras que los valores de cobre se mantuvieron estables en MCs a lo largo de todas las fases. Un comportamiento distinto fue observado en la Mpa, pues esta sufrió un descenso significativo en sus valores de cerca de una décima parte del valor inicial.

En la tabla 10 se observan los valores obtenidos de cobre en ambas muestras. Si bien las concentraciones de cobre varían de 12% a 85% a través de las fases, este es un elemento que no debe encontrarse en grandes concentraciones; por lo que, aunque el porcentaje de bioaccesibilidad más alto fue observado en la Mpa en la fase duodenal, este elemento se absorbe principalmente en la fase gástrica, aunque también puede ser absorbido en la membrana apical por el transportador CTR1 (Nishito & Kambe, 2018). Esto sugiere que si bien el cobre se encuentra presente en la miel, no representaría un riesgo para la salud aún cuando su bioaccesibilidad puede llegar a ser alta.

Por último, los valores de magnesio mostraron estabilidad en la Mpa, mientras que en la MCs aumentaron significativamente ($P < 0.05$) luego de la digestión simulada, principalmente en la fase duodenal, en la cual sus valores aumentaron a más de 350% (Tabla 11).

Los valores generales de minerales de las muestras en crudo utilizadas en este estudio coinciden con reportados por otros autores en distintas mieles mieles

florales crudas (Terrab *et al.*, 2004; Pohl *et al.*, 2012, Seraglio *et al.*, 2017; Oliveria *et al.*, 2019). Aunque los valores reportados a través de la digestión *in vitro* varían dependiendo del autor. Por ejemplo Oliveria *et al.* (2019) reportan un descenso de las concentraciones de minerales Ca, Mg y K, luego de la digestión *In vitro*. Mientras que Biluca *et al.* (2017), Pohl *et al.* (2012) y Seraglio *et al.* (2017) reportan una alta bioaccesibilidad de Ca, Cu, K, Mg y Zn en mieles de distintas floraciones. Estos hallazgos podrían ser atribuidos principalmente a las variantes metodológicas utilizadas por los distintos autores, dado que no hay un método estandarizado para llevar a cabo el procedimiento, los estudios pueden diferir en cuanto a concentraciones utilizadas, inclusión o exclusión de fases (Oral, gástrica, duodenal, diálisis) uso o no de ciertas enzimas y el tipo de las mismas (Seragio *et al.*, 2020; Alevia *et al.*, 2021).

Por otra parte, es importante resaltar que además de las diferentes concentraciones propias de cada miel particular dada sus características fisicoquímicas, en este estudio los valores de minerales K, Mg, Cu y Ca aumentan generalmente a partir de la fase duodenal, lo que puede suponer un aporte a considerar propio de las enzimas digestivas que intervienen en cada fase, principalmente las duodenales (sales biliares y pancreatina), ya que en las observaciones control los valores se incrementan de la misma forma que en las muestras. Esto sugiere que parte de los minerales cuantificados observados en los ensayos no provienen únicamente de la miel, sino que las enzimas digestivas utilizadas pueden aportar minerales al medio, lo que podría explicar en parte el aumento obtenido a través de las fases digestivas *in vitro*, pues estudios similares que omitieron la fase duodenal, observaron concentraciones menores en los minerales cuantificados, atribuyéndolo a la ausencia de la fase duodenal en el modelo digestivo (Pohl *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2019; Seraglio *et al.*, 2021).

10. Conclusiones

En este estudio se investigó la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y minerales, así como su capacidad antioxidante en dos mieles florales con características distintas, *Citrus sinensis* (MCs) y *Persea americana* (MPa), sometidas a digestión simulada *in vitro*. MPa obtuvo un contenido superior de los componentes analizados en este estudio (compuestos fenólicos, potasio, calcio, zinc, cobre y magnesio) y aunque el descenso de las concentraciones a través de las fases de la digestión fue mayor, probablemente debido a los cambios en el pH y su interacción con los componentes particulares de la matriz alimentaria, en cada parámetro mostró concentraciones superiores (contenido de fenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de minerales), respecto de MCs. Por lo cual es una fuente importante de compuestos bioactivos que podrían exhibir actividad antioxidante y finalmente un efecto biológico en un consumo habitual por parte del ser humano; no obstante, se necesitan más estudios para corroborar esto hallazgos.

Finalmente, la inclusión de un modelo control con una mezcla de azúcares y un blanco con enzimas permitió identificar cierta capacidad antioxidante exhibida por las mismas que en otros estudios no se ha considerado. Los compuestos fenólicos pueden sufrir cambios estructurales y desprotonaciones debido a las fluctuaciones en el pH a través de las fases de la digestión que pueden llevar a los mismos a modificar su actividad reductora que afectando los resultados obtenidos de las pruebas de capacidad antioxidante y por ende explique en cierta medida la actividad observada en las muestras

11. REFERENCIAS

1. Ab Wahab, S. Z., Nik Hussain, N. H., Zakaria, R., Abdul Kadir, A., Mohamed, N., Tohit, N. M., Norhayati, M. N., & Hassan, I. I. (2018). Long-term effects of honey on cardiovascular parameters and anthropometric measurements of postmenopausal women. *Complementary Therapies in Medicine*, 41, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.08.015>
2. Afrin, S., Forbes-Hernández, T. Y., Cianciosi, D., Pistollato, F., Zhang, J., Pacetti, M., Amici, A., Reboredo-Rodríguez, P., Simal-Gandara, J., Bompadre, S., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2019). Strawberry tree honey as a new potential functional food. Part 2: Strawberry tree honey increases ROS generation by suppressing Nrf2-ARE and NF-κB signaling pathways and decreases metabolic phenotypes and metastatic activity in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 57, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.037>
3. Afrin, S., Forbes-Hernandez, T., Gasparrini, M., Bompadre, S., Quiles, J., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F., & Battino, M. (2017). Strawberry-Tree Honey Induces Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells and Increases ROS Generation: A Comparison with Manuka Honey. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 613. <https://doi.org/10.3390/ijms18030613>
4. Ahmed, A., Khan, R. A., Azim, M. K., & Saeed, S. A., Mesaik, M. A., Ahmed, S., & Imran, I. (2011). Effect of natural honey on human platelets and blood coagulation proteins. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 24(3).

5. Almeer, R., Alqarni, A., Alqattan, S., Abdi, S., Alarifi, S., Hassan, Z., & Semlali, A. (2018). Effect of Honey in Improving Breast Cancer Treatment and Gene Expression Modulation of MMPs and TIMPs in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(6).
6. Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., Ansari, M. J., Al-Waili, A., & Al-Waili, T. (2013). Honey and Cardiovascular Risk Factors, in Normal Individuals and in Patients with Diabetes Mellitus or Dyslipidemia. *Journal of Medicinal Food*, 16(12), 1063–1078. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0285>
7. An, N., Cai, W. J., Zhu, Q. F., Wang, W., Hussain, D., & Feng, Y. Q. (2020). Metabolic profiling of organic acids in honey by stable isotope labeling assisted liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 87, 103423. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103423>
8. Aranda, P. I. L. A. R., Planells, E., & Llopis, J. (2000). Scientific Communication: Art o Technique?. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 91-100.
9. Aryappalli, P., Shabbiri, K., Masad, R. J., Al-Marri, R. H., Haneefa, S. M., Mohamed, Y. A., Arafat, K., Attoub, S., Cabral-Marques, O., Ramadi, K. B., Fernandez-Cabezudo, M. J., & al-Ramadi, B. K. (2019). Inhibition of Tyrosine-Phosphorylated STAT3 in Human Breast and Lung Cancer Cells by Manuka Honey is Mediated by Selective Antagonism of the IL-6 Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4340. <https://doi.org/10.3390/ijms20184340>
10. Baca-Ibáñez, S. Y., Ríos-Paico, P. E., & Rojas-Naccha, J. C. (2015). Importancia del magnesio en la dieta humana. *Agroindustrial Science*, 5(2), 177-189.

11. Badolato, M., Carullo, G., Cione, E., Aiello, F., & Caroleo, M. C. (2017). From the hive: Honey, a novel weapon against cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.064>
12. Battino, M., Forbes-Hernández, T. Y., Gasparri, M., Afrin, S., Cianciosi, D., Zhang, J., Manna, P. P., Reboledo-Rodríguez, P., Varela Lopez, A., Quiles, J. L., Mezzetti, B., Bompadre, S., Xiao, J., & Giampieri, F. (2018). Relevance of functional foods in the Mediterranean diet: the role of olive oil, berries and honey in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6), 893–920. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1526165>
13. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Miel para la nutrición y la salud: una revisión. *Revista del Colegio Americano de Nutrición*, 27 (6), 677-689.
14. Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Oddo, L. P., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lhéritier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., & Vit, P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee World*, 80(2), 61–69. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1999.11099428>
15. Bojić, M., Debeljak, E., Tomičić, M., Medić-Šarić, M., & Tomić, S. (2011). Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-73>
16. Bonoan, R. E., Gonzalez, J., & Starks, P. T. (2019). The perils of forcing a generalist to be a specialist: lack of dietary essential amino acids impacts

honeybee pollen foraging and colony growth. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 95–103.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1656702>

17. Braghini, F., Biluca, F. C., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2020). Effect thermal processing in the honey of *Tetragonisca angustula*: profile physicochemical, individual phenolic compounds and antioxidant capacity. *Journal of Apicultural Research*, 60(2), 290–296.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1737362>
18. Bustos M, P., Amigo C, H., Arteaga LI, A., Acosta B, A. M., & Rona, R. J. (2003). Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes. *Revista médica de Chile*, 131(9). cardiovascular diseases in humans? *Nutrients*, 12(2), 283. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872003000900002>
19. Cereceres-Aragón, A., Rodrigo-García, J., Álvarez-Parrilla, E., & Rodríguez-Tadeo, A. (2019). Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutrición Hospitalaria*, 36(2), 470-478.
20. Celebioglu, H. (2020). Probiotic bacteria grown with chestnut honey enhance in vitro cytotoxicity on breast and colon cancer cells. *Archives of Biological Sciences*, 72(3), 329–338.
<https://doi.org/10.2298/abs200114027c>
21. Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Quiles, J. L., Gil, E., Bompadre, S., Simal-Gandara, J., Battino, M., & Giampieri, F. (2020). The Influence of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Anticancer Activity of Manuka Honey. *Antioxidants*, 9(1), 64.
<https://doi.org/10.3390/antiox9010064>

22. Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Ansary, J., Gil, E., Amici, A., Bompadre, S., Simal-Gandara, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2020). Phenolic compounds from Mediterranean foods as nutraceutical tools for the prevention of cancer: The effect of honey polyphenols on colorectal cancer stem-like cells from spheroids. *Food Chemistry*, 325, 126881. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126881>
23. Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Zhang, J., Ansary, J., Pacetti, M., Quiles, J. L., Simal-Gandara, J., & Battino, M. (2019). Effect of In vitro Gastrointestinal Digestion on the Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Manuka Honey. *eFood*, 1(1), 85. <https://doi.org/10.2991/efood.k.191011.001>
24. Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T., Afrin, S., Gasparri, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Flórez, S., Agudo Toyos, P., Quiles, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, 23(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
25. Codex Alimentarius (2019) Norma para la miel. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012s.pdf
26. Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
27. Dinnella C., Minichino P., D'Andrea A.M., Monteleone E. 2007. Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds

from extra-virgin olive oils during in vitro digestion. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 55: 8423-8429.

28. Farooqui, T., & A Farooqui, A. (2011). Health benefits of honey: implications for treating cardiovascular diseases. *Current Nutrition & Food Science*, 7(4), 232-252.
29. Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu R., & Saso L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltamperometry. *Biochemical et Biophysical Acta*. 1721: 174-184.
30. Geană, E. I., Ciucure, C. T., Costinel, D., & Ionete, R. E. (2020). Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}\text{C}$ signature. *Food Control*, 109, 106919. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106919>
31. Goldman L. (2020). Approach to the patient with possible cardiovascular disease. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman-Cecil Medicine*. 26th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020:cap 45.
32. Gośliński, M., Nowak, D., & Kłębukowska, L. (2019). Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 1269–1277. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04159-w>
33. Guerrero, J. A., Lozano, M. L., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Vicente, V., & Rivera, J. (2005). Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(2), 369–376. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.01099.x>

34. Guler, A., Kocaokutgen, H., Garipoglu, A. V., Onder, H., Ekinci, D., & Biyik, S. (2014). Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C3 and C4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, 155, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.033>
35. Gutiérrez-Venegas, G., Ventura-Arroyo, J. A., Arreguín-Cano, J. A., & Ostoa-Pérez, M. F. (2014). Flavonoids inhibit iNOS production via mitogen activated proteins in lipoteichoic acid stimulated cardiomyoblasts. *International Immunopharmacology*, 21(2), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.04.010>
36. Hermanns, R., Mateescu, C., Thrasyvoulou, A., Tananaki, C., Wagener, F. A., & Cremers, N. A. (2019). Defining the standards for medical grade honey. *Journal of Apicultural Research*, 59(2), 125–135. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1693713>
37. Hossen, M. S., Ali, M. Y., Jahurul, M., Abdel-Daim, M. M., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2017). Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. *Pharmacological Reports*, 69(6), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.07.002>
38. Iglesias, M. T., Martián-Alvarez, P. J., Polo, M. C., Lorenzo, C., Gonzalez, M., & Pueyo, E. N. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9099–9104.
39. Kedhari Sundaram, M., Hussain, A., Haque, S., Raina, R., & Afroze, N. (2019). Quercetin modifies 5'CpG promoter methylation and reactivates various tumor suppressor genes by modulating epigenetic marks in human

cervical cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 18357–18369. <https://doi.org/10.1002/jcb.29147>

40. Khan, H., Belwal, T., Efferth, T., Farooqi, A. A., Sanches-Silva, A., Vacca, R. A., Nabavi, S. F., Khan, F., Prasad Devkota, H., Barreca, D., Sureda, A., Tejada, S., Dacrema, M., Daglia, M., Suntar, P., Xu, S., Ullah, H., Battino, M., Giampieri, F., & Nabavi, S. M. (2020). Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(10), 1616–1639. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1763910>
41. Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2017). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5–37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
42. Marić, A., Jovanov, P., Sakač, M., Novaković, A., Hadnađev, M., Pezo, L., & Gadžurić, S. (2021). Un estudio integral de parámetros relacionados con los beneficios para la salud de la miel. *RSC Advances*, 11 (20), 12434-12441. <https://doi.org/10.1039/D0RA10887A>
43. Márquez-Reyes, JM, Valdés-González, A., García-Gómez, C., Rodríguez-Fuentes, H., Gamboa-Delgado, J., & Luna-Olvera, H. (2020). Evaluación de los efectos sinérgicos de cromo y plomo durante el proceso de fitorremediación con berro (*Nasturtium officinale*) en un humedal artificial. *Biotecnia* , 22 (2), 171-178.
44. Martín, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104.

45. Martina, S.J., Ramar, L.A., Silaban, M.R., Luthfi, M. & Govindan, P.A. (2019). Efectividad antiplaquetaria entre aspirina y miel sobre enfermedades cardiovasculares según el tiempo de sangrado tomado en ratones. *Revista macedonia de ciencias médicas de acceso abierto* , 7 (20), 3416.
46. Martínez-López, E., García-García, M. R., Campos-Pérez, W. Y., & González-Becerra, K. (2013). Genómica nutricional: conceptos y expectativas. *Revista de endocrinología y nutrición*, 21(1), 22-34.
47. Miyahira, J. (2018). Magnesio, un electrolito algo olvidado. *Revista Medica Herediana*, 29(2), 67-68.
48. Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
49. Mota-Blancas, E., & Perales-Caldera, E. (1999). Los mecanismos de absorción de calcio y los modificadores de absorción con base para la elaboración de una dieta de bajo costo para pacientes osteoporóticas. *Gac Méd Méx*, 135(3), 291-304.
50. Naznin, L., Hossain, M. R., Saha, D., Sultana, S., & Sarkar, M. K. (2017). Glycemic effects of honey compared to glucose using standard OGTT. *Journal of Enam Medical College*, 7(2), 95-100.
51. Niki, E. (2011). Capacidad antioxidante: ¿qué capacidad y cómo evaluarla ?. *Revista de investigación de Berry*, 1 (4), 169-176.
52. Nishito, Y., & Kambe, T. (2018). Absorption mechanisms of iron, copper, and zinc: an overview. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 64(1), 1-7.

53. Organización Mundial de la Salud (2020) Las diez principales causas de muerte en el mundo, una lista que varía entre países ricos y pobres. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2020/12/1485362>
54. Organización Mundial de la Salud. (1981). Normas para la miel. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/faowhocodexalimentarius/shproxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspce.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B121981%252F.pdf>
55. Organización Panamericana de la Salud (2019) Diabetes. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/diabetes>
56. Otero, MCB y Bernolo, L. (2020). La miel como alimento funcional y perspectivas en la producción de miel natural. En Alimentos funcionales y nutraceuticos (págs. 197-210). Springer, Cham.
57. Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of food science*, 76(1), R6-R15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
58. Perez-Balam, J., Quezada-Euan, J. J., Alfaro-Bates, R., Medina, S., McKendrick, L., Soro, A., & Paxton, R. J. (2012). The contribution of honey bees, flies and wasps to avocado (*Persea americana*) pollination in southern Mexico. *Journal of Pollination Ecology*, 8, 42-47.
59. Pohl, P., Steck, H., Greda, K., & Jamroz, P. (2012). Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. *Food Chemistry*, 134, 392–396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.065>

60. Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03170-5>
61. RODRIGUEZ, G. R. V. (2013). EFECTO DE LA FIBRA DIETARIA EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE FRUTOS TROPICALES DURANTE UN MODELO DE DIGESTIÓN In vitro.
62. Russo, G. L., & Ungaro, P. (2019). Epigenetic Mechanisms of Quercetin and Other Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention. *Epigenetics of Cancer Prevention*, 187–202. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812494-9.00009-3>
63. Rybak-Chmielewska, H. & Tomasik, P. (2003). Propiedades químicas y funcionales de los sácaridos alimentarios de la miel. *Boca ratón, CRC*, 73-80.
64. Sdiri, S., Bermejo, A., Aleza, P., Navarro, P., & Salvador, A. (2012). Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Research International*, 49(1), 462-468.
65. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). Crecen exportaciones de miel mexicana: Agricultura. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crecen-exportaciones-de-miel-mexicana-agricultura?idiom=es>
66. Seraglio, S.K.T., Schulz, M., Gonzaga, L.V., Fett, R. & Costa, A.C.O. (2021). Estado actual de los efectos de la digestión gastrointestinal en la miel: una revisión completa. *Química de los alimentos*, 129807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129807>

67. Seraglio, SKT, Valse, AC, Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, MS, Nehring, P., ... y Costa, ACO (2017). Efecto de la digestión gastrointestinal in vitro sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, minerales y capacidad antioxidante de mieles de mielada de Mimosa scabrella Bentham. *Food Research International*, 99, 670-678. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.024>
68. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). Avance comparativo por producto de la producción pecuaria. Gobierno de México. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecCompaEspProd.jsp
69. Shapla, UM, Solayman, M., Alam, N., Khalil, MI y Gan, SH (2018). Niveles de 5-hidroximetilfurfural (HMF) en la miel y otros productos alimenticios: efectos sobre las abejas y la salud humana. *Chemistry Central Journal* , 12 (1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0408-3>
70. Simonetti, A., Perna, A., Grassi, G. y Gambacorta, E. (2020). Actividad antioxidante de diferentes combinaciones de queso y miel antes y después de la digestión gastrointestinal in vitro. *LWT*, 131 , 109725.
71. Smetanska, I., Alharthi, S. S., & Selim, K. A. (2021). Physicochemical, antioxidant capacity and color analysis of six honeys from different origin. *Journal of King Saud University - Science*, 33(5), 101447. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101447>
72. Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srail, S. K., & Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS letters*, 458(2), 224-230.

73. Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
74. Takruri, H. R., Shomaf, M. S., & Shnaigat, S. F. (2017). Multi Floral Honey Has a Protective Effect against Mammary Cancer Induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in Sprague Dawley Rats. *Journal of Agricultural Science*, 9(2), 196. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n2p196>
75. Taniguchi, K., & Karin, M. (2014). IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*, 26(1), 54–74. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.001>
76. Tyrakowska, B., Soffers, A. E., Szymusiak, H., Boeren, S., Boersma, M. G., Lemańska, K., ... & Rietjens, I. M. (1999). TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1427-1436.
77. Ullah, H., de Filippis, A., Santarcangelo, C., & Daglia, M. (2020). Epigenetic regulation by polyphenols in diabetes and related complications. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 13(4), 289–310. <https://doi.org/10.3233/mnm-200489>
78. Ulloa, J. A., Mondragón Cortez, P., Rodríguez Rodríguez, R., Resendiz Vázquez, J. A. & Rosas Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. CONACYT.
79. Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct.*, (), 10.1039.C5FO00322A–. doi:10.1039/C5FO00322A

80. VISKUPIČOVÁ, J., ONDREJOVIČ, M., & ŠTURDÍK, E. (2008). Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food & Nutrition Research*, 47(4).
81. Waheed, M., Hussain, M. B., Javed, A., Mushtaq, Z., Hassan, S., Shariati, M. A., Khan, M. U., Majeed, M., Nigam, M., Mishra, A. P., & Heydari, M. (2019). Honey and cancer: A mechanistic review. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2499–2503. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.12.019>
82. Won, S. R., Li, C. Y., Kim, J. W., & Rhee, H. I. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, 113(4), 1334–1338. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.082>
83. Zalibera M., Stasko A., Slebodavá A., Jancovicová V., Cermáková T., Brezová V. 2008. Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys- An electron paramagnetic resonance study. *Food Chemistry* 110:512-521.

12. Anexos

RESUMEN CURRICULAR

William Jordan Morales Sarmiento
Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias en Nutrición

Tesis: BIOACCESIBILIDAD IN VITRO DE COMPUESTOS FENÓLICOS, MINERALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MIELES FLORALES DE *CITRUS SINENSIS* Y *PERSEA AMERICANA*.

Campo de Estudio:

Ciencias de la Salud

Datos Personales:

Nacido en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas el 17 de octubre de 1992, hijo de Francisco Morales Zúñiga y Martha Elizabeth Sarmiento Gutiérrez.

Educación:

Egresado de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, grado obtenido Licenciado en nutriología en 2019.

Experiencia Profesional:

Prácticas clínicas en hospital Ángeles de Mocel en 2016. Servicio social realizado en club de fútbol de 1ª división "Jaguars F.C" en 2018. Consulta clínica en clínica universitaria UNICACH en 2019. Consulta privada desde 2019 a 2022.